

**THESE**

**Pour le**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2**

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Spécialité : Microbiologie-Immunologie**

**Présentée et soutenue publiquement le 21 Décembre 2012**

**par**

**Célia FLORIMOND**

**Née le 10 Janvier 1986 à Fort-de-France**

**ETUDE ET CARACTERISATION DE  
NOUVELLES PROTEINES DU  
CYTOSQUELETTE DU PATHOGENE  
*TRYPANOSOMA BRUCEI***

**Membres du jury :**

**Président : Pr. M. Teichmann**

**Rapporteur : Dr. P. Bastin**

**Rapporteur : Dr. A. Touré**

**Directeur de thèse : Dr. D. Robinson**

# Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité dirigé par le Professeur Mickael KANN. Je tiens à le remercier pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie également toutes les personnes de ce laboratoire qui m'ont aidée durant ces cinq dernières années

Je remercie la Région Martinique pour le soutien financier qu'elle m'a accordé afin de réaliser ma thèse.

Je remercie les membres du jury : Pr. M. TEICHMANN, Dr. P. BASTIN et Dr. A. TOURE, qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement mon Directeur de thèse, Derrick ROBINSON, pour ses conseils, ainsi que l'équipe au sein de laquelle j'ai travaillé ces cinq dernières années.

Je remercie donc Denis DACHEUX et Mélanie BONHIVERS, qui furent mes maîtres de stage en Master 1 et Master 2. Merci de toute l'aide et des conseils que vous m'avez apportés toutes ces années. Je pense également (bien sûr) à Annelise SAHIN avec qui j'ai travaillé de concert pendant mes deux premières années de thèse (nous fûmes pour un temps les « spice girls » de l'équipe), merci pour ta bonne humeur et ton aide. Merci également à Nicolas LANDREIN, Benoît ROGER, Ed BYARD, Christophe CHOPARD, Karen EGUIENTA et Elodie BERDANCE pour l'aide que vous m'avez apporté.

Je pense également à mes parents Paulette et Georges, ainsi que toute ma famille, merci de votre soutien. Je remercie également particulièrement (non sans une certaine ironie), mon frère : Christophe Laurent FLORIMOND (tu remarqueras que j'ai cité tes prénoms et nom, moi !!) et ma cousine Kathy pour leur soutien indéfectiblement et sans qui, je ne serais pas là aujourd'hui. Merci également à mes amis Marianne, Ruben et Nathalie ainsi qu'à ma belle-sœur Magali, ses parents Edith, Eric, Amanda, Jérôme et Isabelle.

# Abbreviations

aa. : acide aminé

AD : domaine d'activation du facteur de transcription GAL4

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNi : ARN interférence

Asp : acide aspartique

BD : domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription GAL4

Da : Dalton

DAPI : 4', 6'-diamidino-2-phénylindole

DTT : Dithiothreitol

FAZ : Flagellar attachment zone (zone d'attachement flagellaire)

FITC : Fluorescéine-5-isothiocyanate

FP : Flagellar pocket (poche flagellaire)

FPC : Flagellar pocket collar (collier de la poche flagellaire)

GFP : Green fluorescent protein

Glu : acide glutamique

GPI : glycosylphosphatidylinositol

GTP : Guanosine triphosphate

HAT : Trypanosomiase africaine humaine

His : Histidine

IFT : Intraflagellar transport

IPTG : Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside

KO : Knock-out

Lys : lysine

NTD: Neglected Tropical Disease, CNTD: Centre for NTD

NP40 : Nonidet P-40

pb : paires de bases

PCR / RT-PCR : Polymerase chain reaction, RT : Reverse transcriptase

PBS : Phosphate buffered saline

PFR: Paraflagellar Rod

pH: potential hydrogène

PMSF: Fluorure de phénylméthanesulfonyle

RE (ou ER): reticulum endoplasmique

VSG : variant surface glycoprotein

SVF: sérum de veau foetal

# Table des matières

## I. Introduction

I.	<i>Kinetoplastidae</i> .....	18
II.	Leishmanioses – Trypanosomiases .....	18
A.	Leishmanioses.....	18
B.	Trypanosomiase américaine - Maladie de Chagas .....	20
C.	Trypanosomiasés africaines .....	22
1.	Trypanosomiase africaine animale.....	22
2.	Trypanosomiase africaine humaine (HAT) .....	22
III.	<i>Trypanosoma brucei</i> .....	28
A.	Cycle de division cellulaire.....	28
B.	Organisation cellulaire .....	32
1.	Expression génétique.....	32
2.	Antigène de surface .....	34
3.	Cytosquelette .....	38
4.	Poche flagellaire (FP) – Trafic intracellulaire .....	50
5.	Collier de la poche flagellaire (FPC) .....	54
C.	BILBO1.....	60
1.	Analyse fonctionnelle réalisée par Bonhivers <i>et al.</i> <sup>[130]</sup> .....	60
IV.	Objectif de l'étude .....	64

## II. Matériels et Méthodes

I.	Matériel .....	70
A.	Lignées cellulaires: .....	70
1.	Trypanosome .....	70
2.	Cellules mammifères.....	70
3.	Levures .....	72
4.	Bactérie <i>Escherichia coli</i> BL21 .....	72
B.	Vecteurs .....	72
1.	Chez le parasite .....	72
2.	Chez les cellules U-2 OS .....	74
3.	Chez la levure .....	76
4.	Chez la bactérie .....	76
II.	Méthodes .....	76

A. Milieu de culture : .....	76
1. Trypanosomes .....	76
2. Cellules mammifères.....	78
3. Levures .....	78
B. Production d'anticorps .....	80
1. Expression et purification de protéines recombinantes exprimées chez <i>E. coli</i> .....	80
2. Production des anticorps polyclonaux .....	80
C. Méthode d'étude d'interaction protéique – Double-hybride .....	82
D. Méthodes d'étude de génomique fonctionnelle des protéines du FPC .....	84
1. Construction des vecteurs ou plasmides .....	84
2. Transfections.....	84
3. Surexpression chez le parasite .....	88
4. ARN interférence.....	88
5. Knock-Out ou KO du gène <i>FPC2</i> .....	90
6. Western-Blot .....	90
7. Analyse du taux d'ARNm - RT-PCR .....	94
E. Méthodes d'imagerie .....	96
1. Immunofluorescence.....	96
2. Microscopie électronique.....	102

### III. Résultats

#### **BILBO1: protéine du FPC**

I. Structure primaire et analyse <i>in-silico</i> de BILBO1 .....	106
II. Analyse fonctionnelle de BILBO1 .....	108
A. Expression chez les trypanosomes.....	110
B. Analyse en double-hybride .....	112
C. Expression en système hétérologue .....	116
1. Forme entière de BILBO1 .....	116
2. Troncations de BILBO1 .....	118
3. Mutations des motifs EF-Hand .....	120
III. Rôle de BILBO1 et du FPC chez <i>T. brucei</i> .....	124
IV. Discussion .....	126

#### **FPC2: nouvelle protéine du FPC**

I.	Introduction .....	132
A.	Analyse <i>in-silico</i> .....	132
B.	Localisation de FPC2 chez <i>T. brucei</i> et interaction .....	136
1.	Expression et localisation de FPC2 chez <i>T. brucei</i> .....	136
2.	Interactions de FPC2 .....	138
II.	Analyse fonctionnelle .....	138
A.	Sur-expression de la protéine de fusion FPC2-GFP .....	138
B.	« Knock-down » ou ARN interférence de <i>FPC2</i> .....	140
C.	« Knock-out » (KO) ou extinction du gène <i>FPC2</i> .....	142
III.	Discussion .....	146

### **FPC4: partenaire de BILBO1**

I.	Analyse <i>in-silico</i> .....	150
II.	Interactome .....	152
III.	Analyse fonctionnelle .....	154
A.	FPC4 : protéine du FPC chez <i>T. brucei</i> .....	154
1.	Production d'un anticorps polyclonal anti-FPC4 .....	154
2.	Localisation de FPC4 chez <i>T. brucei</i> .....	154
3.	Interaction entre FPC4 et les protéines du bilobe .....	156
B.	Surexpression de FPC4 chez <i>T. brucei</i> .....	158
1.	Surexpression de GFP-FPC4 .....	158
2.	Surexpression de FPC4 sans étiquette .....	162
C.	ARN interférence de <i>FPC4</i> .....	162
D.	Expression de FPC4 en système hétérologue .....	166
IV.	Discussion .....	170

### **FPC6: partenaire de BILBO1**

I.	Analyse <i>in-silico</i> .....	174
II.	Interactome .....	176
III.	Analyse fonctionnelle .....	178
A.	FPC6 : protéine du FPC chez <i>T. brucei</i> .....	178
1.	Production d'un polyclonal anti-FPC6 .....	178
2.	Localisation de FPC6 chez <i>T. brucei</i> .....	178
B.	Surexpression de GFP-FPC6 .....	180
C.	ARNi de <i>FPC6</i> .....	182

D.	Expression de FPC6 dans un système hétérologue.....	182
1.	Cellules U-2 OS .....	182
2.	Cellules RPE-1 .....	184
IV.	Discussion - Perspectives .....	184

### **Protéines du FPC: Interactions**

I.	Interactome au sein du FPC .....	188
II.	Analyse fonctionnelle .....	190
A.	ARNi des protéines du FPC chez <i>T. brucei</i> .....	190
1.	ARNi de <i>BILBO1</i> .....	190
2.	ARNi de <i>FPC2</i> .....	194
3.	ARNi de <i>FPC4</i> .....	196
B.	Co-expression en système hétérologue des protéines du FPC.....	198
1.	Co-expression de BILBO1 et FPC4.....	198
2.	Co-expression de BILBO1 et FPC6.....	200
III.	Discussion .....	200

## **IV. Discussion générale**

I.	FPC : cible thérapeutique potentielle .....	206
II.	BILBO1 : Rôle structural.....	208
A.	Propriété de polymérisation de BILBO1 .....	208
A.	Formation du FPC .....	212
III.	Interactome au sein du FPC chez <i>T. brucei</i> .....	212
IV.	Poche flagellaire : structure .....	216
V.	Perspectives générales.....	218

# **INTRODUCTION**

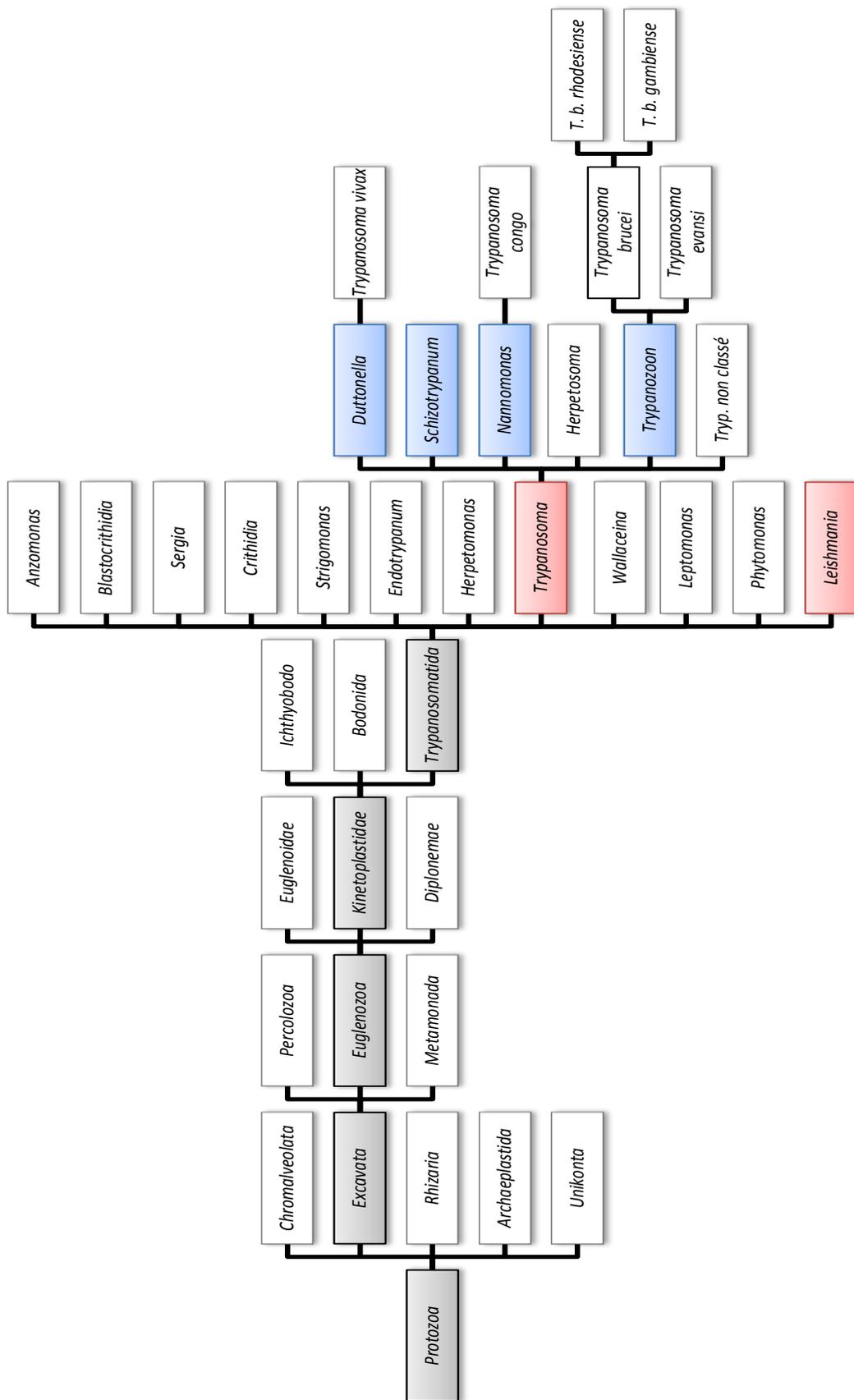


Figure 1: Phylogénie des parasites responsables des leishmanioses, trypanosomiasés africaines et américaines.

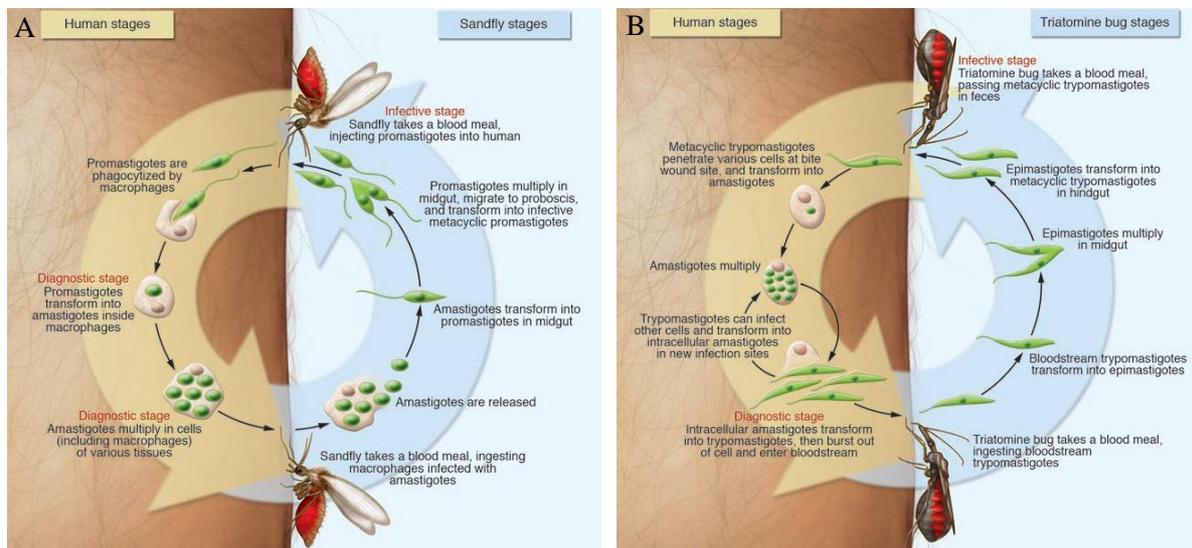
Les Maladies Tropicales Négligées (Neglected Tropical Disease : NTDs), regroupant environ 13 maladies infectieuses qui affectent plus de 1,4 milliards de personnes dans le monde, elles touchent principalement les populations les plus pauvres de la planète <sup>[1]</sup> ([http://www.who.int/neglected\\_diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/en/)). Comme leur nom l'indique, l'émergence ou la recrudescence de ces maladies sévissant majoritairement en zone intertropicale, ont longtemps été négligées par les autorités sanitaires internationales. En effet, durant les précédentes décennies, l'accent a surtout été porté sur la lutte contre le SIDA, le paludisme et la tuberculose. Depuis quelques années, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ainsi que plusieurs fondations (Fondation EFINTD, Fondation Bill et Melinda Gates...) et instituts (Sabin Vaccine Institute, CNTD de Liverpool...) ont mis en place et financé plusieurs programmes de lutte contre les NTDs. Ces structures se consacrent majoritairement à la lutte contre 7 maladies <sup>[2]</sup> : Ankylostomiase, Ascaridiose, Filariose lymphatique, Onchocercose, Schistosomiase, Trachome et Trichocéphalose en établissant un programme d'éradication de ces maladies d'ici à 2020. Parmi les 10 autres NTDs reconnues, on distingue les leishmanioses et trypanosomiasés qui affectent plus de 20 millions de personnes. Ce sont des parasitoses causées par des micro-organismes unicellulaires monoflagellés appartenant à la classe des *Kinetoplastidae* <sup>[3]</sup>.

## I. *Kinetoplastidae*

La classe des *Kinetoplastidae* (*Eukaryota*, *Excavata*, *Euglenozoa*) regroupe des micro-organismes eucaryotes parasites et endosymbiontes appartenant à 3 ordres différents : *Ichthyobodo*, *Bodonida* et *Trypanosomatida* (Figure 1) <sup>[4, 5]</sup>. L'ordre des *Trypanosomatida* comprend les microorganismes responsables des leishmanioses et trypanosomiasés américaine et africaine. Ces parasites du genre *Leishmania*, l'espèce *Trypanosoma cruzi* et les deux sous-espèces de *Trypanosoma brucei* sont pathogènes pour l'Homme <sup>[4]</sup>. Ces parasites unicellulaires et mono-flagellés se caractérisent par la présence d'un organite appelé kinétoplaste. Le kinétoplaste renferme le matériel génétique condensé de la seule mitochondrie présente dans la cellule, il représente 30% du matériel génétique total de la cellule <sup>[6]</sup>. Il est physiquement connecté au corps basaux <sup>[7]</sup> et est donc en lien étroit avec le flagelle de la cellule. Suivant les espèces, la morphologie du kinétoplaste varie d'une structure en barre (*T. brucei*, *Leishmania*,...) à une structure plus ronde (certaines formes de *T. cruzi*,...) formée de brins circulaires d'ADN compacté <sup>[6]</sup>.

## II. Leishmanioses – Trypanosomiasés

### A. Leishmanioses



**Figure 2: Cycle de vie des parasites du genre *Leishmania* (A) et de l'espèce *Trypanosoma cruzi* (B), chez l'insecte vecteur et chez l'hôte mammifère. D'après Stuart *et al.*, The Journal of Clinical Investigation, 2008.**

Les leishmanioses sont des infections dues à des parasites intracellulaires (développement dans les macrophages de l'hôte) du genre *Leishmania*. Cette maladie affecte environ 12 millions de personnes à travers le monde dans une centaine de pays, notamment en Europe [3, 8] et cause plus de 50 000 morts par an. Elle est transmise par un insecte vecteur hématophage appelé phlébotome (*Phlebotominae*) [8], présent sur la majorité des continents. Lors de son repas sanguin, l'insecte infecté inocule chez l'hôte des parasites, sous forme promastigote qui entrent dans les cellules de l'immunité innée (macrophages) de l'hôte. Au sein des macrophages, ils se différencient en une forme proliférative appelée amastigote capable d'envahir, après rupture du macrophage infecté, d'autres macrophages sains (Figure 2A) [3]. Ces formes amastigotes peuvent être absorbées par le phlébotome lors de sa piqûre et chez l'insecte elles se transforment en formes promastigotes. On distingue les leishmanioses de type cutané causées principalement par *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* ; des leishmanioses de type viscéral qui sont fatales en absence de traitement et causées par *L. donovani* et *L. infantum* [9, 10]. Depuis une dizaine d'années, la leishmaniose viscérale est traitée via des suspensions de liposomes combinés à de l'amphotéricine B, du miltéfosine et de la paromomycine [11]. La leishmaniose cutanée est traitée par injection d'antimoine pentavalent dans la zone lésée [9], ce traitement bien que présentant une forte toxicité est toujours utilisé aujourd'hui.

## **B. Trypanosomiase américaine - Maladie de Chagas**

La maladie de Chagas est une parasitose humaine due à une infection par le parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) [3, 12]. Le parasite responsable de cette trypanosomiase a été découvert et isolé par Carlos Chagas en 1909. Cette maladie, qui entraîne de graves atteintes cardiaques chez les patients, affecte environ 10 millions de personnes dans le monde et est responsable de 14 000 morts par an. Elle est endémique dans 19 pays d'Amérique centrale et du Sud [12]. *T. cruzi* est transmis par les fèces d'un insecte hématophage appelé réduve [13]. Ce parasite peut être également transmis verticalement de la mère à l'enfant, par transfusion sanguine, transplantation d'organes ou via des denrées alimentaires contaminées [12]. Cette parasitose n'est donc pas limitée aux zones endémiques, car les migrations de personnes favorisent sa dissémination à travers le monde. Le cycle de vie de *T. cruzi* comprend deux phases, l'une au sein de l'insecte vecteur faisant intervenir les stades de développement épimastigote (forme proliférative dans l'intestin moyen) et métacyclique (forme infectieuse située dans l'intestin postérieur). L'autre phase, au sein de l'hôte mammifère où on distingue les formes amastigote (forme intracellulaire proliférative) et trypomastigote (forme ingérée

par l'insecte) (Figure 2B) <sup>[3]</sup>. L'infection par *T. cruzi* se caractérise par une phase aiguë de quelques semaines, suivie d'une phase chronique souvent asymptomatique qui peut durer plusieurs années <sup>[3, 14]</sup>. Depuis les années 60, le traitement proposé aux patients en phase aiguë fait intervenir deux molécules : le nifurtimox, molécule également utilisée en combinaison avec l'éflornithine pour le traitement du stade 2 de la trypanosomiase africaine humaine et le benznidazole, un dérivé d'imidazole <sup>[4, 12]</sup>. Toutefois, ce traitement n'est pas efficace contre la phase chronique de l'infection et ses effets secondaires ne sont pas négligeables. De nombreuses études sont menées afin de proposer une vaccination contre cette maladie <sup>[15]</sup>, néanmoins à ce jour il n'existe aucun vaccin permettant de lutter contre cette parasitose.

## **C. Trypanosomiasés africaines**

Les trypanosomiasés africaines sont endémiques dans la zone subsaharienne du continent africain. Cette zone délimite la répartition de la mouche tsé-tsé (*Glossina sp.*), l'insecte-vecteur hématophage véhiculant les parasites responsables de ces infections <sup>[3]</sup>.

### **1. Trypanosomiase africaine animale**

La trypanosomiase africaine animale est également appelée Nagana, elle affecte particulièrement le bétail entraînant ainsi une altération de la production laitière et bovine de plusieurs régions d'Afrique. La perte financière consécutive à cette parasitose est évaluée à 1,3 milliards de dollars par an <sup>[16]</sup>. Cette maladie est véhiculée par la mouche tsé-tsé et est principalement causée par les espèces *T. congolense* et *T. vivax* et à une moindre échelle par *T. b. brucei* et *T. evansi*. En condition normale, ces espèces n'infectent pas l'Homme car elles sont sensibles à l'action du système immunitaire inné. En effet, le sérum humain véhicule deux facteurs trypanolytiques, appelés TLF1 et TLF2 (Trypanolytic serum Factors), comportant chacun l'apolipoprotéine L-1 (APOL-1) <sup>[17, 18]</sup>. L'APOL-1 entre dans le parasite par endocytose et se retrouve dans son système endosomal où elle crée des pores à la membrane de l'endo-lysosome conduisant à une libération de facteurs lytiques dans la cellule et à la mort du parasite.

### **2. Trypanosomiase africaine humaine (HAT)**

La trypanosomiase africaine humaine, également appelée « maladie du sommeil », est une parasitose due à deux sous-espèces de *T. brucei* : *T. brucei rhodesiense* et *T. brucei gambiense* <sup>[19]</sup>. Ces deux sous-espèces, pathogènes pour l'Homme ont développé des mécanismes de résistances aux TLF. *T. b. rhodesiense* possède au sein de ses endosomes une

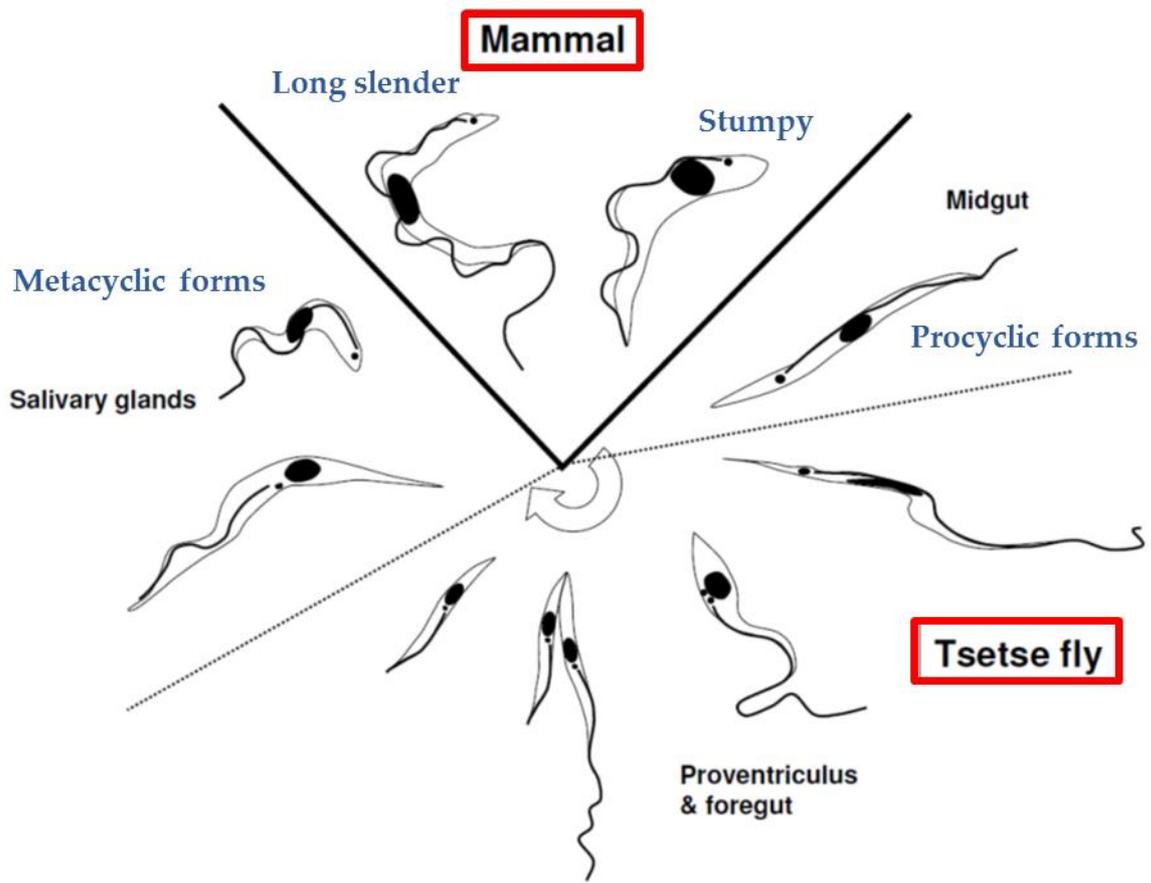


Figure 3: Cycle de vie des trypanosomes africains chez la mouche tsé-tsé (insecte vecteur) et chez l'hôte mammifère. D'après Peacock *et al.*, Kinetoplastid biology and disease, 2007.

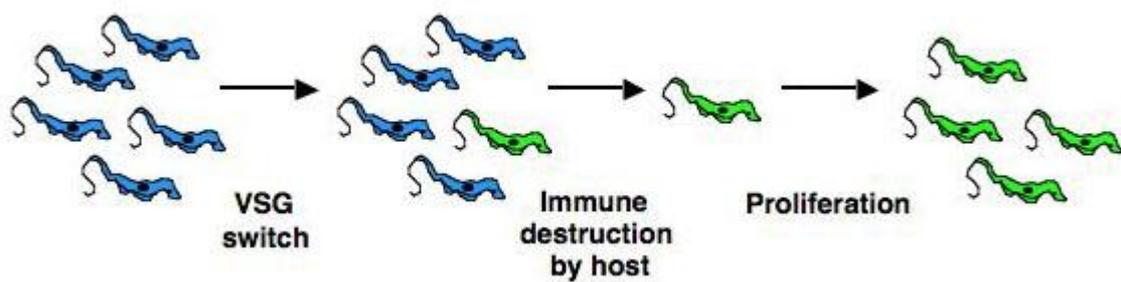


Figure 4: Schéma de la variation antigénique des VSGs sous l'influence du système immunitaire de l'hôte mammifère. <http://www.ctegd.uga.edu/sabatini.php>

protéine nommée SRA (Serum Resistance-Associated) <sup>[20]</sup>, capable d'interagir avec l'APO-L1 et ainsi inhiber la formation de pores dans la membrane de l'endolysosome <sup>[17, 18]</sup>. La voie de résistance empruntée par *T. b. gambiense* est moins connue. En effet cette sous-espèce ne possède pas de gène codant pour la protéine SRA. De récents travaux ont montré l'implication du récepteur à l'hémoglobine, présent à la membrane de la poche flagellaire (FP pour flagellar pocket) du parasite, dans cette résistance <sup>[21, 22]</sup>. Chez *T. b. gambiense*, ce récepteur est peu exprimé et ainsi restreint l'entrée par endocytose de l'APO-L1 chez le parasite. Ces deux sous-espèces de *T. brucei* sont géographiquement réparties différemment sur le territoire africain. *T. brucei rhodesiense* est présent à l'Est et au Sud de l'Afrique <sup>[19]</sup> alors que *T. brucei gambiense* est endémique à l'Ouest et au Centre de l'Afrique. L'HAT est fatale sans traitement et endémique dans 37 pays d'Afrique subsaharienne. Lors de la piqûre par une mouche infectée, des formes métacycliques (formes non-répliquatives de préadaptation à l'organisme mammifère) du parasite sont injectées chez l'hôte mammifère. Dans le réseau périphérique (sang, lymph), ces formes se différencient en formes prolifératives sanguines-trypomastigotes et en formes non-répliquatives dites « stumpy ». Ainsi lors du repas sanguin, une mouche saine s'infecte en ingérant les formes stumpy du parasite. Dans l'intestin de la mouche, les parasites se différencient en formes prolifératives procycliques-trypomastigotes et migrent vers le proventricule de l'insecte, se différencient en formes épimastigotes (forme proliférative) et migrent vers les glandes salivaires. Ces parasites se différencient enfin en formes métacycliques pré-adaptées à l'environnement de l'hôte mammifère (Figure 3) <sup>[3]</sup>. Ce cycle assure la dissémination de l'infection au sein de la population exposée. La maladie du sommeil se distingue par deux stades d'infection, l'un restreint au réseau sanguin et lymphatique : c'est la phase de parasitémie et l'autre faisant intervenir le système nerveux central <sup>[19]</sup>. Au cours de la phase de parasitémie, le parasite échappe au système immunitaire de l'hôte mammifère notamment, *via* la modification de son antigène de surface. En effet, les formes infectieuses de *T. brucei* sont recouvertes d'un manteau de glycoprotéines appelées VSG (Variant Surface Glycoprotéine) <sup>[23]</sup>. Le parasite peut exprimer un variant différent de ses protéines de surface, pour échapper à une reconnaissance de ces glycoprotéines par les anticorps de l'hôte <sup>[17, 24]</sup>. Chez *T. b. spp.* il existe plus de 1000 gènes codant pour les VSG <sup>[24]</sup>, mais seul un gène VSG est exprimé à la fois au cours de la première phase de l'infection. On observe alors des pics de parasitémie associés à une variation des protéines de surface du parasite (Figure 4). Lorsque la protéine de surface présente sur le parasite est reconnue par le système immunitaire de l'hôte, on observe une diminution de la parasitémie.

Disease and stage	First-line treatment	Dosing	Other treatment(s)
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> HAT			
First-stage	Pentamidine isethionate	4 mg/kg/day IM or IV (diluted in saline and given in 2-h infusions) x 7 days	
Second-stage	NECT: Eflornithine + Nifurtimox	Eflornithine: 400 mg/kg/day IV in 2 (1-h) infusions x 7 days Nifurtimox: 15 mg/kg/day PO in 3 doses x 10 days	Eflornithine: 400 mg/kg/day IV in 4 infusions x 14 days Second line (e.g. treatment of relapse): Melarsoprol 2.2 mg/kg/day IV x 10 days
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> HAT			
First-stage	Suramin	Test dose of 4–5 mg/kg IV (day 1), then 20 mg/kg IV weekly x 5 weeks (maximal dose/injection: 1 g)	
Second-stage	Melarsoprol	2.2 mg/kg/day IV x 10 days	Three series of 3.6 mg/kg/day IV x 3 days spaced by intervals of 7 days

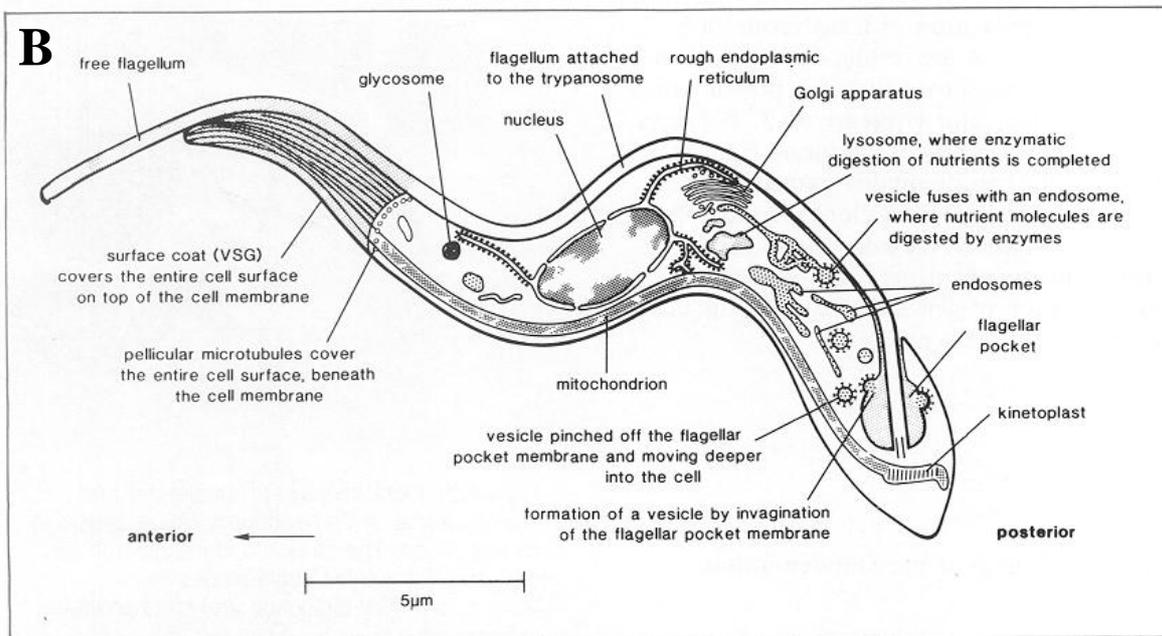
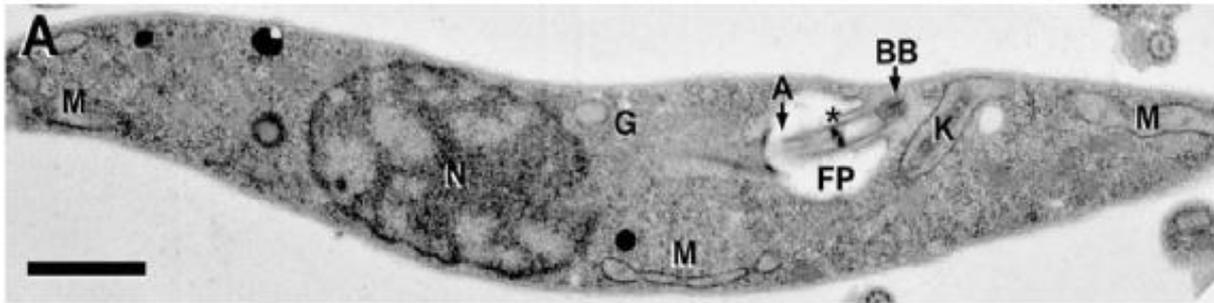
HAT, human African trypanosomiasis; IM, intramuscular; IV, intravenous; NECT, Nifurtimox–eflornithine combination therapy; PO, per os.

**Figure 5: Tableau répertoriant les différents traitements contre les deux stades de la maladie du sommeil (ou HAT).** D'après Malvy and Chappuis, *Clinical Microbiology and Infection*, 2011.

Néanmoins, celle-ci ré-augmente lorsqu'une nouvelle population de parasite exprimant un nouveau variant de la protéine de surface émerge. Cette nouvelle population n'étant pas reconnue par les anticorps circulants, la parasitémie associée augmente <sup>[24]</sup>. De nouveaux anticorps vont alors être produits et le cycle de parasitémie va recommencer. Ce mécanisme permet au parasite d'échapper à la réponse immunitaire humorale (production d'anticorps) de l'hôte mammifère. Cette première phase de la maladie peut durer de quelques semaines à quelques années suivant le parasite associé. Lors de la seconde phase de l'infection, le parasite passe à travers la barrière hémato-encéphalique ce qui lui permet d'envahir le système nerveux central de l'hôte. Pendant cette phase de nombreuses atteintes neurologiques sont observées, notamment une atteinte du cycle du sommeil et du rythme circadien, une modification du comportement, le coma et enfin la mort <sup>[19]</sup>. Aujourd'hui, il n'existe aucun vaccin contre cette infection et la médication proposée est très lourde et très toxique pour les patients <sup>[25]</sup>. Aussi de nombreux travaux sont menés dans le but de mettre à jour de nouvelles cibles thérapeutiques chez *T. brucei* <sup>[26]</sup>.

#### **a) *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*)**

Ce parasite a été identifié pour la première fois en 1910, en Zambie par Stephens et Fantham. *T. b. rhodesiense* est présent dans 13 pays d'Afrique (Est et Sud) et véhiculé par les mouches tsé-tsé du groupe *Glossina morsitans* <sup>[19]</sup>. On distingue deux réservoirs de ce parasite : l'Homme et des animaux tels que les antilopes et le bétail. Ceci permet de définir la maladie associée à ce parasite comme une anthroponose <sup>[27]</sup>. L'infection due à *T. b. rhodesiense* est une forme dite aigüe de la maladie du sommeil. En effet, dans ce cas la seconde phase de la maladie est atteinte en quelques semaines et sans traitement, la mort survient en quelques mois <sup>[3, 27]</sup>. Lors de la première phase de l'infection à *T. b. rhodesiense*, les patients sont traités sur plusieurs semaines avec de la suramine par intraveineuse <sup>[25, 28]</sup> (Figure 5). Cette molécule est inefficace contre *T. b. gambiense* ou lors de la seconde phase de la maladie <sup>[25]</sup>. La suramine présente une forte toxicité rénale et neurologique, pourtant cette molécule est encore utilisée sur le terrain pour traiter les patients. Le traitement de la seconde phase de la maladie nécessite une molécule capable de passer la barrière hémato-encéphalique. Le mélarsoprol est un médicament dont la molécule active est un dérivé d'arsenic capable de passer la barrière hémato-encéphalique. La présence d'arsenic rend cette molécule très toxique (encéphalopathie, atteinte hépatique...) et ce traitement provoque la mort dans 5-10% des cas <sup>[25]</sup>.



**Figure 6: Organisation cellulaire de *Trypanosoma brucei*.** (A) : Image d'une coupe ultra-fine du parasite (coupe longitudinale). Légende= M : mitochondrie ; K : kinétoplaste ; BB : corps basal ; FP : poche flagellaire ; A : axonème ; G : appareil de Golgi ; N : noyau ; l'astérisque désigne la zone de transition flagellaire. Chacun de ces organites est présent en copie unique chez le parasite. Barre d'échelle= 1 µm. Publiée par Bonhivers *et al.*, 2008. (B) : Schéma de l'organisation cellulaire du parasite. Le schéma est orienté afin de repérer l'extrémité antérieure (à gauche) et l'extrémité postérieure (à droite) de la cellule. Issu du site <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/Ilrad90/Trypano.htm>.

### a) *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*)

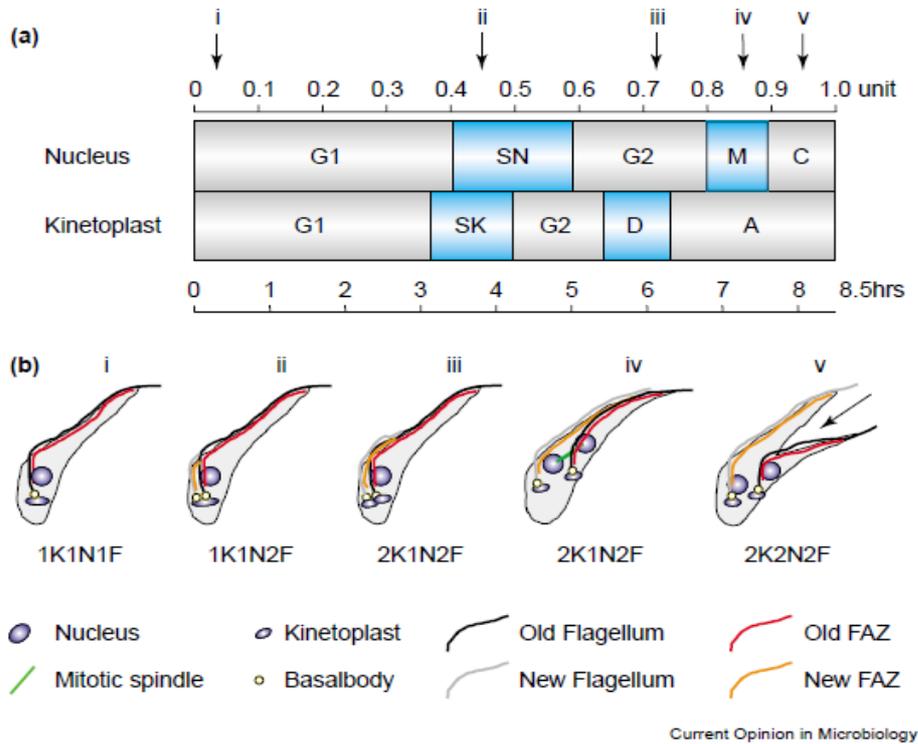
Ce parasite a été découvert en 1910 par York. *T. b. gambiense* est présent dans 24 pays d'Afrique Centrale et de l'Ouest, ce parasite est véhiculé par les mouches tsé-tsé du groupe *Glossina palpalis*. Le réservoir est essentiellement humain et le parasite est associé à une forme dite chronique de la maladie du sommeil qui peut durer plusieurs années<sup>[19]</sup>. Lors de la première phase de la maladie, les patients sont traités à la pentamidine, administrée par injection intra-musculaire. A la seconde phase de l'infection, de l'éflornithine, un inhibiteur de la biosynthèse des polyamines est injecté par intraveineuse (4 injections par jours) chez les patients (Figure 5). La toxicité de cette molécule est faible par rapport à celle du mélarsoprol, néanmoins ce traitement n'est utilisé que pour la sous-espèce *T. b. gambiense* car il se révèle inefficace contre *T. b. rhodesiense*<sup>[19, 25]</sup>. Il existe également des bithérapies combinant l'éflornithine au nifurtimox, dont la durée et les conditions d'administrations apportent une amélioration par rapport à la médication proposant l'éflornithine seule.

Afin d'améliorer l'efficacité du traitement proposé contre ces maladies, il est important de comprendre la biologie de ces microorganismes dans le but de cibler des éléments ou mécanismes essentiels à leur développement chez l'hôte mammifère. Dans ce contexte, le cytosquelette du parasite représente une cible thérapeutique.

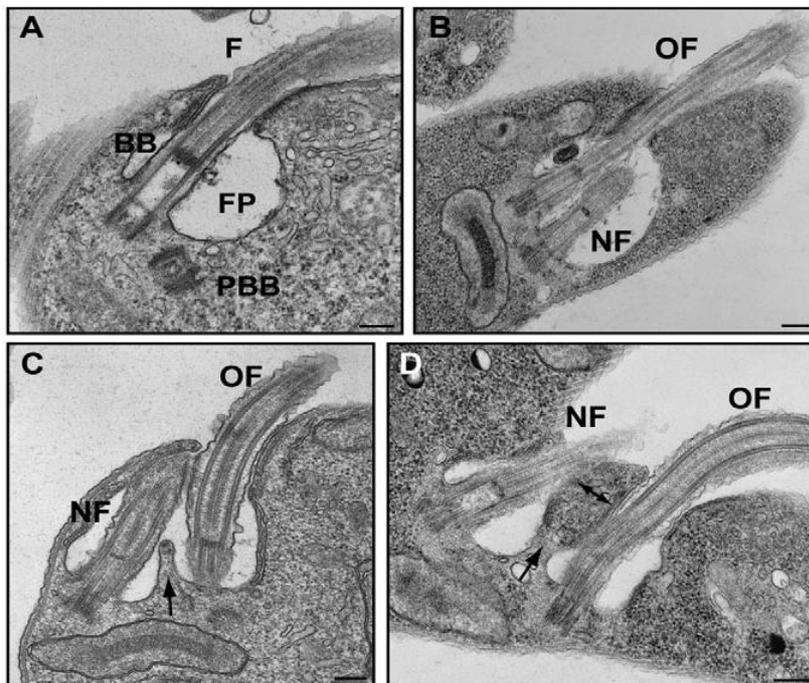
## III. *Trypanosoma brucei*

### A. Cycle de division cellulaire

Ce parasite unicellulaire de 20-25 µm de long et de 3-5 µm de diamètre, est capable de proliférer par division binaire *in vivo* et *in vitro*. Deux formes prolifératives de *T. brucei* sont cultivables en laboratoire : la forme procyclique trypomastigote présente chez l'insecte vecteur, notée pour simplifier « forme procyclique » et la forme sanguine trypomastigote présente chez l'hôte mammifère, notée « forme sanguine »<sup>[29]</sup>. Ces deux formes prolifèrent par division binaire : à partir d'une cellule, deux cellules sont générées<sup>[30, 31]</sup>. Au stade G1, la cellule parasitaire comporte différents organites et structures présents en une seule copie, tels que le noyau, la mitochondrie et le kinétoplaste, les corps basaux mature et immature, le flagelle, la zone d'attachement flagellaire (FAZ), la poche flagellaire (FP), le collier de poche flagellaire (FPC), le bilobe, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique<sup>[30, 31, 32]</sup> (Figure 6). Lors de la division cellulaire, toutes ces entités doivent être dupliquées ou nouvellement formées afin de générer une nouvelle cellule.



**Figure 7: Cycle de division cellulaire de *T. brucei* forme procyclique.** (a) Schématisation du déroulement des étapes de division du parasite. Légende : G1= phase G1 ; SK= phase S du kinétoplaste ; SN= phase S nucléaire ; G2= phase G2 ; D= division des kinétoplastes ; A= « apportioning » ou appointement phase de ségrégation des kinétoplastes et corps basal ; M= mitose ; C= cytokinèse. (b) Cinq stades du cycle de division, annotés selon la nomenclature suivante : K = kinétoplaste ; N = noyau ; F = flagelle. D'après Paul McKean, Current Opinion in Microbiology, 2003.



**Figure 8 : Image de microscopie électronique à transmission représentant une coupe transversale de la poche flagellaire au cours de la duplication et ségrégation des corps basaux.** (A) Phase G1 ; (B, C et D) Phase S : élongation du nouveau flagelle. Légende : F = flagelle, OF = ancien flagelle (old flagellum), NF = flagelle néo-synthétisé (new flagellum), FP = poche flagellaire (flagellar pocket), BB = corps basal (basal body), PBB = corps basal immature (pro-basal body). Barre d'échelle = 200nm. D'après Lacomble *et al.*, Journal of Cell Science, 2010.

Le cycle de division de la forme procyclique est le plus étudié, cette forme du parasite étant plus facilement cultivable, elle est couramment utilisée comme modèle d'étude <sup>[32]</sup>. Ce cycle de division se déroule en 8-9 heures. Il englobe la division nucléaire et celle du kinétoplaste, ces deux évènements n'étant pas orchestrés simultanément <sup>[31, 32]</sup> (Figure 7). Généralement chez les eucaryotes, le cycle de division cellulaire comporte 4 phases, notées G0/G1, S G2 et M <sup>[33]</sup>. Il est régulé par de nombreuses cyclines, kinases et phosphatases <sup>[31, 32]</sup>. En fin de phase G0/G1, les cellules notées 1K1N (un kinétoplaste et un noyau) se préparent pour la duplication de leur matériel qui survient en S et G2. Elles se divisent ensuite pendant la phase M. Toutefois chez *T. brucei*, on distingue en parallèle deux cycles de division, l'un relatif au noyau et l'autre relatif au kinétoplaste. Pour simplifier, les phases citées seront relatives à la division nucléaire. L'initiation de la division cellulaire est régulée par la cycline CYC2 ainsi que les kinases CRK1 et CRK2. L'absence de ces régulateurs maintient les cellules en phase G1 <sup>[32]</sup>. Le premier évènement marquant la division cellulaire est l'élongation et la maturation du corps basal immature via le recrutement de  $\gamma$ -tubuline, de *TbCentrines* <sup>[34]</sup> ainsi que l'action de régulateurs tel que NRKC <sup>[35]</sup> (NIMA related kinase) et *TbPLK* <sup>[36, 37, 38]</sup> (Polo-like kinase). Parallèlement un nouveau quartet de microtubule associé à ce corps basal est généré. Ces évènements interviennent à 0.41 unité du cycle (1 unité représente 1 cycle de division) et marquent la fin de la phase G1. Il faut noter qu'au cours de cette période, à 0.37 unité du cycle la duplication du kinétoplaste débute. Après la duplication du corps basal, on observe l'initiation de l'élongation du nouveau flagelle ainsi que la duplication de l'appareil de Golgi. La duplication et ségrégation du Golgi nécessite la présence de *TbCentrine2*, localisée dans une structure en bi-lobe (bilobe) dont le lobe distal est au contact du Golgi <sup>[39]</sup>. La ségrégation des corps basaux, kinétoplastes et Golgi se fait en parallèle. Récemment, des travaux de microscopie électronique ont montré que la ségrégation des corps basaux est précédée d'un mouvement de translation du corps basal néoformé, du côté antérieur vers le côté postérieur <sup>[40]</sup> (Figure 8). A la suite de ce mécanisme, l'ancien corps basal se retrouve positionné du côté antérieur proche du noyau. Ce mouvement de corps basal pourrait également permettre de générer deux poches flagellaires qui se sépareraient durant la ségrégation des corps basaux. A ce stade, les cellules obtenues sont notées 2K1N, soit comportant deux kinétoplastes et un noyau. Les cellules alors en phase S, engagent la réplication de leur ADN nucléaire. L'élongation du flagelle néoformé se poursuit le long de l'ancien flagelle via un lien appelé « flagellar connector » (connecteur flagellaire) <sup>[41, 42]</sup>. Cette connexion permet de guider l'élongation du nouveau flagelle. Elle est également impliquée dans la mise en place de la FAZ associée à ce flagelle. Les cellules entrent ensuite en phase G2, où l'intervention du complexe régulateur CRK3/CYC6 induit la transition vers la phase M du cycle, soit la mitose.

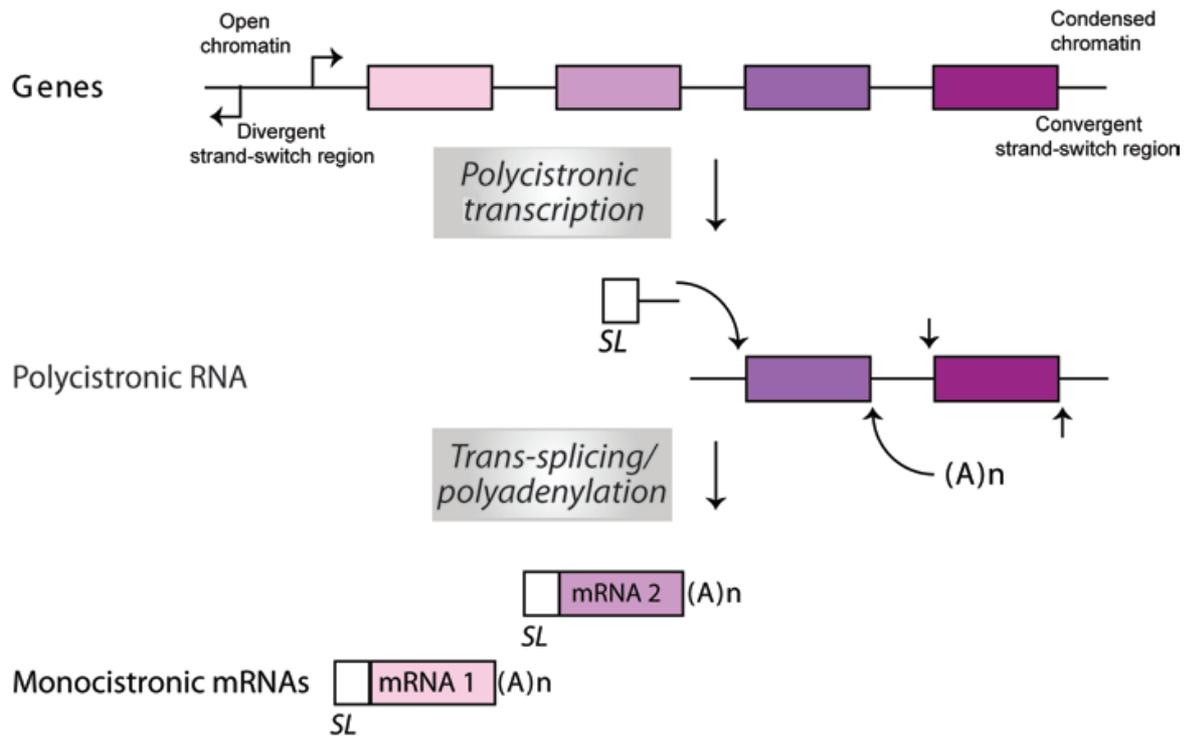
Chez les trypanosomes, contrairement aux organismes eucaryotes mammifères <sup>[33]</sup>, la mitose s'effectue sans disruption de l'enveloppe nucléaire <sup>[43]</sup>. Les cellules ayant effectuées leur mitose sont désignées 2K2N. A ce stade, tous les organites cellulaires ont été dupliqués. L'étude des régulations de ce cycle montre que chez la forme procyclique du parasite contrairement aux formes sanguines, il n'existe pas de point contrôle permettant de réguler la cytokinèse (séparation des cellules) en cas d'inhibition de la mitose. De plus, l'inhibition de la mitose n'inhibe pas la duplication et la ségrégation des kinétoplastes. Ce phénomène induit alors la formation après cytokinèse, de cellules non-prolifératives sans noyau comportant un kinétoplaste. Elles sont appelées zoïdes (1K0N). Peu de choses sont connues sur les conditions d'initiation et la régulation de la cytokinèse chez le parasite. De récentes études auraient permis d'identifier la kinase *TbAUK* (Aurora-like kinase) comme régulateur de l'initiation de la cytokinèse <sup>[32, 44]</sup>. Cette cytokinèse débute à l'extrémité antérieure de la cellule entre les deux flagelles présents. La détermination du site de cytokinèse engagerait des facteurs moléculaires liés au flagelle et à la FAZ. Certains travaux suggèrent que la longueur de la FAZ déterminerait le point de clivage engageant la cytokinèse <sup>[31]</sup>. Après cytokinèse, on obtient deux cellules 1K1N. Ce cycle assure la prolifération cellulaire du parasite.

## **B. Organisation cellulaire**

### **1. Expression génétique**

*T. brucei* comporte deux organites renfermant du matériel génétique : le noyau et le kinétoplaste. C'est un organisme diploïde dont le génome nucléaire comporte 11 chromosomes, plusieurs chromosomes intermédiaires et une centaine de mini-chromosomes <sup>[45]</sup>. Les 11 chromosomes ont été entièrement séquencés par Berriman *et al.* en 2005 <sup>[46]</sup> ; ce génome comprend 26 millions de paires de bases codant pour un peu moins de 10000 gènes. Ces gènes organisés en unités polycistroniques (transcription de plusieurs gènes, 10 à 100 sur un même transcrite d'ARN) sont majoritairement transcrits par l'ARN polymérase II <sup>[45, 47]</sup>. Elle est également impliquée dans la transcription de la coiffe de 39 nucléotides permettant la maturation des ARN messagers, cette coiffe est appelée séquence SL (Splice Leader) <sup>[47]</sup>. L'ARN polymérase I transcrit les messagers des antigènes de surface (VSG et procycline) ainsi que des sous-unités d'ARN ribosomiaux. L'ARN polymérase III transcrit certaines sous-unités d'ARN ribosomiaux ainsi que les ARN de transfert.

Contrairement à la plupart des eucaryotes, il existe très peu d'introns dans le génome de *T. brucei* <sup>[47, 48]</sup>. A ce jour, des introns ont été identifiés chez deux gènes, ceux-ci sont soumis au mécanisme d'épissage en *cis* <sup>[48]</sup>.



**Figure 9: Représentation schématique des mécanismes de *trans*-épissage (ajout d'une coiffe de 39 nucléotides en 5') et poly-adiénylation (ajout d'une queue poly-A en 3') qui permettent la maturation des ARN messagers chez *T. brucei*. D'après De Gaudenzi *et al*, Essays in Biochemistry, 2011.**

Les gènes présents dans une même unité de transcription de fonctions diverses et sont donc transcrits avec le même niveau d'expression. Cette unité polycistronique est clivée en plusieurs unités monocistroniques (1 gène par transcrit) et subissent différents mécanismes de maturation. En effet, suite au trans-épissage (ajout d'une coiffe de 39 nucléotide à l'extrémité 5' des ARN messagers) et à la poly-adénylation (ajout d'une queue poly-A, soit de plusieurs résidus adénosine à l'extrémité 3' des ARNm) de ces transcrits monocistroniques, des ARNm matures sont générés (Figure 9). Ces ARNm comportent une séquence codante (séquence traduite en protéine) encadrée de régions non-codantes appelée 5'- et 3'-UTR (Untranslated region) impliquées dans la régulation de la stabilité des messagers. Leur stabilité joue un rôle dans la régulation du niveau d'expression de ces ARNm, en effet les ARNm matures issus d'une même unité de transcription présentent différents niveaux d'expression, ceux-ci pouvant également changer selon les stades de développement du parasite <sup>[47, 48, 49]</sup>. De plus certains travaux ont montré que le niveau d'expression des ARNm et celui des protéines associées ne sont pas toujours corrélés <sup>[49, 50]</sup>, impliquant une régulation traductionnelle contrôlant les niveaux d'expression des différentes protéines. Ce type d'organisation est également présent chez *T. cruzi* et les leishmanies où on observe la présence de clusters de gènes relativement conservés chez les différentes espèces. Ce fait se traduit par une forte conservation de la synténie (environnement génétique) entre ces espèces <sup>[51]</sup>.

Le génome mitochondrial, contenu dans le kinétoplaste, est réparti dans des milliers de molécules d'ADN circulaire compactées <sup>[6]</sup>. On distingue deux types d'anneaux d'ADN au sein du kinétoplaste appelés maxicercles (20-40kb) et minicercles (0.5-2.5kb). Les maxicercles codent pour des sous-unités d'ARN ribosomiaux (ARNr) et les sous-unités du complexe respiratoire présent dans la mitochondrie. Les minicercles permettent de générer des ARN-guide qui interviennent dans « l'editing » des ARNm présents dans la mitochondrie <sup>[52, 53]</sup>. L'editing est un processus permettant l'ajout ou la suppression de plusieurs résidus uridine aux ARN entraînant la maturation de ceux-ci en ARNm traductibles.

*T. brucei* est un modèle d'étude offrant des possibilités d'études fonctionnelles par méthodes de génétique inverse, telles que l'ARN interférence ou le knock-out de gène <sup>[54]</sup>.

## **2. Antigène de surface**

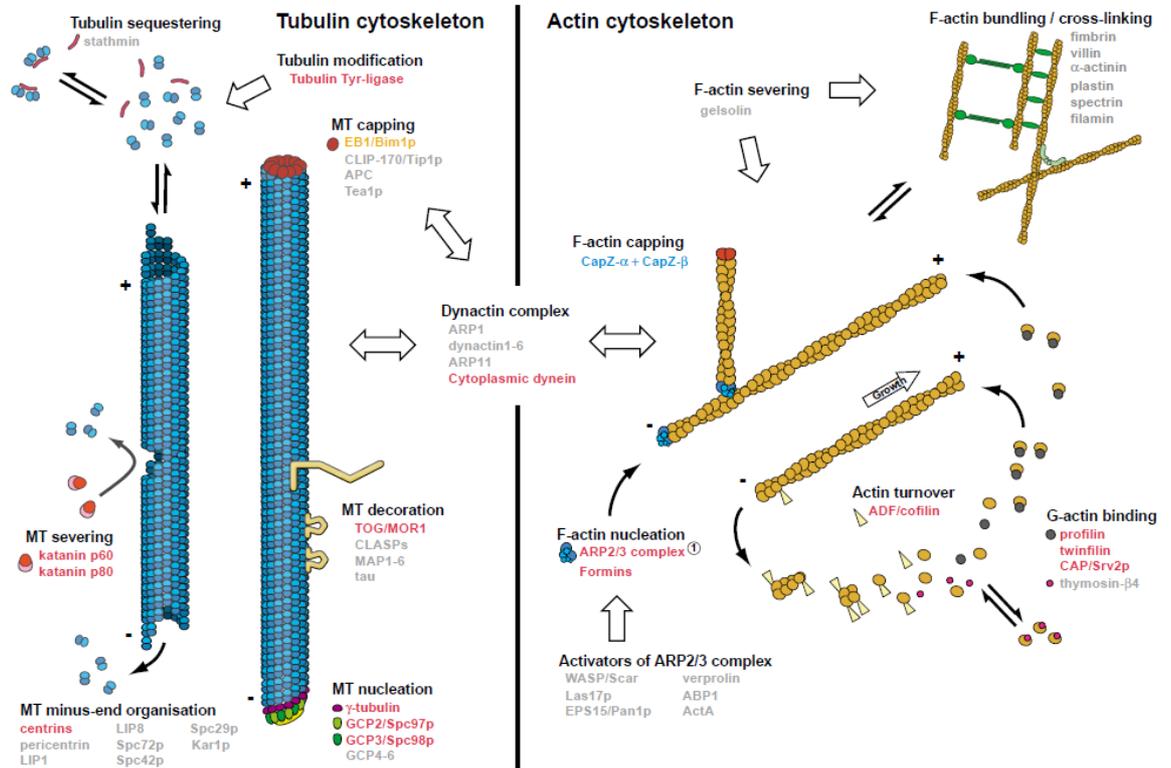
### **a) Procycline**

La procycline est une glycoprotéine présente en  $5.10^6$  copies à la surface des formes procycliques et épimastigotes (chez l'insecte vecteur).

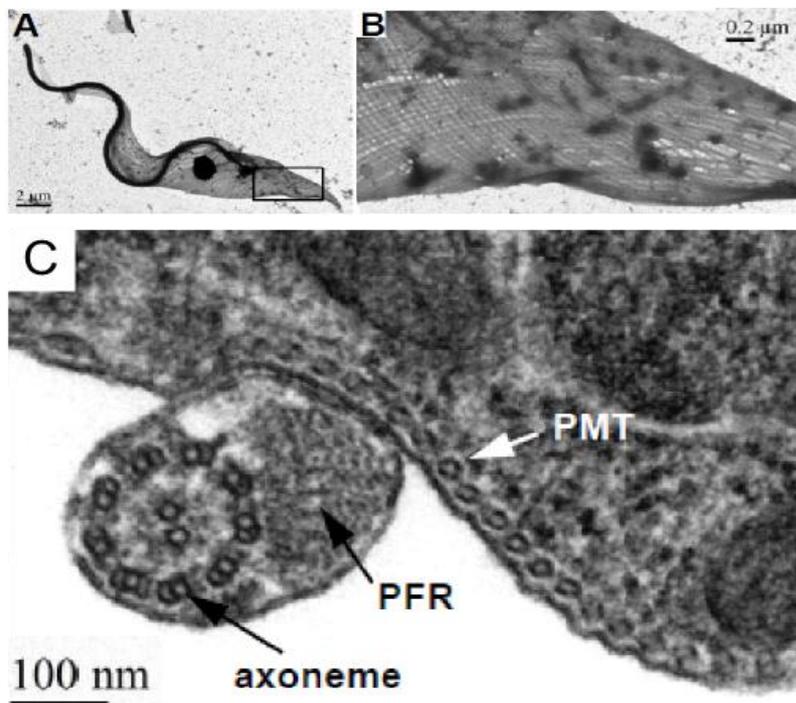
On distingue 2 formes de procycline : l'une possédant des répétitions du dipeptide « acide glutamique-proline » ou EP et l'autre des répétitions du penta-peptide « glycine-proline - 2 acide glutamiques - thréonine » ou GPEET. Il existe 3 gènes codant pour la forme EP de la procycline et 1 gène codant pour la forme GPEET <sup>[55]</sup>. Ces gènes seraient transcrits par l'ARN polymérase I. A la surface cellulaire, il y a co-expression des formes EP et GPEET rattachées à la membrane *via* une ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) <sup>[56]</sup>. L'ancre GPI est une molécule complexe comprenant un résidu lipidique capable de s'insérer dans la membrane (phosphatidyl-inositol) lié à un résidu osidique. La fonction de ce manteau de procycline demeure encore inconnue, mais plusieurs hypothèses décrivent un rôle protecteur vis-à-vis des enzymes digestives de la mouche <sup>[55]</sup>.

### **b) VSG**

Les VSGs (Variant Surface Glycoproteins), identifiées en 1990 par Georges Cross <sup>[57]</sup>, sont des molécules très immunogènes (capables de provoquer une réaction immunitaire) qui recouvrent entièrement la surface des formes sanguines et métacycliques du parasite (membrane plasmique et membrane flagellaire). Ce sont les molécules les plus abondantes présentes à la surface cellulaire, elles constituent un manteau moléculaire autour de la cellule <sup>[58]</sup>. Ce manteau comporte environ 10 millions de copies d'un même variant VSG. Les VSG sont des homodimères insérés dans la membrane *via* une ancre GPI. Ce lien permet un ancrage de la protéine à la membrane *via* le phosphatidyl-inositol (PI). Les VSG comportent entre 400 et 450 acides aminés et sont liés en C-terminal au résidu GPI <sup>[56]</sup>. Le pool de VSG présent à la surface cellulaire est entièrement recyclé toutes les 12 minutes environ <sup>[59]</sup>. Ce recyclage est impliqué dans l'échappement du parasite au système immunitaire de l'hôte, puisqu'il permet d'internaliser les complexes VSG-Anticorps et de redistribuer des VSG « libres » à la surface cellulaire <sup>[59]</sup>. Néanmoins ce phénomène seul ne suffit pas à mettre en échec la réponse immunitaire de l'hôte médiée par le complément. Un autre mécanisme permet d'assurer la survie du parasite chez l'hôte mammifère. En effet, *T. brucei* peut exprimer différents variants VSG. Le parasite possède plus de 1500 gènes et pseudogènes (1000 gènes présents sur les méga-chromosomes et plus de 500 sur les chromosomes intermédiaires et mini-chromosomes) <sup>[60, 61]</sup> codant pour des variants VSG. Il a également la capacité de moduler son génome afin de créer une nouvelle mosaïque de VSG. Un seul variant VSG est exprimé à la fois, à la surface de la cellule. Les gènes *VSG* sont transcrits par l'ARN polymérase I et sont fortement exprimés dans la cellule (VSG représente environ 5-10% des protéines cellulaires totales) <sup>[47, 61]</sup>.



**Figure 10: Schématisation de l'organisation et la régulation des cytosquelettes de microtubules (gauche) et d'actines (droite) chez les eucaryotes.** Les microtubules sont composés d' $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline organisés en protofilaments. Le cytosquelette d'actine est formé par des monomères de F-actine. Le schéma répertorie les principales protéines impliquées dans la régulation et la formation de ces différents réseaux. Les gènes codant pour les protéines marquées en gris n'ont pas d'homologues chez *T. brucei*, *T. cruzi* et *L. major*. Ceux écrit en rouge sont présents chez les 3 parasites. En orange, présents chez *T. cruzi* et *T. brucei*. En bleu sont les gènes présents uniquement chez *T. cruzi*. Publiée par Berriman *et al.*, Science, 2005.



**Figure 11: Images du cytosquelette de *T. brucei*, observées au microscope électronique à transmission.** (A et B) : Cytosquelette du parasite, représente principalement par le corset de microtubules sous-pelliculaires. (C) : Image d'une coupe ultra-fine du parasite (coupe transversale) permettant d'observer le corset de microtubules sous-pelliculaires (PMT). Publiée par Hu *et al.*, Journal of Cell Science, 2012.

### 3. Cytosquelette

Généralement, chez les eucaryotes le cytosquelette se compose de 3 principaux réseaux protéiques : les microtubules <sup>[62]</sup>, les filaments d'actine <sup>[63]</sup> et les filaments intermédiaires <sup>[64]</sup>. Toutefois, le cytosquelette de *T. brucei* ne comporte pas de filaments intermédiaires. L'analyse du génome de cet organisme a permis d'identifier des homologues de protéines intervenant dans la régulation et la formation des réseaux de microtubules <sup>[46]</sup>. De plus, des homologues d'actine et de protéines intervenant dans la nucléation des filaments d'actine ont été identifiés chez le parasite. Néanmoins, il n'existe pas d'homologues des protéines régulant la formation de ces filaments, ce constat expliquerait pourquoi aucun filament d'actine n'a été identifié chez *T. brucei* <sup>[65]</sup> (Figure 10).

#### c) Corset sous-pelliculaire de microtubules

Chez *T. brucei*, il existe un réseau dense de plus de 100 microtubules (espace entre chaque microtubule d'environ 18-22 nm) sous la membrane plasmique de la cellule, il est appelé corset sous-pelliculaire de microtubules (Figure 11). Ces microtubules maintiennent des liens physiques entre eux et avec la membrane plasmique <sup>[65, 66]</sup>. Seule la membrane de la poche flagellaire est exempte de ce réseau permettant son accessibilité au trafic vésiculaire <sup>[66]</sup>.

##### (1) Microtubules

Les microtubules, composés d'hétérodimères d' $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline <sup>[62]</sup>, définissent la forme et la taille de la cellule. Les hétérodimères de tubulines s'assemblent en proto-filaments et s'organisent en microtubules de 13 proto-filaments (Figure 10). Le parasite possède de multiples copies (15 - 20 copies) des gènes codant pour l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -tubuline organisées en cluster <sup>[46, 258, 259]</sup>. Des modifications post-traductionnelles ont été observées sur ces microtubules, notamment la glutamylation des résidus  $\alpha$  et  $\beta$ , ainsi que leur détyrosinylation <sup>[67]</sup>. Ils sont orientés : l'extrémité négative (-), du côté antérieur de la cellule et l'extrémité positive (+) vers sa partie postérieure. L'extrémité (+) définit la région active de polymérisation des microtubules. Ces microtubules nouvellement formés sont tyrosinylés. Cette modification post-traductionnelle est considérée comme un marqueur des microtubules néoformés <sup>[65, 67]</sup>.

##### (2) MAPs

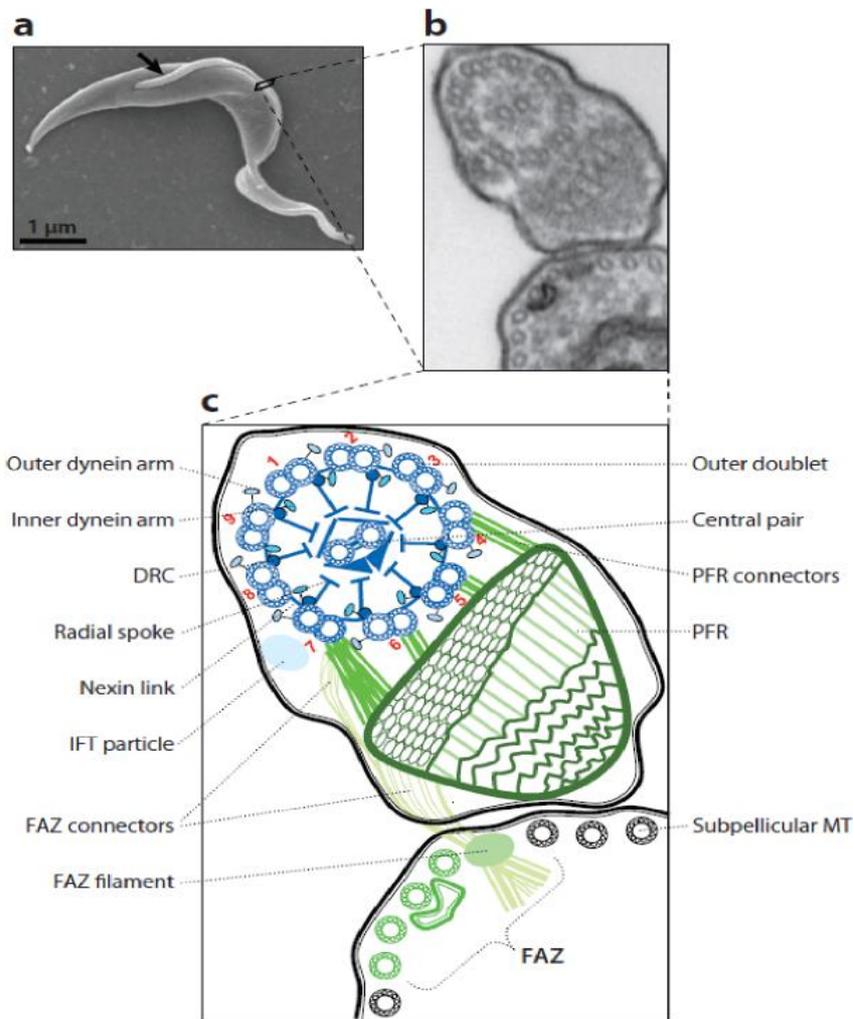
De précédentes études réalisées sur le réseau de microtubule de *T. brucei* ont permis d'identifier des protéines capables de s'associer aux microtubules de ce corset, elles sont désignées comme MAP (Microtubule Associated Proteins) potentielles <sup>[65, 66]</sup>.

On distingue différents types de MAP : les MAP dites structurales, des MAP à domaine moteur <sup>[68, 69]</sup> (kinésine et dynéine). Ces protéines joueraient un rôle dans le lien entre les microtubules du corset ainsi qu'entre le corset de microtubules et la membrane plasmique <sup>[65, 66]</sup>. A ce jour 7 MAP ont été identifiées au niveau du corset :

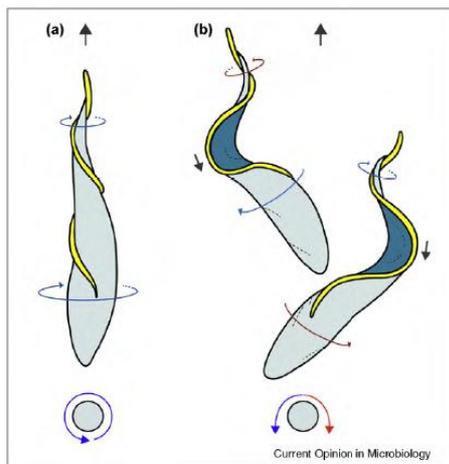
- L'autoantigène I/6 est une protéine de 33 kDa qui contient un domaine de fixation au calcium de type EF-Hand identifié comme non-fonctionnel, ainsi que 6 régions répétées de 8 acides aminés (n° d'accèsion Trityp Tb927.7.3440). Un immunomarquage en microscopie électronique localise la protéine au niveau des interconnexions entre les microtubules du corset <sup>[70]</sup>.
- WCB (Tb927.7.3550) est une protéine de 140 kDa qui possède un domaine C2 (domaine impliqué dans la liaison à la membrane) en N-terminal et 5 répétitions de 32 acides aminés en C-terminal qui seraient impliquées dans la fixation aux microtubules. Cette protéine est localisée entre la partie interne de la membrane plasmique et le corset sous-pelliculaire, elle pourrait être impliquée de façon directe ou indirecte dans la connexion entre la membrane plasmique et les microtubules du corset <sup>[71]</sup>.
- MARP-1 (Tb927.10.10360) et MARP-2 (Tb927.10.10280). Ces deux protéines contiennent plusieurs domaines répétés de 38 acides aminés, ainsi qu'un domaine de fixation aux microtubules situé dans une région sans répétition en C-terminal de la protéine. Ce domaine répété de 38 acides aminés représente un nouveau motif de fixation aux microtubules, différents de ceux décrits chez les MAP en système mammifère <sup>[72]</sup>.
- Gb4 (Tb09.160.1200) est une protéine associée exclusivement à l'extrémité postérieure des microtubules du corset sous-pelliculaire <sup>[73]</sup>. Son rôle n'est pas connu.
- CAP15 (Tb11.01.7880) et CAP17 (Tb11.01.3805) ont environ 49% d'identité et ne contiennent aucun domaine répété. Elles sont localisées au niveau du corset sous-pelliculaire de microtubules excepté à son extrémité postérieure. Exprimées en système mammifère, elles stabilisent les microtubules au froid et au nocodazole <sup>[74]</sup>. Chez le trypanosome, elles pourraient jouer un rôle dans la stabilisation des microtubules à leur extrémité (-).

#### **d) Actine**

Très peu de données sont connues sur l'implication de l'actine dans le cytosquelette de *T. brucei*.



**Figure 12: Schématisation de l'organisation du flagella de *T. brucei*.** (a) : Image du parasite observée au microscope à balayage. (b) : Image d'une coupe ultra-fine du flagelle du parasite, observée au microscope à transmission. (c) : Schéma montrant l'organisation du flagelle du parasite. L'axonème comprend 9 doublets périphériques de microtubules qui entourent une paire centrale de microtubule. Les doublets périphériques sont numérotés de 1 à 8. Les doublets 4 à 7 sont connectés à la PFR. La PFR est également connectée au corps cellulaire *via* la FAZ. Publiée par Ralston *et al.*, Current Opinion in Microbiology, 2009.



**Figure 13: Schématisation de modèles de motilité chez *T. brucei*.** Le parasite se déplace avec l'extrémité distale du flagelle vers l'avant. Le modèle (a) est le modèle classique décrit un mouvement de rotation du corps cellulaire dans le sens des aiguilles d'une montre, dépendant du flagelle. Le modèle (b) décrit un mouvement « bi-helical », le flagelle produit alternativement des mouvements de droite à gauche, puis de gauche à droite. Ces mouvements se propagent de l'extrémité distale du flagelle vers sa base. Publiée par Kent L. Hill, Current Opinion in Microbiology, 2010.

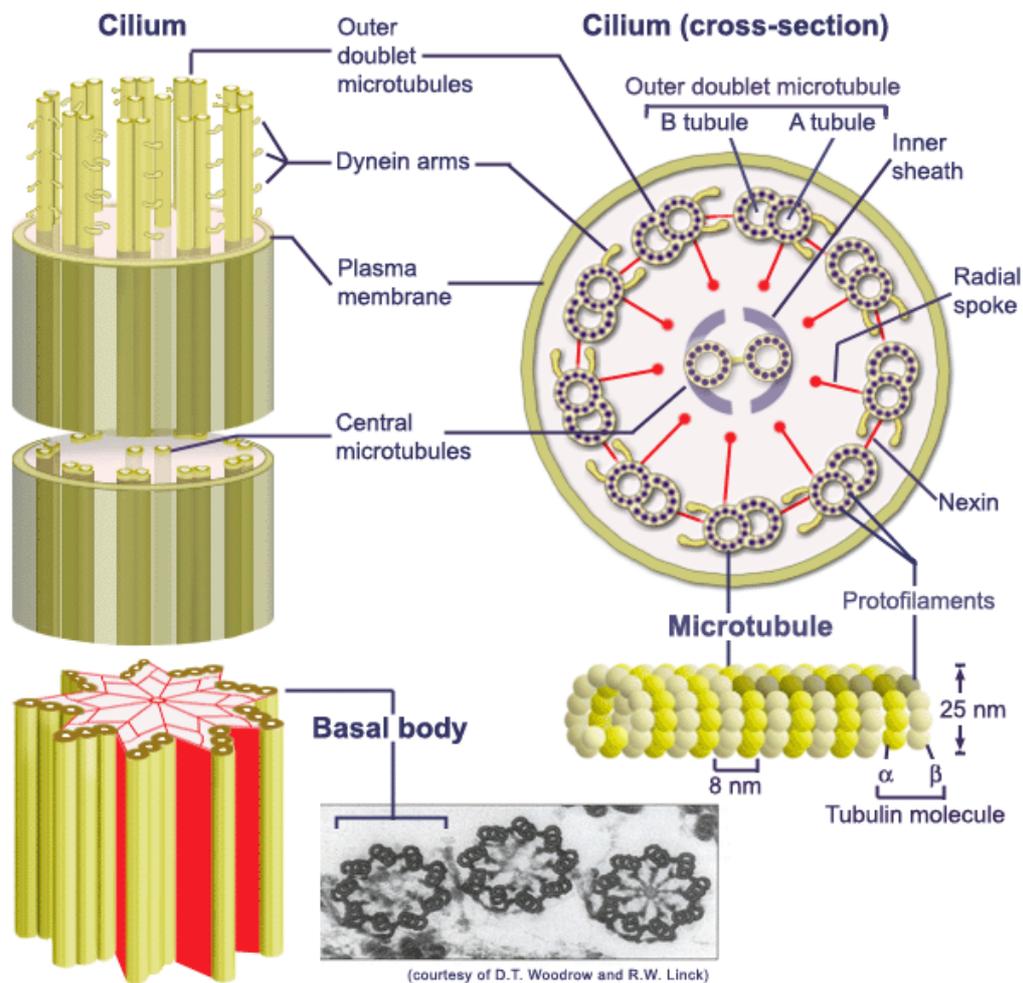
Chez le parasite, il existe 10 gènes et pseudogènes d'actine, certaines de ces actines ont été localisées au flagelle et à la poche flagellaire (où elle interviendrait dans le trafic vésiculaire). Chez la forme sanguine du parasite, l'actine localisée à la poche flagellaire est essentielle à l'établissement du phénomène d'endocytose ainsi qu'à la survie de cet organisme [121]. A ce jour, aucune forme d'actine filamenteuse n'a pu être observée chez cet organisme [66].

### e) **Flagelle**

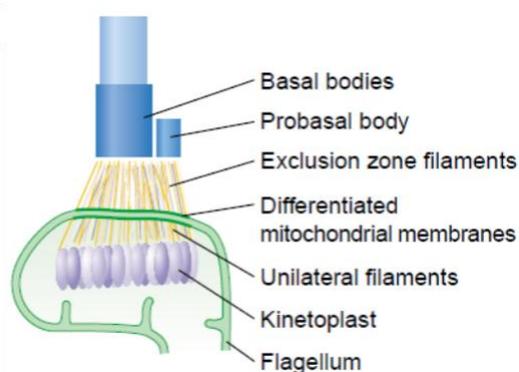
*T. brucei* est un des organismes modèles utilisé pour étudier le protéome flagellaire, ainsi que la régulation de la formation de l'axonème du flagelle [66, 75]. Chez le parasite, le flagelle est constitué de l'axonème et d'une structure extra-axonémale particulière, caractéristique des Kinétoplastidés, appelée Paraflagellar Rod ou PFR [75] (Figure 12). Le flagelle prend son origine au niveau du corps basal, émerge de la poche flagellaire de la cellule et reste connecté au corps cellulaire *via* la zone d'attachement flagellaire ou FAZ [66] (Figure 12). Il est nécessaire à la motilité cellulaire, les battements du flagelle qui prennent origine de l'extrémité distale vers la base du flagelle, définissent la direction du mouvement cellulaire [76]. En effet, ce mécanisme (inverse de celui de la plupart des organismes flagellés) oriente le déplacement de la cellule de l'extrémité postérieure vers l'extrémité antérieure, l'extrémité du flagelle définissant la tête du mouvement [76, 77] (Figure 13). *In vitro*, ce mécanisme, modulé par le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) permet à la cellule de parcourir une distance de 25 à 30  $\mu\text{m}$  en 1 seconde. Le flagelle intervient également dans l'attachement du parasite à la surface des épithéliums de ces hôtes, notamment chez l'insecte où il s'attache aux glandes salivaires. Il pourrait également jouer un rôle de senseur des modifications de l'environnement [75, 78].

#### (1) **Corps basal**

Le corps basal est formé de 9 triplets de microtubules organisés en cylindre [79, 66] (Figure 14). Chez les eucaryotes supérieurs, cette structure de 9 triplets de microtubules présente par paire définit le centre organisateur des microtubules (MTOC) ou centrioles de la cellule. En cas de ciliogenèse, ces centrioles deviennent des corps basaux et sont à l'origine de la formation du cil [80]. Ces microtubules sont notés A, B et C : « A » est un microtubule complet, « B et C » sont incomplets. On distingue le corps basal mature à partir duquel l'axonème est assemblé et le corps basal immature qui subira une maturation lors de la division cellulaire pour donner naissance au nouvel axonème et nouveau flagelle [40]. La partie distale du corps basal mature est à l'origine de l'axonème du flagelle. La paire centrale de microtubules est nucléée *via* la  $\gamma$ -tubuline.



**Figure 14: Schématisation de la structure du corps basal et de l'axonème du flagelle.** Le corps basal est constitué de 9 triplets de microtubules organisés en cercle d'un diamètre d'environ  $\mu\text{m}$ . Il donne naissance aux 9 doublets de microtubules (notés microtubules A et B) entourant une paire centrale de microtubules, constituant l'axonème du flagelle. Au sein de cet axonème les doublets de microtubules périphériques sont connectés entre eux par la nexine. Chaque microtubule A est lié à des bras de dynéine. Ces microtubules émettent également des projections, appelées bras radiaux vers la paire centrale. <http://scienceblogs.com/transcript/2006/08/24/whats-inside-of-a-microtubule/>

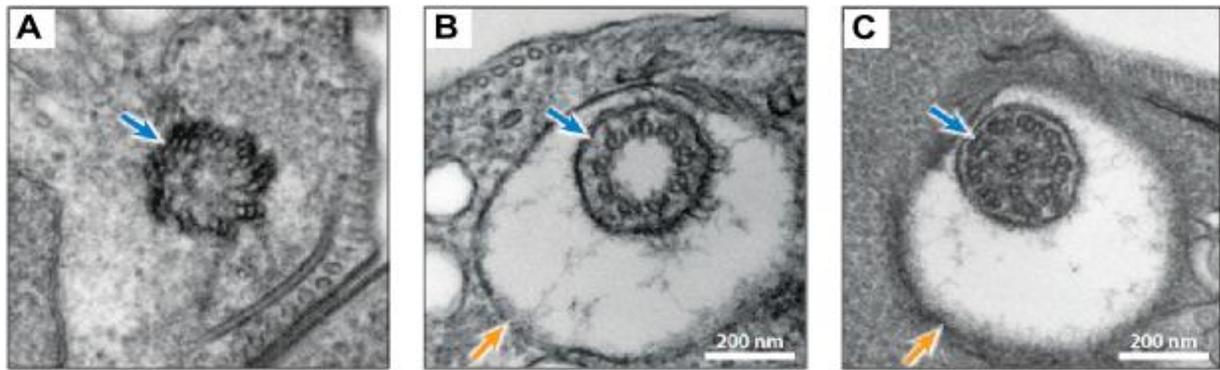


**Figure 15: Schéma de la connexion entre le corps basal mature et immature de *T. brucei* et le kinétoplast.** Le complexe d'attachement tripartite (TAC ou exclusion zone filaments) établit un lien entre le corps basal à son extrémité proximale et le kinétoplast. Publiée par Gull, Current Opinion in Microbiology, 2003.

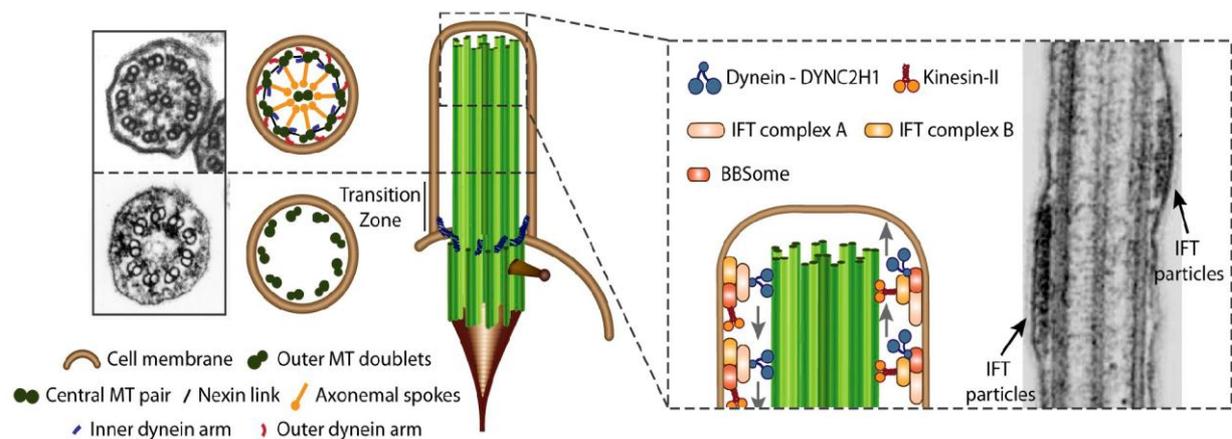
Les 9 doublets de microtubules périphériques de l'axonème sont générés à partir de deux microtubules de chaque triplet présent dans le corps basal <sup>[81]</sup>. Chez les eucaryotes supérieurs, le corps basal est connecté à la membrane ciliaire *via* des fibres de transition <sup>[82]</sup>. Ce lien permet d'ancrer le corps basal directement sous la membrane plasmique et il serait également impliqué dans le « docking » (l'ancrage) des particules d'IFT (Intraflagellar Transport) <sup>[82]</sup>. De façon différente chez *T. brucei*, à son extrémité proximale le corps basal est connecté au kinétoplaste de la cellule *via* un complexe d'attachement tripartite (TAC ou Tripartite attachment complex) <sup>[7, 83]</sup> (Figure 15). Cette connexion nécessite un lien entre le corps basal et la membrane externe de la mitochondrie, ce lien se poursuivant vers la membrane interne et vers le kinétoplaste. Ce lien très fort entre le corps basal et le kinétoplaste résiste à l'action de détergents neutres et au NaCl <sup>[84, 85]</sup>. Néanmoins, les molécules composant le complexe TAC sont peu connues. Seule la protéine p166 a été identifiée au sein de ce complexe, elle jouerait un rôle dans la ségrégation des kinétoplastes <sup>[83]</sup>.

## (2) Axonème

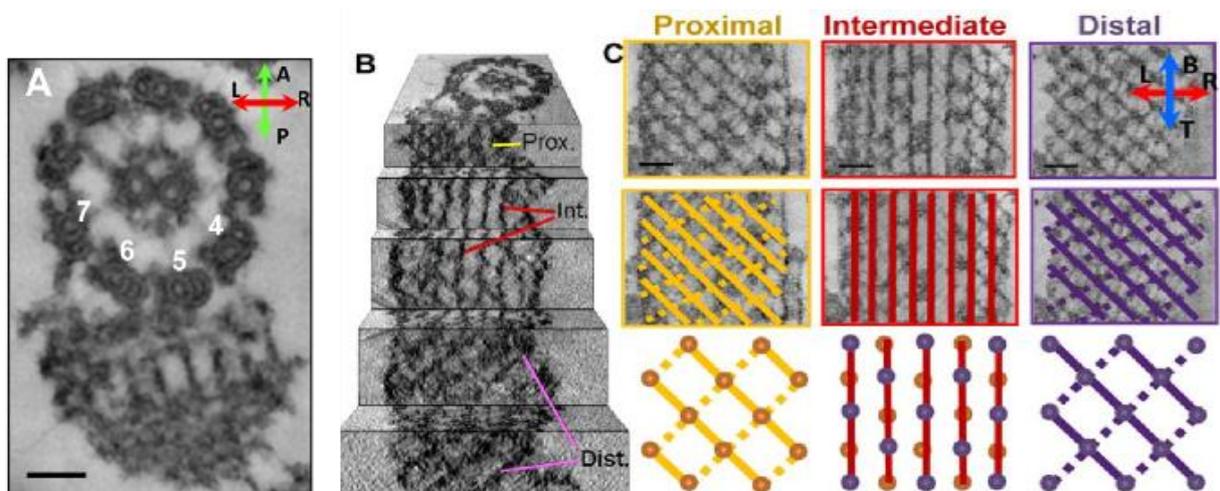
Formé d'un agencement de 9 doublets de microtubules numérotés de 1 à 9, entourant une paire centrale, l'axonème du flagelle de *T. brucei* comme celui des flagelles de spermatozoïdes et des cils motiles ou immotiles des cellules mammifères a une organisation notée « 9+2 » <sup>[75, 86]</sup>. La zone de transition définit la région du flagelle où à partir de deux microtubules des 9 triplets présents au corps basal, les 9 doublets de microtubules périphériques sont formés. A l'issue de cette zone, une paire centrale de microtubules est générée (Figure 16). Les microtubules de la paire centrale connectés *via* un pont, comportent chacun 13 proto-filaments (Figures 12 et 14). Les doublets de microtubules périphériques, connectés les uns aux autres *via* des ponts de nexine, comporte un microtubule « A » formé de 13 proto-filaments fusionné à un microtubule « B » composé de 11 proto-filaments <sup>[87, 88]</sup>. Le microtubule « A » projette en périphérie, deux structures appelées bras interne et externe de dynéine. Une autre projection, complexe de plus de 22 protéines, est dirigée vers la paire centrale de microtubule et est appelée bras radiaire (Figures 12 et 14). Ces structures sont liées à des dynéines (protéines motrices) et interviennent dans la motilité flagellaire. Les dynéines sont des complexes protéiques multimériques comprenant des chaînes lourdes, intermédiaires et légères. Ces complexes sont dotés d'une activité ATPase autorisant leur déplacement le long des microtubules et sont également capables de se lier à divers protéines appelées « cargo », permettant ainsi leur transport le long des microtubules <sup>[88]</sup>.



**Figure 16: Images de coupes ultra-fines du flagelle de *T. brucei*, observés au microscope électronique à transmission.** (A): Coupe transversale du corps basal mature ; (B): Coupe transversale de la zone de transition du flagelle. La flèche jaune désigne la poche flagellaire ; (C) : Coupe transversale de l'axonème du flagelle. Barre d'échelle = 200 nm. Publiée par Ralston *et al.*, The Annual Review of Microbiology, 2009.



**Figure 17: Schématisation du transport intra-flagellaire (IFT) chez *Chlamydomonas*.** La figure de droite montre des coupes transversales de cils motiles de cellules de la trachée, observées au microscope électronique à transmission. On observe l'organisation de la zone de transition ainsi que l'axonème du cil. A gauche, schématisation de l'IFT chez *Chlamydomonas*. Le transport antérograde associé à IFT-B, dépendant de la kinésine II (vers l'extrémité +) et le transport rétrograde associé à IFT-A, dépendant de la dynéine (vers l'extrémité -). Publiée par Carvalho-Santos *et al.*, JCB, 2011.



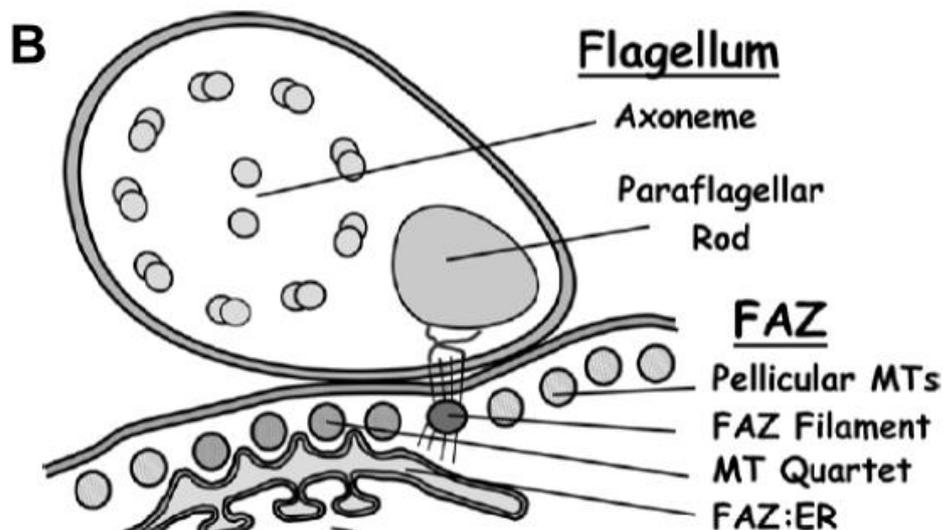
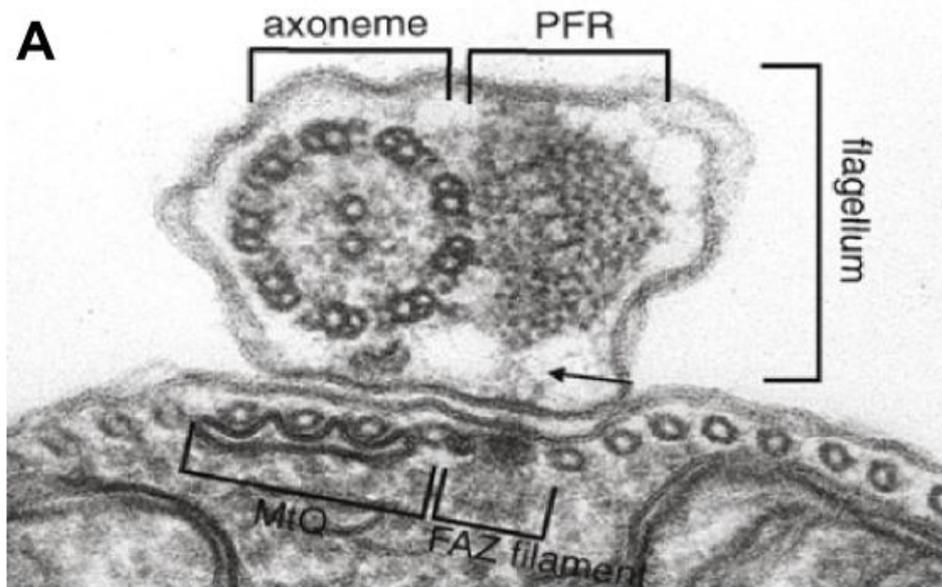
**Figure 18: Structure de la PFR chez *T. brucei*.** (A) Image d'une coupe ultra-fine du flagelle de *T. brucei*, observée au microscope électronique à transmission. Les doublets de microtubules périphériques 4 à 7 de l'axonème sont connectés à la PFR. Barre d'échelle=50 nm. (B) et (C) Tomographie de la structure des 3 sous-domaines (proximal, intermédiaire et distal) de la PFR. Les réseaux de filaments au sein des sous-domaines proximal et distal sont plus denses que celui présent dans le sous-domaine intermédiaire. Barre d'échelle=50 nm. Publiée par Hughes *et al.*, Plos One, 2012.

Dans l'axonème, les bras de dynéines sont impliqués dans le battement du flagelle en permettent le glissement des doublets de microtubules les uns par rapport aux autres, l'absence de ces complexes entraîne l'immobilité du flagelle <sup>[89]</sup>. De plus, récemment une nouvelle MAP nommée *TbSAXO* a été identifiée au niveau de l'axonème. Elle serait impliquée dans la motilité flagellaire via le lien qu'elle établit entre la PFR et l'axonème <sup>[90]</sup>. L'assemblage du flagelle dépend, comme chez plusieurs organismes eucaryotes, d'un transport intra-flagellaire bidirectionnel nommé IFT (Intraflagellar transport) <sup>[91-94]</sup>. Ce mécanisme, découvert en 1993 par Kozminski *et al.* <sup>[95]</sup> chez *Chlamydomonas*, engage des protéines à domaine moteur (kinésine II et dynéine cytoplasmique) capables de se déplacer de façon antérograde (vers l'extrémité (+) *via* la kinésine II) et rétrograde (vers l'extrémité (-) *via* la dynéine, le long des microtubules en transportant des particules d'IFT).

Ces particules d'IFT interviennent dans le transport des protéines nécessaires la formation de l'axonème et donc du flagelle <sup>[94]</sup>. Ce mécanisme est très conservé chez les organismes eucaryotes ciliés et/ou flagellés <sup>[91, 92, 93]</sup>, exception faite des parasites *Plasmodium* et des gamètes mâles de drosophile qui effectuent l'assemblage de leur flagelle dans leur cytoplasme sans le concours d'IFT <sup>[95, 96]</sup>. Deux types de complexes d'IFT ont été identifiés : IFT-A et IFT-B <sup>[91]</sup> (Figure 17). La plupart des travaux réalisés sur les IFT ont été effectués sur *Chlamydomonas* et *Caenorhabditis elegans*. Chez *Chlamydomonas*, le complexe IFT-A, composé de 6 protéines est impliqué dans le transport rétrograde. Le complexe IFT-B de 11 protéines est impliqué dans le transport antérograde <sup>[91]</sup>. Jusqu'à présent chez *T. brucei*, deux protéines ont été identifiées dans le complexe IFT-A : IFT122 - IFT140 et 6 protéines sont identifiées dans le complexe IFT-B : IFT20 – IFT52 – IFT57/55 – IFT80 – IFT88 – IFT172 <sup>[94]</sup>. Toutes ces protéines ont été identifiées et caractérisées grâce à leur homologie avec les protéines d'IFT de *Chlamydomonas*. L'absence d'IFT-A induit la formation d'un petit flagelle résultant de l'activité de l'IFT-B, mais dont l'élongation est restreinte à cause de l'inhibition du recyclage des particules *via* le transport rétrograde (IFT-A). A l'inverse, l'absence d'IFT-B inhibe la formation du flagelle <sup>[94]</sup>. Chez *T. brucei*, le transport de particules d'IFT a été observé sur un set particulier de microtubules : les doublets 3-4 et 7-8 <sup>[94]</sup>.

### (3) PFR ou « Paraflagellar rod »

Associée de façon stable à l'axonème *via* les doublets 4 à 7 (Figures 12 et 18), cette structure de 150 nm de diamètre, apparaît chez *T. brucei* à la sortie du flagelle de la poche flagellaire <sup>[75, 97]</sup>. La PFR est formée d'un complexe protéique dont les deux principaux constituants sont appelés PFR1 et PFR2 <sup>[98, 99]</sup>. Chacune de ces protéines est codée par un cluster de 4 gènes répétés présent sur les chromosomes 3 et 8, respectivement.

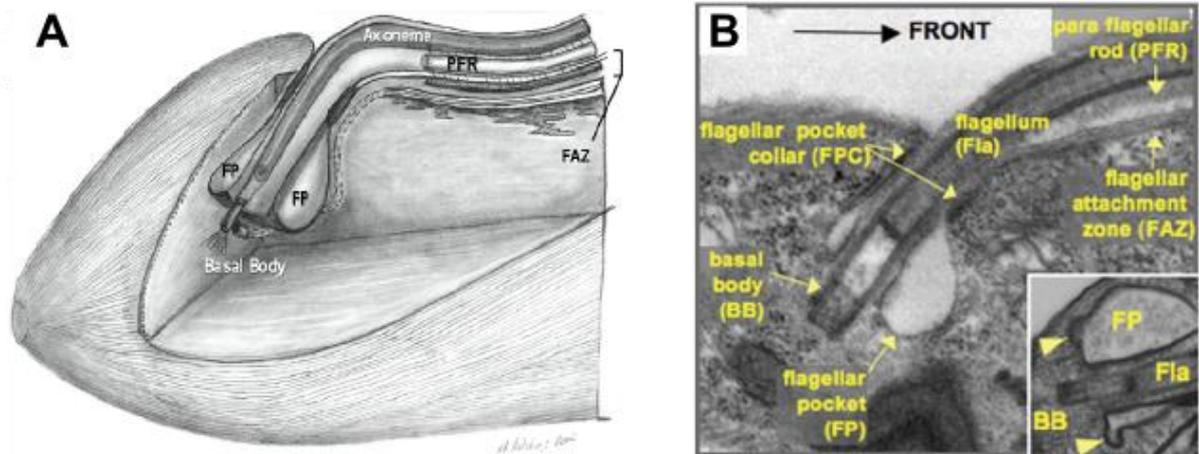


**Figure 19: Organisation de la zone d'attachement flagellaire (FAZ).** (A) : Image d'une coupe ultra-fine du flagelle (coupe transversale) chez *T. brucei*. Au sein du flagelle, l'axonème est lié à la PFR. La PFR est connectée au corps cellulaire via le filament FAZ. La FAZ comprend le filament FAZ ainsi que le quartet de microtubule. Publiée par Vaughan, *Current Opinion in Microbiology*, 2010. (B) Schématisation d'une coupe transversale du flagelle et de la FAZ de *T. brucei*. Le flagelle du parasite l'axonème et la PFR. Il est connecté au corps cellulaire par la FAZ (quartet de microtubules, filament FAZ, complexe FAZ/réticulum endoplasmique). Publiée par Sevova et Bangs, *Molecular Biology of the Cell*, 2009.

Ce complexe protéique comporte également des protéines impliquées dans la signalisation du  $\text{Ca}^{2+}$  telles que la calmoduline [75]. Aujourd'hui, on estime à plus de 40, le nombre de protéines constituant cette structure [98]. La PFR se définit en 3 sous-domaines dits proximal (proche de l'axonème), intermédiaire et distal (sous-domaine le plus éloigné de l'axonème) [97, 100] (Figure 18). Le sous domaine proximal est lié, *via* la FAZ au corps cellulaire. Des études fonctionnelles ont montrées son implication dans la motilité du flagelle et son rôle essentiel pour la survie du parasite. En effet, la diminution de l'expression de la protéine PFR2 chez *T. brucei* (forme sanguine) [99] entraîne une diminution de l'amplitude des battements flagellaires aboutissant à une perte de motilité ainsi qu'à une inhibition de la division cellulaire et la mort. Chez ces mutants, la structure de la PFR est considérablement altérée, seul le sous-domaine proximal est présent et il n'est plus lié à l'axonème du flagelle. Une étude comparable a été réalisée chez *L. mexicana* [101], où le gène codant pour PFR1 a été éliminé et chez ces mutants aucun des sous-domaines de la PFR n'est assemblé. De récents travaux montrent que l'assemblage correct de la PFR le long de l'axonème nécessite l'intervention de kinésines [102].

#### **f) FAZ**

La zone d'attachement flagellaire ou FAZ est une structure du cytosquelette intervenant dans l'attachement du flagelle *via* la PFR, le long du corps cellulaire du parasite [75]. Elle jouerait également un rôle dans la mise en place de la cytokinèse pendant la division cellulaire. L'absence de FAZ entraîne un détachement du flagelle et une inhibition de la croissance cellulaire [103, 104]. Cette structure fait intervenir plusieurs protéines et complexes protéiques présents au niveau cellulaire et flagellaire (Figure 19). FAZ1, protéine de 88 kDa a été identifiée par l'équipe du Pr. K. Gull en 2008 [65, 103]. Elle a été localisée au niveau d'un constituant de la FAZ appelé filament FAZ. Ce filament est situé sous la membrane plasmique et sous le flagelle avec lequel il est connecté (Figure 19B). Des études fonctionnelles menées sur cette protéine montrent son rôle dans la formation de la FAZ et son implication dans l'attachement du flagelle au corps cellulaire [103]. La zone d'attachement comporte également un complexe appelé « FAZ-ER », formé de 4 microtubules dont la polarité est l'inverse de celle du corset et identique à celle de l'axonème (soit l'extrémité (+) du côté antérieur de la cellule et l'extrémité (-) du côté postérieur) [105]. Ce quartet de microtubule est lié à du réticulum endoplasmique rugueux [106], il prend naissance à proximité du corps basal immature, contourne la FP et se positionne sous la membrane plasmique le long du flagelle [75]. En microscopie électronique, sur une coupe transversale de la cellule, ce quartet de microtubules est placé à proximité immédiate du filament FAZ (Figure 19A).



**Figure 20: Structure de la poche flagellaire de *T. brucei*.** (A) : Dessin représentant l'organisation de la poche flagellaire à l'extrémité postérieure de la cellule. Légende : FP = poche flagellaire ; PFR = Para Flagellar rod ; FAZ = Zone d'attachement flagellaire ; axonème ; corps basal. Publiée par Oberholzer *et al.*, 2011. (B) : Image d'une coupe ultra-fine montrant la poche flagellaire chez *T. brucei*, observée au microscope électronique à transmission. L'image principale représente une coupe longitudinale de la FP chez la forme procyclique. L'encart à droite est une coupe réalisée chez la forme sanguine, les têtes de flèche désigne la formation de vésicules d'endocytoses. Publiée par Ghossoub *et al.*, Biology of the Cell, 2011.

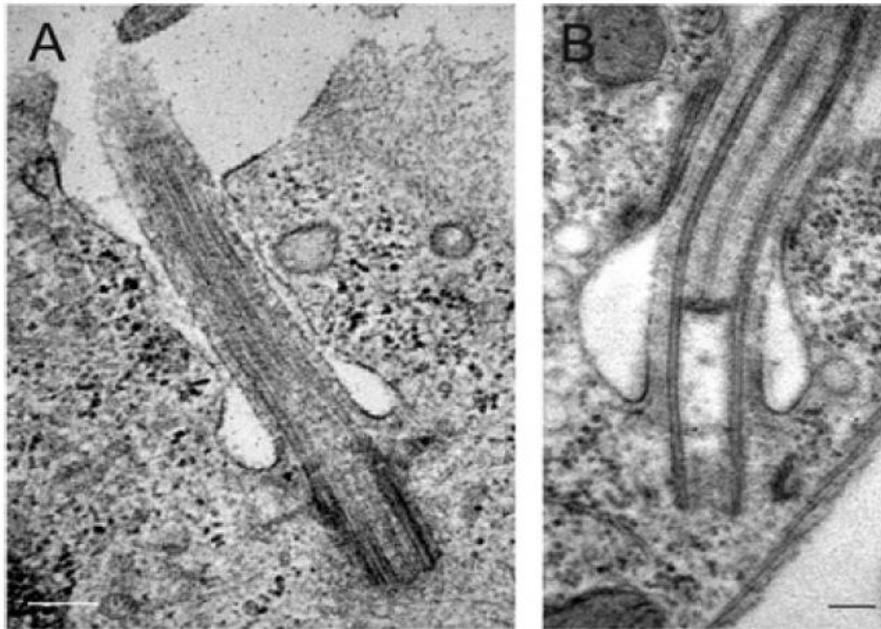
La protéine CC2D, protéine à domaine coiled-coil (domaine impliqué dans les interactions protéine-protéine <sup>[107]</sup>) et domaine C2 (domaine fixant le Ca<sup>2+</sup> impliqué dans les interactions membrane-protéine <sup>[108]</sup>), a été identifiée par Zhou *et al.* en 2011 <sup>[109]</sup> dans la FAZ. CC2D est localisée à la jonction entre la FAZ-ER et le filament FAZ. Cette protéine pourrait faire le lien entre ces deux constituants de la zone d'attachement flagellaire. Un autre constituant de la FAZ, identifiée en 2002 <sup>[104]</sup> est impliqué dans l'attachement de la membrane flagellaire au corps cellulaire. C'est la protéine FLA1 ou « Flagellum adhesion glycoprotein », une protéine transmembranaire localisée à la jonction entre la membrane plasmique et celle du flagelle. En immunofluorescence, elle est également observée au niveau de la poche flagellaire.

A ce jour, tous les constituants de la zone d'attachement flagellaire n'ont pas encore été identifiés, notamment ceux intervenant au niveau flagellaire autorisant le lien entre la PFR et le filament FAZ.

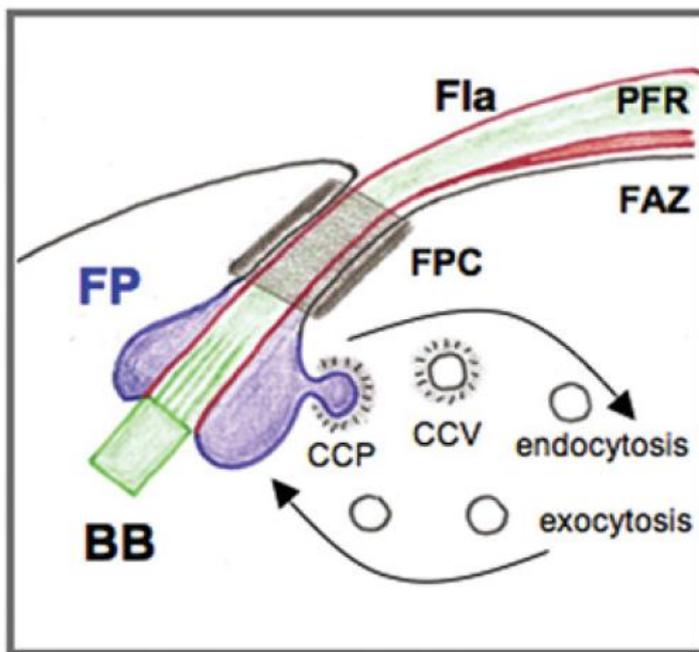
#### **4. Poche flagellaire (FP) – Trafic intracellulaire**

La poche flagellaire résulte de l'invagination de la membrane plasmique autour de la base proximale du flagelle <sup>[110]</sup> (Figure 20). La membrane de la poche flagellaire représente 0.4 % de la surface cellulaire totale et c'est la seule surface membranaire dépourvue du réseau de microtubules sous-pelliculaires autorisant ainsi de nombreux mécanismes d'échange moléculaire et vésiculaire <sup>[66, 110]</sup>. Cette structure se distingue par deux sous-domaines membranaires, la membrane de la poche flagellaire et la membrane flagellaire, dont la composition et la dynamique sont différentes. La membrane flagellaire est enrichie en stérols, lipides notamment au niveau de micro-domaines appelés « raft lipidique » intervenant dans la localisation de molécules <sup>[111]</sup>. De plus, le protéome de cette membrane est différent de celui de la membrane plasmique ou de la membrane de la FP <sup>[111, 112]</sup>. En effet, on note la présence au sein de la membrane de la FP de nombreux récepteurs membranaires (récepteur de la transferrine, récepteur potentiel de lipoprotéine) dont la localisation est restreinte à cette zone. Une récente étude a également montré la localisation d'une aquaporine au sein de la membrane de la FP, chez les formes sanguines du parasite <sup>[113]</sup>. Toutes ces données suggèrent la présence de barrières assurant la répartition correcte des différents éléments membranaires de ces sous-domaines <sup>[110, 111]</sup>.

Localisée à l'extrémité postérieure de la cellule, la FP entoure la base du flagelle et se resserre au niveau du site de sortie du flagelle en une structure similaire à celle des desmosomes <sup>[110, 114]</sup>, appelée collier de la poche flagellaire.



**Figure 21: Images de coupes ultra-fines observées au microscope électronique à transmission. (A) :** Coupe longitudinale d'une poche ciliaire chez une cellule épithéliale de type RPE1. **(B) :** Coupe longitudinale de la poche flagellaire de *T. brucei*. Dans les deux cas, on observe une invagination de la membrane plasmique à la base du cil (A) et du flagelle (B). Barre d'échelle= 100 nm. Publiée par Vincensini *et al.*, *Biology of the Cell*, 2011.



**Figure 22: Schématisation du trafic endocytique et exocytique lié à la poche flagellaire de *T. brucei*.** Chez *T. brucei*, le mécanisme d'endocytose est dépendant de la clathrine. Légende = BB : corps basal ; FP : poche flagellaire ; FPC : collier de la poche flagellaire ; Fla : flagelle ; PFR : paraflagellar rod ; FAZ : zone d'attachement flagellaire ; CCP : vésicule recouverte de clathrine en formation ; CCV : vésicule recouverte de clathrine. Publiée par Ghossoub *et al.*, *Biology of the Cell*, 2011.

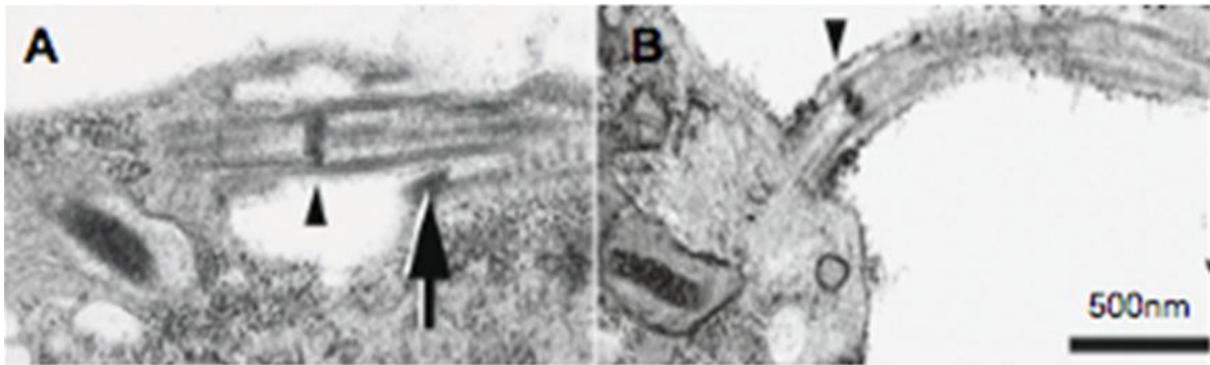
A la zone d'entrée du flagelle dans la FP, une structure dense aux électrons entourant la membrane flagellaire a été observée. Cette structure, appelée collerette est restreinte à une partie du flagelle appelée zone de transition <sup>[115]</sup>. La FP est donc liée de façon directe ou indirecte à des structures du cytosquelette du parasite, mais également à des organites intervenant dans le trafic intracellulaire comme le réticulum endoplasmique <sup>[106]</sup> et l'appareil de Golgi <sup>[116]</sup>. Chez *T. brucei*, elle joue un rôle essentiel dans le recyclage des protéines de surface, dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte mammifère, dans la sécrétion de protéines dans le milieu extracellulaire et c'est le seul site d'endocytose et d'exocytose de la cellule. L'activité endo- et exocytique de cette structure est plus intense chez la forme sanguine du parasite, notamment le recyclage des protéines de surface <sup>[110]</sup>.

De façon intéressante il a été observé que la structure de cette poche est comparable à celle observée à la base de certains cils primaires des cellules mammifères (Figure 21). Toutefois, la raison de la présence ou non de cette poche ciliaire, chez les cellules mammifères, est encore indéterminée. La fonction de cette structure est également inconnue <sup>[117]</sup>.

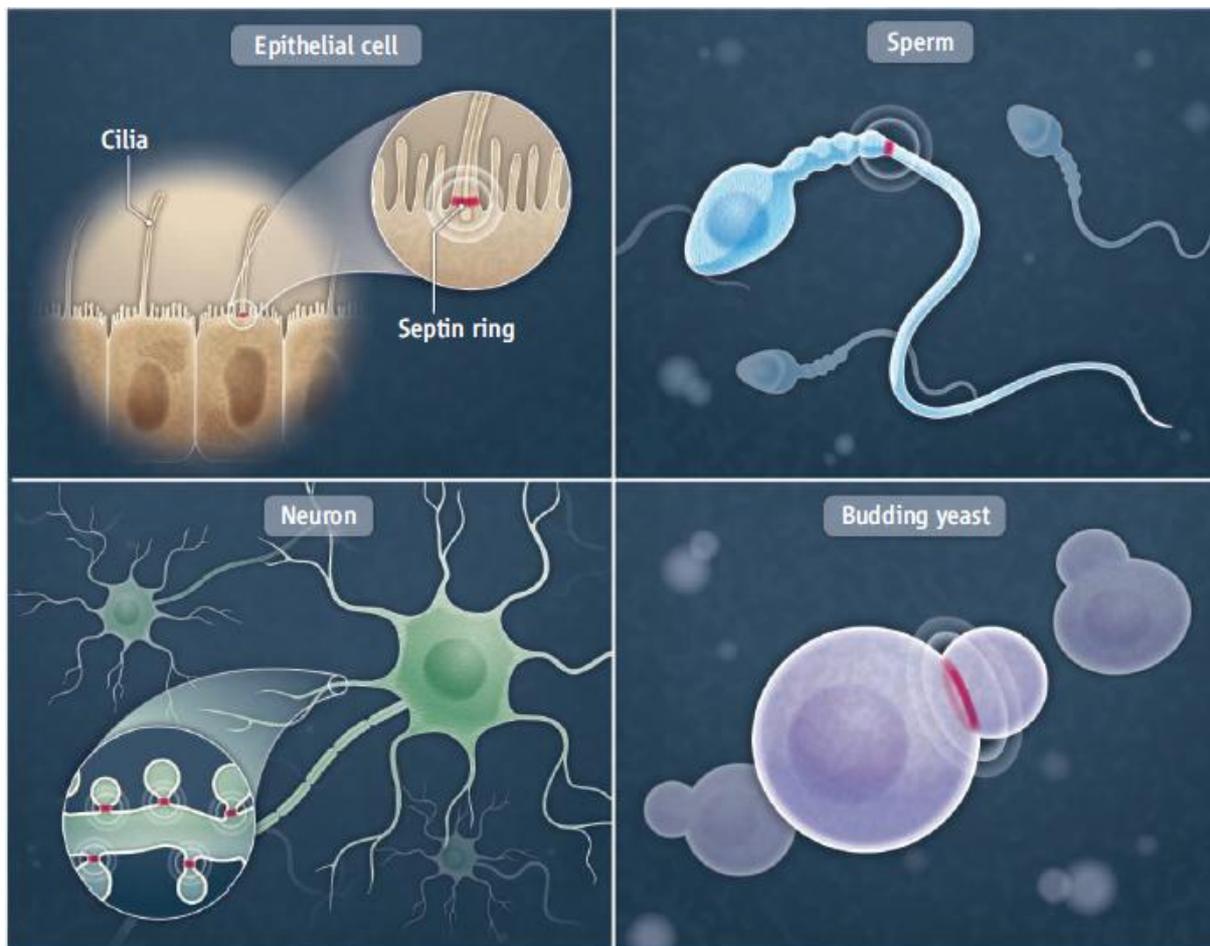
### **g) Endocytose**

Les phénomènes d'endocytose décrits peuvent être dépendants ou non (pinocytose) de récepteurs présents à la membrane de la poche <sup>[110, 118]</sup>. Le postulat accepté par la communauté, établit le mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant comme seul mécanisme d'endocytose actif chez *T. brucei*. En effet, différents travaux ont montré son implication dans la voie de recyclage des VSGs (phénomène très actif et récurrent au cours de l'infection chez l'hôte mammifère) <sup>[119]</sup>. Il a été également observé que la diminution de l'expression de clathrine induisait un phénotype létal chez le parasite, consécutif à l'inhibition de l'endocytose <sup>[120]</sup>. Un résultat similaire a également pu être observé suite à la diminution de l'expression d'actine chez la forme sanguine du parasite <sup>[121]</sup>. Chez *T. brucei*, ces travaux définissent l'endocytose, comme actine et clathrine-dépendante.

La clathrine est une protéine impliquée dans l'un des principaux mécanismes d'endocytose connu chez les eucaryotes <sup>[122]</sup>. Cette protéine structurale est constituée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, elle s'assemble en triskèle (structure formée de 3 unités protéiques) et est impliquée dans la formation des vésicules d'endocytose en formant un manteau icosaédrique autour d'elles <sup>[123]</sup> (Figure 22).



**Figure 23:** (A) et (B) Images de coupes ultra-fines de l'extrémité postérieure de *T. brucei* (coupe longitudinale), observées au microscope électronique à transmission. (A) : condition wild-type et (B) : ARN interférence de BILBO1 après 48 heures d'induction de l'ARNi, il n'y plus de poche flagellaire ou de collier de la poche flagellaire associé au flagelle néoformé. Barre d'échelle=500 nm. Publiée par Bonhivers *et al.*, 2008.



**Figure 24:** Barrière de diffusion de septines présent à la base des cils chez les cellules épithéliales, à l'annulus des spermatozoïdes, à la base des épines dendritiques des neurones, à la jonction du bourgeon fille et la cellule mère des levures en bourgeonnement. Publié par Y. Barral, Science, 2010.

L'endocytose fait également intervenir des protéines de la famille des Rab-GTPases notamment RAB5, ainsi qu'une protéine à domaine ENTH (Epsin N-terminal homology) <sup>[124]</sup> : l'epsine-R, capable de se lier à certains phospholipides présents dans les membranes. Les Rab-GTPases régulent les mécanismes de transport, de « docking » et de fusion de vésicules avec la membrane <sup>[125, 126]</sup>. Les molécules endocytées suivent ensuite la voie endosomale les orientant vers le lysosome ou vers une voie de recyclage à la surface cellulaire <sup>[110]</sup>.

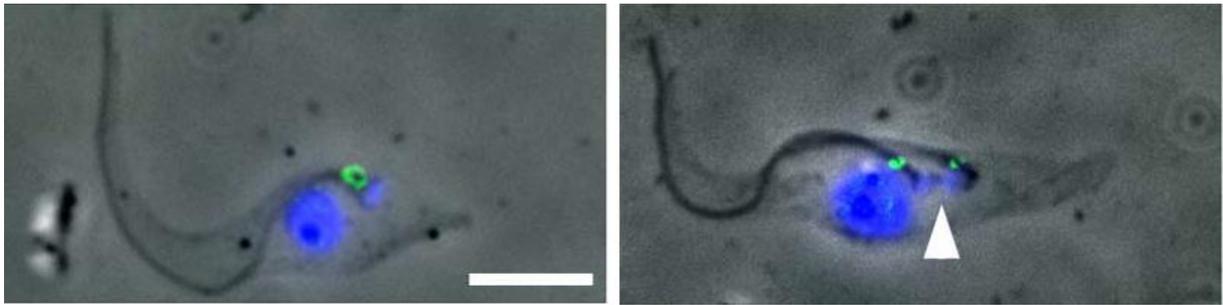
### **b) Exocytose**

L'exocytose, comme l'endocytose transite par la FP chez *T. brucei*. Ce mécanisme nécessite la présence de deux protéines Rab : RAB1A et RAB2 <sup>[127]</sup>. Compte-tenu de l'abondance des VSGs à la surface cellulaire, chez *T. brucei*, le mécanisme d'exocytose concerne majoritairement l'export de ces glycoprotéines à la surface du parasite <sup>[128]</sup>. Par microscopie électronique, des microvésicules ont été observées à la membrane de la FP et du flagelle <sup>[129]</sup>. Ce mécanisme d'exocytose existe chez d'autres cellules eucaryotes et les microvésicules relâchées sont appelées exosomes <sup>[110]</sup>.

## **5. Collier de la poche flagellaire (FPC)**

Le FPC est une structure du cytosquelette qui resserre la poche flagellaire autour du flagelle à la zone de sortie du flagelle <sup>[110, 115, 130]</sup>. En microscopie électronique, c'est une zone dense aux électrons impliquant une jonction entre la membrane de la FP et celle du flagelle <sup>[115, 130]</sup> (Figure 23A). Elle est décrite comme une structure en anneau, d'environ 500 nm de diamètre, permettant une jonction membranaire, pouvant également intervenir comme une barrière de diffusion <sup>[110, 130]</sup>. Cette structure rappelle celle des desmosomes de type *macula adherens*, jonctions entre deux membranes faisant intervenir des protéines du cytosquelette <sup>[40, 86, 114, 130]</sup>. Une structure similaire a parfois été observée chez les eucaryotes supérieurs au cou de certaines poches de cils primaires <sup>[117, 131]</sup>. Néanmoins, l'existence d'une telle structure à la poche ciliaire reste controversée.

Toutefois, on retrouve à la base du cil primaire une barrière de diffusion formées de monomères de septines <sup>[132, 133, 134]</sup>. Cette barrière forme un anneau à la base de la zone de transition du cil primaire. On retrouve également cette structure à l'annulus des spermatozoïdes des mammifères <sup>[134, 135]</sup>, chez les levures à la jonction du bourgeon fille et de la cellule mère ou encore à la base des épines dendritiques des neurones <sup>[135]</sup> (Figure 24).



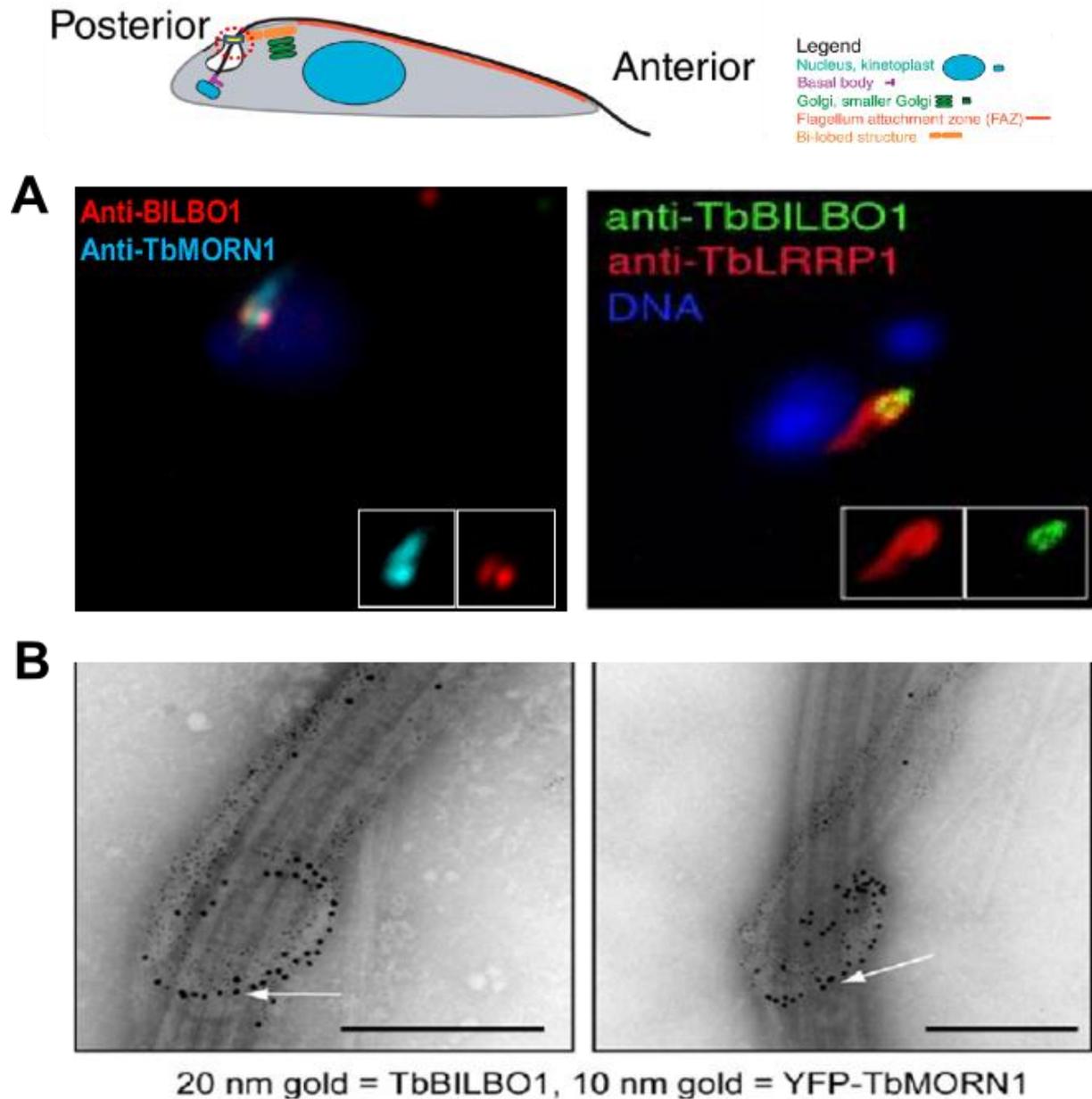
**Figure 25 : Localisation de BILBO1 au collier de la poche flagellaire (FPC).** Immunofluorescence réalisée sur des cytosquelettes de *T. brucei* avec l'anticorps anti-BILBO1 et marquage de l'ADN avec le DAPI, publiée par Bonhivers *et al.* en 2008. Barre d'échelle de 5 $\mu$ m.

Lors de la formation de cette barrière de diffusion, les septines forment des polymères et interagissent avec le phosphatidyl inositol polyphosphate présent dans les membranes. Cette interaction permet un ancrage du polymère à la membrane <sup>[132, 133]</sup>.

Les septines sont une famille de protéines GTPase (possédant une activité d'hydrolyse du GTP) capables de polymériser *via* leur domaine de fixation au GTP et leur domaine coiled-coil <sup>[133]</sup>. Leur capacité de polymérisation en structure annulaire rappelle la conformation de la structure du FPC, toutefois aucun homologue de séquences de septines n'a été retrouvé dans le génome de *T. brucei*. Cependant, ce constat n'exclue pas la possible existence d'un homologue fonctionnel au sein du trypanosome.

Suite à une analyse protéomique d'un extrait flagellaire de *T. brucei*, Bonhivers M. et ses collègues <sup>[85, 130]</sup> ont découvert et caractérisé une nouvelle protéine du cytosquelette du parasite. En effet, après immunisation de souris avec des protéines issues d'un extrait flagellaire de *T. brucei* et séparées par électrophorèse en gel polyacrylamide, les sera polyclonaux obtenus ont été testés par immunofluorescence (IF) sur le parasite. Cette analyse a permis de sélectionner des anticorps reconnaissant des structures particulières du cytosquelette de *T.b.* et l'étude des antigènes correspondants a mis en lumière de nouvelles protéines chez le parasite. Cette étude a conduit à l'identification de BILBO1 <sup>[85, 130]</sup>, la première protéine identifiée au niveau du FPC chez *T. brucei* (Figure 25).

De plus, une récente étude d'immuno-marquage en microscopie électronique réalisée chez *T. brucei*, permet d'observer l'ultrastructure du FPC <sup>[136]</sup>. Ces travaux décrivent BILBO1 comme un petit crochet ou une spire, présent au collier de la poche. Ils mettent également en lumière la très proche localisation entre deux protéines du bilobe (*TbMORN1* et *TbLRRP1*) et BILBO1 (Figure 26). Ce qui suggère une connexion entre le bilobe et le FPC. Le bilobe est une structure du cytosquelette de *T. brucei* formé d'un complexe protéique regroupant *TbCentrine 2* et *4*, *TbMORN1*, *TbLRRP1* et de façon transitoire *TbPLK* (Polo-like kinase) <sup>[137-140]</sup>. Cette structure a été décrite comme régulateur de la duplication et la ségrégation du Golgi chez *T. brucei*. *TbCentrine 2* a été la première protéine identifiée au niveau du bilobe, elle décrit une conformation en deux lobes (bi-lobe) qui donne son nom à la structure. Le lobe proximal est proche du FPC alors que le lobe distal est proche du Golgi, chez la forme procyclique du parasite <sup>[141]</sup>.

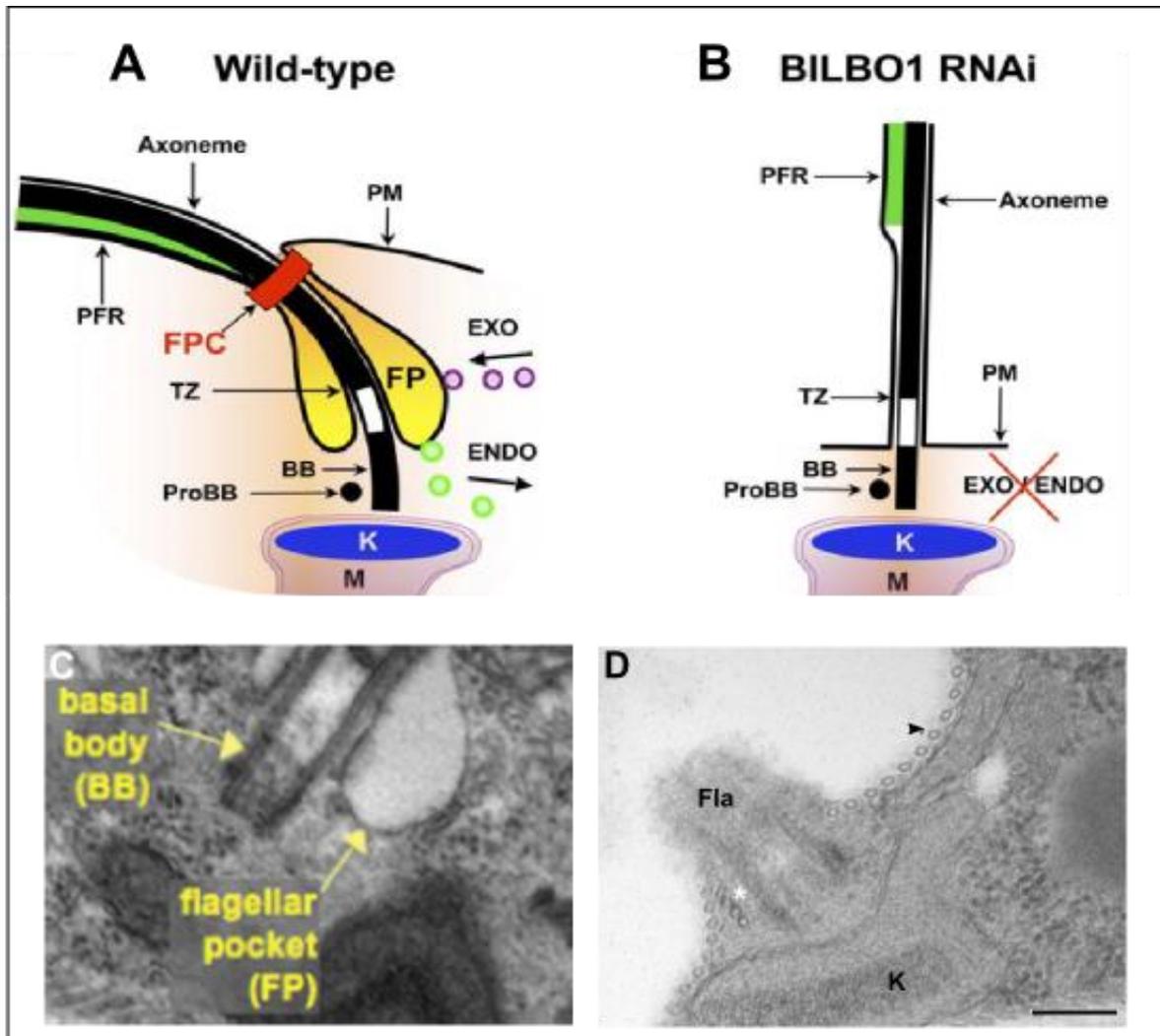


**Figure 26: Co-localisation partielle de BILBO1 avec *TbMORN1* et *TbLRRP1* (protéines du bilobe).** Représentation schématique de *T. brucei*, le collier de la poche flagellaire (FPC) est représenté par un anneau jaune et il est situé à proximité du bilobe (représenté par deux lobes adjacents orange) ; publié par de Graffenried *et al.*, Journal of Cell Biology, 2008. **(A)** : Immunofluorescence réalisée sur des cytosquelettes de formes procyclique de *T. brucei*. L'image de gauche montre la co-localisation partielle de BILBO1 avec *TbMORN1*. Les anticorps utilisés sont l'anticorps monoclonal de souris anti-BILBO1 et l'anticorps de lapin anti-*TbMORN1*. L'image de droite montre la co-localisation de BILBO1 avec *TbLRRP1*, travaux publiés par Zhou *et al.*, 2010. Les anticorps utilisés sont l'anticorps monoclonal de souris anti-BILBO1 et l'anticorps anti-*TbLRRP1*. **(B)** : Immuno-marquage de préparation de flagelles de *T. brucei* exprimant YFP-*TbMORN1*, observé au microscope électronique à transmission. Les flagelles sont marqués par l'anticorps anti-NTD BILBO1 (billes de 20 nm d diamètre) et l'anticorps anti-GFP (billes de 10 nm d diamètre). La flèche désigne le collier de la poche flagellaire. Barre d'échelle=500 nm. Publiée par Esson *et al.*, Eukaryotic Cell, 2012.

Toutefois, chez la forme sanguine le lobe distal n'est pas au contact du Golgi <sup>[116]</sup>, ce qui soulève des doutes sur l'implication du bilobe dans la gestion de la ségrégation du Golgi chez *T. brucei* comme cela avait été initialement proposé. *TbMORN1* et *TbLRRP1* définissent une structure en forme d'hameçon dont le crochet co-localise partiellement avec l'anneau de BILBO1 <sup>[136, 138, 139]</sup>.

- *TbMORN1* est une protéine qui contient 15 domaines répétés de type MORN (Membrane Occupation and Recognition Nexus). Ces domaines sont généralement impliqués dans des interactions avec les membranes. Ainsi, l'homologue de *TbMORN1* présent chez *Toxoplasma gondii* (parasite de la famille des *Apicomplexa*) permettrait d'établir un lien entre le cytosquelette et la membrane plasmique du parasite <sup>[142]</sup>. De même chez *T. brucei*, *TbMORN1* pourrait être impliqué dans l'établissement d'un lien entre la membrane plasmique et des protéines du cytosquelette, notamment les protéines du bilobe. Ce lien pourrait permettre d'ancrer des structures du cytosquelette à la membrane. La diminution de l'expression de *TbMORN1* est létale chez la forme sanguine de *T. brucei*, néanmoins chez la forme procyclique on n'observe qu'une légère inhibition de la croissance cellulaire <sup>[138]</sup>. Le résultat observé chez la forme procyclique pourrait résulter de la présence dans la cellule, après induction de l'ARN interférence, de 20% du taux normal de *TbMORN1*. Ce phénomène pourrait permettre de maintenir la fonction de *TbMORN1* au sein du parasite.
- *TbLRRP1* est une protéine qui contient des domaines répétés riche en leucine en N-terminal et un domaine coiled-coil à son extrémité C-terminale. Ces domaines sont potentiellement impliqués dans des interactions protéine-protéine. Cette protéine, initialement identifiée en 2006 par Broadhead *et al.* <sup>[143]</sup>, était nommée *TbHERTS*. L'ARN interférence (ARNi) de *TbLRRP1* chez la forme procyclique, entraîne une inhibition de la croissance et une diminution de la motilité du parasite. On observe également une inhibition de la duplication de l'appareil de Golgi, ainsi que celle du collier de la poche flagellaire et de la FAZ <sup>[139]</sup>. L'effet de l'ARNi de *TbLRRP1* chez la forme sanguine n'a pas été décrit. La fonction réelle de cette protéine n'est pas connue, mais elle semble intervenir dans les processus de division du Golgi et du FPC, mais également dans la formation de la FAZ.

Aucun lien direct n'a encore été montré entre le FPC et le bilobe. Néanmoins, la co-localisation partielle de BILBO1 avec *TbMORN1* et *TbLRRP1*, suggère l'existence d'une connexion entre ces deux structures du cytosquelette chez *T. brucei* (Figure 26).



**Figure 27: Effet de l'ARNi de *BILBO1* l'activité endo- et exocytique chez *T. brucei* (forme procyclique).** (A) et (B) représentent respectivement, une schématisation de la poche flagellaire et de son fonctionnement en condition wild-type (WT) et l'effet de l'absence de cette poche après induction de l'ARNi de *BILBO1*. L'absence de FP entraîne une inhibition de l'activité endo- et exocytique. Publiée par Bonhivers *et al.*, 2008. Légende : M= mitochondrie ; K= kinétoplaste ; BB= corps basal ; FP= poche flagellaire ; TZ= zone de transition ; FPC= collier de la poche flagellaire ; PFR= paraflagellar rod ; PM= membrane plasmique ; Axonème. (C) et (D) sont des images de coupes ultra-fines montrant la base du flagelle chez *T. brucei*, observées au microscope électronique à transmission. (C) est une coupe réalisée chez les cellules WT (publiée par Ghossoub *et al.*, *Biology of the Cell*, 2011). (D) est une coupe réalisée chez les cellules induites pour l'ARNi de *BILBO1*. K= kinétoplaste ; Fla= flagelle. La tête de flèche noire désigne le corset de microtubules sous-pelliculaire et l'astérisque blanc désigne le quartet de microtubules. Barre d'échelle=200 nm.

## C. BILBO1

BILBO1 est le premier composant identifié au niveau du FPC (Figure 25) et le premier marqueur caractérisé dans le FPC <sup>[130]</sup>. Diverses analyses de protéomique ont localisé cette protéine comme constituant du flagellome <sup>[86, 143]</sup>. Ces résultats suggèrent une forte connexion entre le flagelle et le FPC. C'est une protéine de 67,3 kDa codée par un gène présent en une seule copie sur le chromosome 11 de l'organisme <sup>[130]</sup>. Elle possède deux motifs de fixation au calcium de type EF-Hand (aa. 185 – 213 et 221 – 249 : InterProScan) et un large domaine coiled-coil en C-terminal (aa. 266 – 563 : InterProScan), ce qui suggère une possible régulation de la protéine *via* le calcium et une capacité probable d'oligomérisation. Des homologues de BILBO1 ont été retrouvés chez toutes les espèces de *Kinetoplastidae* séquencés à ce jour. Toutefois, il n'existe aucun homologue de cette protéine chez les autres organismes eucaryotes connus.

### 1. Analyse fonctionnelle réalisée par Bonhivers *et al.* <sup>[130]</sup>

Au cours du cycle cellulaire, dès le début de la duplication du kinétoplaste, on observe une élongation du collier puis la formation de deux FPC liés aux deux flagelles présents dans la cellule à ce stade (Figure 25). Il semble que la formation des deux structures distinctes de FPC se produit avant la ségrégation du kinétoplaste. Ces données suggèrent que le nouveau FPC est issu de la ségrégation du FPC originel et cet évènement se produit simultanément avec la ségrégation du nouveau flagelle au cours du cycle de division cellulaire.

La première étude fonctionnelle de cette protéine a mis en lumière le caractère essentiel de BILBO1 chez *T. brucei*. BILBO1 est présente chez les formes procycliques et sanguines du parasite. Chez la forme procyclique du parasite, suite à l'ARN interférence qui se traduit par la diminution du taux de BILBO1 (une diminution de 80% au bout de 72 heures), on observe une inhibition de la croissance du parasite corrélée avec l'apparition de cellules en division aberrantes, présentant un nouveau flagelle détaché à l'extrémité postérieure allongée de la cellule. Différents phénomènes expliquent ces phénotypes : la formation du flagelle détaché est due à une inhibition de la biogenèse de la FAZ et du FPC. L'élongation de l'extrémité postérieure de la cellule résulte de la formation et l'élongation de nouveaux microtubules à cette extrémité. Ce mécanisme induit un allongement de l'extrémité postérieure qui pourrait également être associé au positionnement aberrant du nouveau flagelle à l'extrémité postérieure de la cellule.

En effet, l'absence de FAZ et de FPC pourrait inhiber les mécanismes assurant le positionnement correct du nouveau flagelle lors de la division cellulaire. Sa localisation pourrait alors dépendre de biogénèse du cytosquelette du parasite.

L'analyse en microscopie électronique réalisée sur ces cellules révèle que le flagelle détaché n'est lié à aucune poche flagellaire et on note également l'absence de FPC associé à cette structure (Figure 23B). BILBO1 est une protéine essentielle à la biogénèse du FPC, mais également à la biogénèse de la poche flagellaire. Néanmoins, la fonction de cette protéine au sein du collier reste encore inconnue.

L'absence de nouvelle poche flagellaire dans la cellule en division se traduit par une accumulation de vésicules au niveau cellulaire et une inhibition de l'activité endocytyque et exocytyque associée au flagelle détaché (Figure 27). Seule l'ancienne poche conserve une activité d'échange moléculaire. L'observation de coupes ultra-fines des cellules ARNi<sup>BILBO1</sup> au microscope électronique à transmission révèle la présence de microtubules sous-pelliculaires au voisinage proche du flagelle détaché (Figure 27D). Ce phénotype pourrait être associé à l'inhibition de l'activité endo- et exocytyque, puisqu'il restreint l'accès à la membrane plasmique.

Chez la forme sanguine, la diminution de BILBO1 induit un phénotype létal. La diminution de BILBO1 induit un changement dans la morphologie de la cellule. 12 heures après l'induction de l'ARNi de BILBO1, les cellules deviennent rondes et sont incapables de proliférer. Ce phénotype est différent de celui observé chez les formes procycliques, ce qui suggère un rôle différent ou plus complexe de BILBO1 et peut-être du FPC chez la forme sanguine du parasite.

Le FPC a donc un rôle essentiel pour la formation de la FP mais également de la FAZ. Il est nécessaire à la survie du parasite, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle. Aussi, afin de mieux caractériser cette structure, il est nécessaire d'étudier ces constituants, notamment BILBO1 et ses partenaires protéiques. Ce constat définit l'objectif de ma thèse.

#### IV. Objectif de l'étude

L'organisme modèle que j'ai utilisé pendant ma thèse est *Trypanosoma brucei brucei*, une sous-espèce non-pathogène pour l'Homme, facilement cultivable en laboratoire. Cette organisme est facilement manipulable et permet de réaliser différentes analyses de génomiques fonctionnelles. Le sujet de ma thèse repose sur l'étude de nouvelles protéines du collier de la poche flagellaire chez le parasite. Cette recherche a pour but de comprendre l'organisation du collier.

En effet, le rôle de BILBO1 dans la formation et la structure du FPC n'est pas connu. De même, les autres protéines composant cette structure (partenaires potentielles de BILBO1) n'avaient pas encore été identifiées et caractérisées. Les objectifs de ma thèse étaient donc :

- après identification des partenaires de BILBO1, de caractériser les diverses interactions présentes au du FPC,
- de déterminer la fonction de ces nouvelles protéines du FPC et leur implication dans sa formation,
- de déterminer comment la structure en « anneau/fer à cheval » du FPC est formée,
- d'étudier la biogenèse du FPC.

Afin de remplir ces objectifs, différentes analyses ont été menées chez le parasite, mais également au sein d'un système hétérologue.

Ainsi, l'analyse fonctionnelle de BILBO1 a été approfondie afin de mettre en évidence les propriétés intrinsèques de cette protéine et de mieux comprendre son importance dans la génération du collier de la poche flagellaire. Pour cela, BILBO1 a été exprimé chez des cellules ne comportant pas d'homologues de la protéine, soit dans un système hétérologue. Une lignée cellulaire humaine, de type U-2 OS (cellules d'ostéosarcome), a été transfecté afin d'exprimer de façon ectopique la protéine BILBO1. Cette analyse a mis en lumière la propriété de polymérisation de cette protéine, capable en l'absence d'autres protéines du parasite de former des polymères de type sphérique, hélicoïdal et linéaire. L'étude détaillée de ce phénotype, nous a permis d'identifier les domaines protéiques intervenant dans polymérisation de BILBO1.

En parallèle, un crible en double-hybride chez la levure a été réalisé contre une banque génomique de *T. brucei*. La forme entière de la protéine BILBO1 a été utilisée en appât, cela a permis d'identifier plusieurs partenaires protéiques potentiels de BILBO1 au sein du parasite. Ces partenaires potentiels ont été caractérisés afin de déterminer leur localisation cellulaire, par analyse d'immunofluorescence. Leur rôle dans la formation de la structure annulaire renfermant BILBO1 et dans la formation du collier de la poche flagellaire a également été étudié par des méthodes de génétiques inverse <sup>[165]</sup>.

Grâce au crible et à une analyse protéomique indépendante, de nouvelles protéines du FPC ont alors été identifiées : FPC2, FPC4 et FPC6. Ces 3 protéines sont localisées au niveau du FPC et deux d'entre-elles (FPC4 et FPC6) peuvent interagir avec BILBO1. Leur étude permet l'analyse plus détaillée du complexe protéique formant le collier chez *T. brucei*. Ainsi, la caractérisation de ces différentes protéines a permis d'identifier un lien physique entre le collier de la poche flagellaire et certaines structures du bilobe, notamment *TbMORN1*, chez le parasite. La co-expression de BILBO1 avec l'un de ces partenaires potentiels, chez les cellules U-2 OS a mis à jour l'influence de cette interaction sur la structure et la forme des polymères où elles se localisent.

L'étude de chaque protéine : BILBO1, FPC2, FPC4 et FPC6 est développée séparément dans différents chapitres des résultats. Le dernier chapitre de résultat détaille l'analyse des interactions et interconnexions existant entre ces protéines identifiées au sein de la même structure, le FPC.

# **MATERIELS ET METHODES**

# Matériels et Méthodes :

---

## I. Matériel

### A. Lignées cellulaires:

#### 1. Trypanosome

Deux souches de *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. brucei*) ont été utilisées en culture, une souche procyclique notée Tb427.29.13<sup>[144]</sup> et une souche sanguine notée Tb427.90.13 MITat 1.2 (Molteno Institute Trypanozoon antigen type 1.2) (Tb427 clone 221)<sup>[145]</sup>. Ces deux souches ont été préalablement manipulées génétiquement afin d'exprimer de façon constitutive l'ARN polymérase T7 ainsi que le répresseur Tétracycline TetR<sup>[144, 145]</sup>. La sélection des cellules modifiées nécessite la présence de deux antibiotiques : l'hygromycine et la néomycine<sup>[144, 145]</sup>. Ces modifications permettent d'utiliser ces souches pour des études fonctionnelles chez le parasite. En effet, ce système permet d'exprimer de façon inductible (*via* la tétracycline), un gène placé sous la dépendance d'un promoteur T7<sup>[146]</sup>.

Le clonage des gènes BILBO1 (n° d'accension Tritryp Tb11.01.3960), FPC2 (Tb927.10.7830), FPC4 (Tb927.8.6370) et FPC6 (Tb927.4.3120) a été réalisé à partir de l'ADN génomique de la souche de *T. b. brucei* TREU (Trypanosomiasis Research Edinburgh University) 927/4 GUTat10.1<sup>[147]</sup> isolé en 1970 à Kiboko, au Kenya. Le génome de cette souche a été séquencé par Berriman *et al.* en 2005<sup>[46]</sup> et les gènes sont référencés dans la base de données TritrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

#### 2. Cellules mammifères

Des protéines de *T. brucei* ont été exprimées dans une lignée de cellule d'ostéosarcome humain de type U-2 OS ATCC® Number: HTB-96<sup>[148]</sup>. Cette lignée dérive des cellules prélevées dans le tibia d'une patiente atteinte d'ostéosarcome (cancer des os) en 1964. C'est l'une des premières lignées cellulaires à avoir été générée et elle est couramment utilisée *in vitro*<sup>[148]</sup>. Elle est facilement cultivable en laboratoire et son protéome a été publié en 2008 par Niforou *et al.*<sup>[148]</sup>.

Une autre lignée cellulaire a été utilisée afin d'observer la localisation des protéines exprimées chez des cellules capables de produire des cils primaires *in vitro*. La lignée de cellules épithéliales de rétine humaine hTERT-RPE-1 (Retinal pigment epithelial)<sup>[149]</sup>.

### 3. Levures

Deux souches haploïdes de *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées. Ces souches Y2HGold (dérivée de la souche PJ69-2A <sup>[150]</sup>) et Y187 sont sexuellement compatibles et permettent de générer une souche diploïde comportant les génomes des deux souches haploïdes précitées. Ces deux souches sont auxotrophes pour l'histidine, la leucine, le tryptophane, l'uracile, la lysine et le tryptophane. De plus, elle ne possède pas le facteur de transcription GAL4.

- La souche Y2HGold, de type sexuel MAT<sub>a</sub>, comporte 4 gènes rapporteurs (deux gènes intervenant dans la biosynthèse de l'histidine et de l'adénine, un gène de résistance à l'auréobasidine A et un gène codant pour l' $\alpha$ -Galactosidase) placés sous la dépendance d'un promoteur GAL4. Sans le facteur de transcription Gal4, cette souche ne peut pas se développer sur milieu sans histidine ou sans adénine, ni en présence d'auréobasidine A.
- La souche Y187, de type sexuel MAT $\alpha$  est capable de former des diploïdes avec la souche Y2HGold.

### 4. Bactérie *Escherichia coli* BL21

Une souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) <sup>[151]</sup> a été utilisée pour permettre l'expression des protéines recombinantes utilisées pour la production des anticorps.

## B. Vecteurs

### 1. Chez le parasite

Les différents plasmides utilisés chez *T. brucei*, peuvent après linéarisation s'intégrer au génome du parasite par recombinaison homologue. Ils ont été générés de façon à ce que l'intégration se fasse dans une zone non-transcrite du génome.

- Le vecteur pLew100 possède un promoteur T7 qui permet la transcription du marqueur de sélection (le gène de résistance à l'antibiotique phléomycine *BLE*) <sup>[144]</sup>. Dans ce vecteur, le gène étudié est placé sous la dépendance du promoteur GPEET (promoteur de la transcription de la procycline, c'est l'un des seuls promoteurs identifié et caractérisé chez *T. brucei*), dont l'activation est rendue inductible par la tétracycline <sup>[146]</sup>. En effet, sans tétracycline pour bloquer le répresseur TetR, la transcription du gène placé sous la dépendance du promoteur GPEET est inhibée.

Pour permettre son intégration stable dans le génome du parasite, par recombinaison homologue, le vecteur comporte une région homologue à la région intergénique (non-transcrite) de l'ARN ribosomique 18S. Ce vecteur peut être utilisé chez les formes procycliques ou sanguines. Dans le cas présent, il a été utilisé chez la forme procyclique.

- Les vecteurs pLew100-GFPX et pLew100-XGFP ont été construits au laboratoire à partir du pLew100. Ces vecteurs permettent l'expression de protéines fusionnées à une étiquette GFP (Green Fluorescent Protein). Selon le vecteur, la GFP est placée en N-terminal (pLew100-GFPX) ou C-terminal (pLew100-XGFP) de la protéine étudiée.
- Le vecteur p2T7-177 comporte deux promoteurs T7, inductibles par la tétracycline, placés de part et d'autre du gène étudié <sup>[152]</sup>. Cette configuration permet de transcrire un gène en brin sens et anti-sens. Ceci conduit à la formation d'ARN double-brin spécifique du gène étudié. Ce vecteur est donc utilisé pour permettre d'induire l'ARNi d'un gène chez le trypanosome. A la différence des vecteurs pLew100, cités ci-dessus, l'intégration de ce vecteur dans le génome du parasite se fait au niveau de régions répétées présentes dans les mini-chromosomes.
- Le vecteur pHD1336 (créé par l'équipe du Dr. C. Clayton) a été utilisé chez la lignée MiTat 1.2 (formes sanguines). Comme pour le vecteur pLew100, l'intégration du vecteur se fera dans la région intergénique de l'ARNr.

## 2. Chez les cellules U-2 OS

- Le plasmide pcDNA3 (Invitrogen) <sup>[153]</sup> est un vecteur d'expression en cellules mammifères. Le gène étudié est placé sous le contrôle d'un promoteur CMV <sup>[154]</sup>.
- Le plasmide pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen), dérivé du pcDNA3, permet d'exprimer la protéine étudiée fusionnée en C-terminal à une étiquette GFP. Ce plasmide autorise le clonage direct du gène étudié *via* l'action de topoisomérases <sup>[155]</sup>.

### 3. Chez la levure

- Le vecteur d'expression pGBKT7 permet d'exprimer la protéine d'intérêt fusionnée au domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription GAL4 <sup>[156]</sup> (aa. 1-147). L'expression de la protéine de fusion dépend d'un promoteur constitutif de type ADHI <sup>[157]</sup>.
- Le vecteur pGADT7-AD permet d'exprimer la protéine d'intérêt fusionnée au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4 <sup>[156]</sup> (aa. 768-881). De façon identique au vecteur pGBKT7, l'expression de la protéine de fusion dépend du promoteur ADHI <sup>[157]</sup>.

### 4. Chez la bactérie

Le vecteur pET28a (+) (Novagen) permet l'expression chez la bactérie de la protéine étudiée fusionnée en N-terminal et/ou en C-terminal à une étiquette comportant 6 résidus histidines (étiquette His) <sup>[158]</sup>.

## II. Méthodes

### A. Milieu de culture :

#### 1. Trypanosomes

La souche procyclique est cultivée dans le milieu SDM79 (Semi Defined Medium 1979 <sup>[159]</sup>). Pour la culture, ce milieu est complété de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et d'hémine (3.5 g/L). Les parasites sont cultivés dans un incubateur à 27°C. Afin de maintenir la lignée Tb427.29.13, des antibiotiques de sélection sont ajoutés au milieu (Hygromycine à 25 µg/mL et Néomycine à 10 µg/mL). Ce milieu sera noté SDM79-HN. Les cellules sont entretenues et maintenues entre  $3.10^6$  et  $1,5.10^7$  cellules par mL dans 10 mL de culture.

La souche sanguine est cultivée in vitro en plaques 24 puits, dans le milieu de culture IMDM (Iscove's Modifie Dubecco's Medium, Gibco) complété de bicarbonate de sodium (3.024 g/L), d'hypoxanthine (0.136 g/L), de pyruvate de sodium (0.110 g/L), de thymidine (0.039 g/L), de sulfate Bathocuprone (0.028 g/L), de β-mercaptoéthanol (0.25 mM), de L-cystéine (1.875 mM), de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et de kanamycine (62.5 µg/mL). La culture s'effectue à 37°C dans un incubateur contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

Afin de maintenir la lignée MiTat 1.2, des antibiotiques de sélection sont ajoutés au milieu (Hygromycine à 5 µg/mL et Néomycine à 2,5 µg/mL). Ce milieu sera noté IMDM-HN. Les cellules sont entretenues et maintenues entre  $2 \cdot 10^5$  et  $10^6$  cellules par mL.

## **2. Cellules mammifères**

Les cellules U-2 OS sont mises en culture dans le milieu liquide DMEM-Glutamax (Gibco) complété de 10% de sérum de veau fœtal et d'un mix Pénicilline/Streptomycine (100 unités/mL et 100 µg/mL respectivement). La culture se fait dans un incubateur à 37°C (5% de CO<sub>2</sub>).

Les cellules RPE-1 sont mises en culture dans le milieu liquide DMEM : F12 (Gibco) complété de 10% de SVF et d'un mix Pénicilline/Streptomycine (100 unités/mL et 100 µg/mL respectivement). La culture se fait dans un incubateur à 37°C (5% de CO<sub>2</sub>).

## **3. Levures**

Les souches de levures haploïdes Y2HGold et Y187 sont cultivées séparément sur le milieu gélosé YPD (Yeast Peptone Dextrose : extrait de levure (10 g/L), bactopectone (10 g/L), dextrose (20 g/L)) complété d'adénine (40 mg/L) 30°C.

Pour produire des diploïdes, les deux souches haploïdes sont mises en culture conjointement dans un milieu liquide 2x YPDA (milieu Yeast Peptone Dextrose : extrait de levure (40 g/L), bactopectone (40 g/L), dextrose (80 g/L)) complété de d'adénine (80 mg/L), à 30°C et agité à 250 rpm pendant la nuit.

Les diploïdes sont ensuite sélectionnés sur un milieu gélosé SC (synthétique complet : Yeast nitrogen base (sans acides aminés et sans sulfate d'ammonium) (1.7 g/L), sulfate d'ammonium (5 g/L), CSM ou Charcoal-based Selective medium (0.59 g/L) et dextrose (20 g/L), complété d'uracile (20 mg/L), d'adénine (40 mg/L) et d'histidine (20 mg/L). L'absence de tryptophane et de leucine permet de sélectionner les diploïdes comportant les vecteurs pGBKT7 et pGADT7-AD. Ce milieu est noté SC -L, -W.

## **B. Production d'anticorps**

### **1. Expression et purification de protéines recombinantes exprimées chez *E. coli***

La souche *E. coli* BL21 a été transformée par choc thermique avec le vecteur d'expression pET28a (+), comportant le gène d'intérêt. Elle est ensuite mise en culture dans 200 mL de milieu LB (Lysogeny Broth) contenant de la kanamycine (50 µg/mL) et l'expression des protéines de fusion (ou protéines recombinantes) est induite pendant 2-3 heures à 37°C par 1M d'IPTG (Isopropyl-β-thiogalactopyranoside). La culture est centrifugée 15 minutes à 3000 g et le culot est repris dans 20 mL de tampon A (NaPI 50 mM / NaCl 500mM pH 8.0) auquel sont ajoutés des inhibiteurs de protéases PMSF (Fluorure de phénylméthanesulfonyle, 1 mM). Les cellules bactériennes suivent plusieurs cycles de lyse par sonication, puis de centrifugation à 10000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les protéines de fusion, insolubles sont présentes dans le culot qui est repris dans 20 mL de tampon B (tampon A + Urée 8 M pH 8.0).

Les protéines de fusion étiquetées avec une séquence de 6 histidines sont purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (His-Select Cartridge, SIGMA) et éluées par un tampon d'éluion contenant des concentrations croissantes d'imidazole (tampon B + Imidazole 0-1 M). Les protéines sont ensuite dialysées contre un tampon NaPI 50 mM / NaCl 500 mM / Urée 6 M pH 8.0.

### **2. Production des anticorps polyclonaux**

La production des anticorps polyclonaux (anti-FPC4 et FPC6) a été réalisée par EUROGENTEC. Les protéines recombinantes purifiées His-FPC4-His et His-FPC6 ont été utilisées pour immuniser des rats et des poules. 4 immunisations ont été effectuées sur ces animaux. Pour chaque immunisation, 30 µg de His-FPC4-His et 100 µg de His-FPC6 ont été injectés à des rats et des poules, respectivement.

Le sérum du rat immunisé contre His-FPC4-His a été récupéré et testé en immunofluorescence et en western-blot.

Les jaunes d'œuf de la poule immunisée contre His-FPC6 ont été récupérés et les IgY (immunoglobulines de poules présentes dans le jaune d'œuf) ont été purifiés *via* le kit « Pierce<sup>TM</sup> Chicken IgY Purification Kit » (Thermo scientific).

### C. Méthode d'étude d'interaction protéique – Double-hybride

La technique de double-hybride permet de tester des interactions entre protéines *via* la reconstitution de l'activité d'un facteur de transcription <sup>[156, 160]</sup>. Par cette technique, deux protéines de fusion : l'une fusionnée au domaine de fixation à l'ADN (domaine BD) et l'autre fusionnée au domaine d'activation du facteur de transcription (domaine AD), sont exprimées au sein d'un même organisme. Les protéines étudiées sont fusionnées à tour de rôle au domaine AD ou BD du facteur de transcription, elles sont alors désignées en tant que proie ou appât, respectivement. Lors du test d'interaction les deux sens possible de combinaison sont testés, soit la protéine 1 fusionnée à AD *vs* protéine 2 fusionnée à BD (1<sup>er</sup> sens testé) et la protéine 1 fusionnée à BD *vs* protéine 2 fusionnée à AD (2<sup>nd</sup> sens testé). En cas d'interaction entre les deux protéines testées, il y aura rapprochement des deux domaines du facteur de transcription et activation de la transcription des gènes dépendant de ce facteur. Le double-hybride peut être réalisé chez la bactérie, la levure ou les cellules mammifères <sup>[161]</sup>.

Un système de double-hybride chez la levure, « Matchmaker<sup>TM</sup> Gold Yeast Two-Hybrid System » (Clontech) a été utilisé pour tester les interactions entre les différentes protéines étudiées. Ce système se base sur la reconstitution du facteur de transcription GAL4, qui active la transcription de 4 gènes rapporteurs placés sous la dépendance de 3 promoteurs régulés par GAL4. En effet, les promoteurs bien que différents comportent tous une séquence reconnue par le domaine de fixation à l'ADN de GAL4.

Les 4 gènes rapporteurs présents dans ce système sont :

- Le gène *HIS3*, codant pour l'imidazole-glycérol-phosphate déshydratase (enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'histidine). Ce gène est placé sous la dépendance du promoteur G1.
- Le gène *ADE2*, codant pour l'aminimidazole ribonucléotide-carboxylase (AIR-carboxylase) qui intervient dans la voie de biosynthèse de l'adénine. Ce gène est placé sous la dépendance du promoteur G2.
- Le gène *AURI-C* (Aureobasidin A resistance) code pour l'inositol-phosphoryl-céramide synthase et confère une capacité de résistance à l'action l'aureobasidine A (anti-fongique). Ce gène est placé sous la dépendance du promoteur M1.
- Le gène *MEL1* code pour l' $\alpha$ -galactosidase, enzyme capable d'hydrolyser l' $X$ - $\alpha$ -Gal et produire un composé de couleur bleu. Ce gène est placé sous la dépendance du promoteur M1.

Les tests d'interactions sont réalisés sur 5 milieux de sélection d'interaction différents (plus ou moins stringent). Tous ces milieux sont à base du milieu gélosé SC complété d'uracile. On distingue le milieu SC -L, -W, -H (sans leucine, tryptophane et histidine) ; SC -L, -W, -A (sans leucine, tryptophane et adénine) ; SC -L, -W, AurA (sans leucine, tryptophane, additionné de d'auréobasidine A (125 ng/mL) ; SC -L, -W, X- $\alpha$ -Gal (sans leucine et tryptophane, additionné d'X- $\alpha$ -Gal (40  $\mu$ g/mL) ; SC -L, -W, -H, -A, AurA, X- $\alpha$ -Gal (sans leucine, tryptophane, histidine, adénine, additionné d'auréobasidine et d'X- $\alpha$ -Gal). Dans ce système, le milieu le plus sensible est le milieu SC -L, -W, -H. Le milieu le plus stringent est celui où la transcription des 4 gènes rapporteurs est contrôlée en même temps, soit le milieu SC -L, -W, -H, -A, AurA, X- $\alpha$ -Gal.

Pour chaque interaction testée, un test en goutte est réalisé. Des gouttes de 10  $\mu$ L de dilutions en série ( $10^8$  à  $10^2$  cellules / mL) de chaque souche diploïde sont déposées sur les différents milieux d'interaction.

## **D. Méthodes d'étude de génomique fonctionnelle des protéines du FPC**

### **1. Construction des vecteurs ou plasmides**

Les gènes à étudier sont amplifiés par réaction PCR et clonés dans les différents vecteurs décrits précédemment. Les amorces utilisées pour BILBO1, FPC2, FPC4 et FPC6 sont répertoriées en Annexe.

### **2. Transfections**

#### **a) Trypanosomes**

$3.10^7$  cellules de la souche procyclique de *T. brucei*, Tb427.29.13, ont été collectées et transfectées avec 10  $\mu$ g de plasmide linéarisé par NotI, par électroporation (cuve de 4 mm d'épaisseur, impulsion électrique de 1600 V, 40  $\mu$ F et  $R=\infty$ ) selon la méthode publiée par Bringaud *et al.*, en 1998 <sup>[162]</sup>. Les cellules transfectées sont reprises dans 10 mL de milieu de culture SDM79-HN et incubées à 27°C pendant 24 heures. 5 mL de culture sont ensuite dilués dans 45 mL de milieu conditionné (50% de surnageant de culture de Tb427.29.13 filtré à 0.2  $\mu$ m, 50% de milieu SDM79-HN frais et on ajoute 10% de SVF) auquel on additionne le ou les antibiotiques de sélection des transfectants. Selon le vecteur transfecté, on ajoute la phléomycine (5  $\mu$ g/mL), la blasticidine (10  $\mu$ g/mL) et/ou la puromycine (1  $\mu$ g/mL).

Les cellules sont ensuite réparties en plaques 24 puits, à raison de 2 mL par puits et incubées à 27°C.

La transfection des cellules de la souche sanguine MiTat 1.2 est réalisée *via* le système AMAXA (Lonza).  $1.10^7$  cellules ont été collectées (centrifugation 1800 rpm pendant 10 min, 37°C) et reprises dans 5 mL de cytomix (EGTA pH7.6 (2 mM), KCl (120 mM),  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH7.6 (10 mM), HEPES pH7.6 (25 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), Glucose (0.5%), BSA (100 µg/mL), Hypoxanthine (1 mM)). Après centrifugation (1800 rpm pendant 10 minutes, les cellules sont reprises dans 100 µL de tampon « Amaxa T-Cell buffer ». Après ajout de 10 µg de plasmides linéarisés (à transférer), les cellules sont électroporées suivant le programme « t-cell (CD4+) mouse X-001 » de l'électroporateur AMAXA (Lonza). Suite à l'électroporation, les cellules sont reprises dans 50 mL de milieu de culture IMDM-HN et réparties dans deux plaques 24 puits, à raison de 1 mL par puit. Au lendemain de la transfection, l'antibiotique de sélection des transfectants est ajouté (dans chaque puit : ajout de 1 mL de milieu de culture auquel est additionné 2 fois la concentration requise de l'antibiotique de sélection (blasticidine 10 µg/mL)

### **b) Cellules U-2 OS**

A la veille de la transfection,  $5.10^4$  cellules sont mises en culture (milieu DMEM, 37°C) sur des lamelles, en plaque 24 puits.

Le lendemain, les cellules U-2 OS sont transfectées *via* un agent lipofectant (déstabilisateur de la membrane plasmique), la lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen). Pour chaque transfection, 2 µL de lipofectamine additionnée de 0.75 à 1 µg du vecteur comportant le gène à exprimer (pcDNA3 ou pcDNA3.1) sont incubés pendant 30 minutes (température ambiante) dans 100 µL final d'OPTI-MEM<sup>®</sup> (milieu synthétique minimum, Invitrogen).

Le mix, lipofectamine/plasmides est ajouté goutte à goutte aux cellules préalablement reprises dans 200 µL d'OPTI-MEM. Après une incubation de 2 heures à 37°C, le surnageant de culture est enlevé et remplacé par 500 mL de milieu de culture DMEM. Les cellules sont ensuite mises en culture à 37°C (5% CO<sub>2</sub>).

### **c) Cellules RPE-1**

La veille de la transfection,  $5.10^4$  cellules sont mises en culture (milieu DMEM : F12 complet, 37°C) sur des lamelles, en plaque 24 puits.

La transfection s'effectue avec 1 µg de plasmide pcDNA3.1-FPC6-GFP combiné à 1 µL de lipofectamine. Ce mix est ajouté goutte à goutte aux cellules préalablement reprises dans 200 µL d'OPTIMEM.

Après une incubation de 2 heures à 37°C, le surnageant de culture est enlevé et remplacé par 500 mL de milieu de culture DMEM : F12 complet ou dans 500 mL de milieu DMEM : F12 (Gibco) à 0.5% de SVF. La culture des cellules RPE-1 dans un milieu pauvre en SVF (0.5% au lieu de 10%) induit la production de cils primaires. Les cellules sont ensuite mises en culture à 37°C (5% CO<sub>2</sub>).

### 3. Surexpression chez le parasite

Après transfection des vecteurs (pLew100-GFPX, pLew100-XGFP et pLew100) construits pour surexprimer de façon inductible BILBO1, FPC2, FPC4 et FPC6 dans les trypanosomes, les cellules (formes procycliques) ayant intégré ces constructions sont sélectionnées et mises en culture en présence de l'antibiotique de sélection correspondant (phléomycine).

La croissance de chaque lignée cellulaire est suivie en condition non-induite (sans tétracycline) et induite (ajout journalier de 1 µg/mL de tétracycline). Pour suivre cette croissance, 3.10<sup>6</sup> cellules sont mises en culture et comptées de façon journalière. Après chaque comptage les cellules sont diluées afin de retrouver la concentration de départ.

### 4. ARN interférence (ARNi)

En 1998, Fire et ses collègues ont découvert, que l'ARNi était induit par l'ARN double brin (ARNdb) <sup>[163]</sup>. En effet, la présence d'un ARNdb dans la cellule active la ribonucléase Dicer, qui le coupe en petits ARN appelés ARNsi (small interfering RNA). Ces ARNsi sont pris en charge par le complexe RISC (RNA induced silencing complex) et les brins sont dissociés. Le brin anti-sens cible l'ARNm comportant une séquence complémentaire. Cela conduit à l'activation de l'activité nucléase de RISC et à la dégradation de l'ARNm correspondant. Le mécanisme d'ARNi a été mis en évidence chez *Trypanosoma brucei*, en 1998 par l'équipe d'E. Ullu et C. Tschudi <sup>[164]</sup>.

L'induction de l'ARNi d'un gène chez *T. brucei*, implique l'intégration préalable dans le génome du parasite (après transfection), d'une cassette, comportant la séquence ciblant le gène étudié, transcrite en ARNdb, placée sous la dépendance d'un promoteur régulé par l'opérateur Tétracycline <sup>[146, 165]</sup>. Cette configuration permet de moduler l'expression de l'ARNdb (via la tétracycline). Afin de sélectionner la population de cellules ayant intégré la cassette, celle-ci comporte un gène de sélection (gène de résistance à un antibiotique). À l'issue de cette sélection, des dilutions-limites effectuées sur la population émergente, permettront ensuite d'obtenir des lignées clonales.

La croissance cellulaire de la lignée clonale obtenue est suivie en condition non-induite (sans tétracycline) et induite (avec tétracycline). Pour suivre cette croissance,  $3.10^6$  cellules (cas des cellules procycliques) et  $2.10^5$  cellules (cas des formes sanguines) sont mises en culture (10 mL de culture) et comptées de façon journalière.

## 5. Knock-Out ou KO du gène *FPC2*

Deux cassettes capables de remplacer par recombinaison homologue les 2 allèles du gène *FPC2* ont été générés. Ces constructions comportent le gène de résistance à la blasticidine (*BSD* : Blasticidin-S deaminase) pour l'une et le gène de résistance à la puromycine (*PAC* : Puromycin-N-acetyl transferase) pour l'autre. Pour chaque constructions, le gène de résistance est placé entre les régions flanquantes du gène *FPC2* : régions 5'UTR (5'-ctccAAGCTTtgaggcaggcactctgcaac-3' et 5'-caaagTCTAGAtccttcaactctttttcttttttaaaaaaac-3') et 3'UTR (5'-ttacTCTAGAagaCTCGAGacgtgaacggaaccgacgtctc-3' et 5'-gtgaACCGGTatgcagcattccgcggtgtg-3'). Ceci permettra, le remplacement du gène *FPC2* à son locus <sup>[165]</sup>.

La présence de 2 allèles nécessite le remplacement séquentiel de chacun des allèles. Une première transfection avec l'une des constructions, permet le remplacement d'un seul allèle du gène. Après sélection des transfectants, le deuxième allèle est remplacé par le second gène de résistance à l'antibiotique de sélection. Les transfectants sont ensuite sélectionnés en présence des deux antibiotiques (blasticidine (10 µg/mL) et puromycine (1 µg/mL)).

## 6. Western-Blot

Les trypanosomes sont collectés, lavés en tampon PBS (phosphate buffered saline, pH7.4) et centrifugés 10 minutes à 1000 g.

Pour obtenir un lysat cellulaire (issue de cellules entières) : après centrifugation, les cellules sont reprises dans un tampon dénaturant SB (sample buffer, SDS 8%, glycérol 40%, Tris pH6.8 (200 mM), DTT (400 mM), Bleu de bromophénol) complété de benzonase (endonucléase, 2U pour  $10^8$  cellules, SIGMA). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante (TA), le lysat est chauffé à 100°C pendant 5 minutes.

Pour obtenir des préparations de cytosquelettes, le culot de cellules (récupéré après lavage en PBS) est repris dans 1 mL de tampon d'extraction (PIPES pH6.8 (100 mM), NP40 0.25%, MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 2U d'endonucléase pour  $10^8$  cellules, PMSF (1 mM)) et incubé 10 minutes à 4°C.

Après deux cycles de centrifugation (16000 g, 5 minutes à 4°C) et lavages en PBS, le culot est repris dans le tampon dénaturant SB. Cette préparation de protéines du cytosquelette de *T. brucei* est chauffée à 100°C pendant 5 minutes.

Les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE dans des gels de polyacrylamide de 6% - 12%. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur membrane PVDF (polyvinylidène fluoride) *via* un système de transfert semi-sec. Suite au transfert, les membranes sont incubées dans un tampon saturant « TS » (5% lait, 0.2% Tween 20 dilué en TBS (Tris-base buffered saline)) ou dans un tampon non-saturant « TNS » (0.2% Tween 20 dilué en TBS) pendant 1 heure à TA. Elles sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon TS ou TNS pendant la nuit. Les anticorps primaires qui ont été utilisés sont : le sérum polyclonal de rat anti-FPC4 dilué au 1/1000 ; et dilué au 1/3000 après purification contre une préparation de cytosquelettes de *T. brucei* ARNi<sup>FPC4</sup> induit 72 heures. L'anticorps polyclonal de poule anti-FPC6 dilué au 1/250. L'anticorps polyclonal de souris anti-FPC2 (produit au laboratoire) dilué au 1/3000. L'anticorps monoclonal de souris anti-PFR2 (L8C4, <sup>[166]</sup>) dilué au 1/1000 et l'anticorps monoclonal de souris anti-tubuline- $\alpha$  (TAT1, <sup>[105]</sup>).

Après 3 lavages de 15 minutes en tampon TS, TNS ou en NaCl 1M, suivie de 2 lavages en tampon TS ou TNS, les membranes sont incubées 1 heure à TA avec l'anticorps secondaire dilué dans le tampon TS ou TNS. Les anticorps secondaires utilisés sont : l'anticorps anti-IgG de rat (produit chez la chèvre) conjugué à la HRP (Horse Radish Peroxidase, Jackson) dilué au 1/10000 dans le tampon TS ou TNS ; l'anticorps anti-IgY de poule (produit chez la chèvre) conjugué à la HRP (Jackson) dilué au 1/10000 dans le tampon TS ; l'anticorps anti-IgG/IgM de souris (produit chez la chèvre) conjugué à la HRP (Jackson) dilué au 1/10000 dans le tampon TS.

Après 3 lavages de 10 minutes en tampon TS et 3 lavages de 5 minutes dans du TBS, les membranes sont incubées 5 minutes dans un tampon de révélation fourni par le kit «Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate ». Cette méthode de révélation (ECL ou enhanced chemiluminescence) se traduit par la production d'un produit luminescent *via* l'action de la peroxydase présente sur l'anticorps secondaire. Les membranes sont exposées à des films auto-radiographiques qui permettront de visualiser le résultat du marquage en western-blot.

Après lavages des membranes en TBS, elles peuvent être également révélées avec une solution de diaminobenzidine (DAB) (0.05%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.03%).

## 7. Analyse du taux d'ARNm - RT-PCR

### a) *Extraction des ARN totaux de T. brucei*

10<sup>8</sup> cellules ont été collectées et reprises dans 500 µL de TRIzol RNA (5PRIME). Après une incubation de 5 minutes à TA, 100 µL de chloroforme est ajouté et l'ensemble est mélangé au vortex pendant 15 secondes. La suspension est ensuite centrifugée à 12000 g pendant 20 minutes à 4°C. Après centrifugation, deux phases sont obtenues. Les ARN sont compris dans la phase aqueuse supérieure, celle-ci est collectée et mise en présence de 250 µL d'alcool isopropylique. L'ensemble est incubé 1 heure à -80°C, puis centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol 70% puis centrifugé à 7500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot final d'ARN est alors repris dans 50 µL d'eau-DEPC. La concentration en ARN de l'échantillon est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm au nanodrop (1 unité d'absorbance correspond à 40 µg/mL d'ARN).

### b) *RT-PCR semi-quantitative*

La RT-PCR est une méthode d'analyse permettant de générer de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN. Elle permet également d'évaluer de façon relative les variations du taux d'ARN spécifique d'un gène en fonction des conditions expérimentales.

10 µg d'ARN ont été traités avec 2U de DNase-TURBO (Ambion) pendant 30 minutes à 37°C, afin d'éliminer l'éventuelle contamination des échantillons avec de l'ADN. Après traitement, pour chaque condition testée, 100 ng d'ARN serviront de matrice pour effectuer la réaction de RT-PCR *via* le kit « SuperScript<sup>TM</sup> III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polymérase » (Invitrogen) (programme : 30 minutes à 55°C, 2 minutes à 94°C, 40 cycles « 15 s à 94°C – 30 s à 60°C – 40 s à 68°C », 5 minutes à 68°C). Les produits de réaction sont déposés sur gel d'agarose 1% et séparés par électrophorèse. L'ADN ou ARN peut être visualisé sous UV après marquage au BET. La quantité relative d'ADN amplifié sera évaluée *via* le logiciel ImageJ. Pour chaque échantillon testé un ARN de référence sera utilisé (*ARN 18S*)<sup>[167]</sup> afin de contrôler la quantité de produits de RT-PCR déposé sur gel.

Afin de réaliser la réaction de RT-PCR, différentes amorces spécifiques des gènes étudiés ont été utilisées : *BILBO1* (5'-CGGGATCAGAGCGAAAAGGCAGTTGAGG-3' et 5'-CTCGCGGATAGGACCTCCCACCGT-3'), *FPC2* (5'-TGCCGTCGCACTACTGTGGATAACC-3' et 5'-TCAATATGGGCGGTGGTGC GAAG-3'), *FPC4* (5'-CCAAACTCAACCAACAGATG-3' et 5'-TTTTTATGAGTAACTCATCGG-3'), *FPC6* (5'-CAAGAGAGTCGTGGTACTG-3' et 5'-GTATGCGAGGCAACACTTC-3'), *ARN 18S* (5'-ACGGAATGGCACCACAAGAC-3' et 5'-GTCCGTTGACGGAATCAACC-3').

## E. Méthodes d'imagerie

### 1. Immunofluorescence

#### a) Chez le trypanosome

##### (1) Forme procyclique

Les cellules sont centrifugées (100 g pendant 10 minutes) et lavées en PBS puis déposées sur des lames recouvertes de poly-L-lysine. Les immuno-marquages ont été réalisés sur des cellules entières ou des cytosquelettes de trypanosomes.

Les cellules entières sont incubées avec un tampon de perméabilisation (0.1% Tritton X100, 0.1 BSA (Bovine serum albumin) dilué en PBS) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite fixées avec du PFA à 3% pendant 3 minutes.

Pour obtenir des cytosquelettes des parasites, les cellules sont extraites dans une solution d'extraction (1% NP40, MgCl<sub>2</sub> (1 mM), PIPES (2-[4-(2-sulfoethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid) pH6.9 (100 mM)) pendant 3 minutes. Le chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) et le PIPES présent dans le tampon permettent de stabiliser le cytosquelette du parasite. Après 2 lavages de 5 minutes en tampon de lavage (PIPES pH6.9 (100 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM)), les cytosquelettes sont fixés au méthanol à -20°C pendant 15 minutes. Ils sont ensuite lavés 2 fois en PBS pendant 5 minutes, puis incubés pendant 10 minutes dans un tampon de saturation (0.5% BSA, PBS).

Les cytosquelettes ou cellules sont incubés 1 heure à TA avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS. Différents anticorps primaires ont été utilisés : l'anticorps monoclonal 5F2B3 de souris anti-BILBO1 <sup>[130]</sup> dilué au 1/5 ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-living color (Clontech) dilué au 1/1000 ; l'anticorps polyclonal de souris anti-calflagine (produit par le laboratoire du Dr. L. Ruben) dilué au 1/750 ; l'anticorps polyclonal de rat anti-FPC4 dilué au 1/250 ; l'anticorps polyclonal de poule anti-FPC6 dilué au 1/500 ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-TbMORN1 <sup>[138]</sup> dilué au 1/50 ; l'anticorps monoclonal de souris anti-TbLRRP1 (produit par l'équipe du laboratoire du Dr. C. He) dilué au 1/3000 ; l'anticorps monoclonal de souris anti-FAZ1 (L3B2) <sup>[166]</sup> ; l'anticorps monoclonal souris anti-tubuline- $\alpha$  (TAT1) <sup>[105]</sup> dilué au 1/50 ; l'anticorps monoclonal de souris anti- corps basal (mAb15) produit au laboratoire et dilué au 1/25 ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-FTZC <sup>[238]</sup> dilué au 1/10000 ; l'anticorps monoclonal de souris anti-TbSAXO (mAb25) <sup>[90]</sup> dilué au 1/25. Les cellules ont été incubées avec la sous-unité B de la toxine du choléra conjugué au FITC (Sigma) diluée au 1/25.

Après 2 lavages de 5 minutes en PBS, les cytosquelettes sont incubés 1 heure à TA avec l'anticorps secondaire dilué en PBS. Différents anticorps secondaires ont été utilisés : l'anticorps anti-IgM ( $\mu$  spécifique) de souris conjugué au FITC (Jackson) dilué au 1/100 ; l'anticorps anti-IgG ( $\gamma$  spécifique) de lapin conjugué au FITC (Jackson) dilué au 1/100 ; l'anticorps anti-IgG de rat conjugué à l'Alexa fluor 488 (Molecular Probes) dilué au 1/400 ; l'anticorps anti-IgY de poule conjugué à l'Alexa fluor 594 (Molecular Probes) dilué au 1/400 ; l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué au TexasRed (Molecular Probes) dilué au 1/100 et conjugué à l'Alexa fluor 488 dilué au 1/400 ; l'anticorps anti-IgG de souris conjugué au TexasRed (Molecular Probes) dilué au 1/100 ; l'anticorps anti-IgG ( $\gamma$  spécifique) de souris conjugué au TexasRed (Jackson) dilué au 1/100 ; l'anticorps anti-IgM ( $\mu$  spécifique) de souris conjugué au TexasRed (Jackson) dilué au 1/100.

## (2) Forme sanguine

Les trypanosomes sont collectés (centrifugation 100 g pendant 10 minutes) et lavées en VPBS (NaCl (0.8 mg/mL), KCl (0.22 mg/mL), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (22.7 mg/mL), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4.4 mg/mL), sucrose (15.7 mg/mL), glucose (1.8 mg/mL)). Les culots de cellules sont ensuite repris dans un tampon d'extraction (0.25% NP40, PIPES pH6.9 (100 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM)) et déposées sur une lame recouverte de poly-L-lysine pendant 30 minutes. Après 2 lavages de 5 minutes dans le tampon de lavage (PIPES pH6.9 (100 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM)), les cytosquelettes sont fixés en méthanol à -20°C pendant 15 minutes. Après 2 lavages de 5 minutes en PBS, les cytosquelettes sont incubés avec le tampon de saturation (0.5% BSA dilué en PBS) pendant 10 minutes.

Les cytosquelettes sont ensuite incubés pendant 1 heure à TA avec les anticorps primaires : l'anticorps monoclonal de souris anti-BILBO1 <sup>[130]</sup> dilué au 1/5 ; l'anticorps polyclonal de rat anti-FPC4 dilué au 1/250. Après 2 lavages de 5 minutes en PBS, les préparations sont incubées pendant 1 heure à TA avec les anticorps secondaires : l'anticorps anti-IgM ( $\mu$  spécifique) de souris conjugué au TexasRed (Jackson) dilué au 1/100 ; l'anticorps anti-IgG de rat conjugué à l'Alexa fluor 488 (Molecular Probes) dilué au 1/400.

Pour toutes les immunofluorescences (sur formes procyclique et sanguine), l'ADN du noyau et du kinétoplaste des cellules est marqué avec le DAPI (10  $\mu$ g/mL) pendant 2-3 minutes à TA. Les lames sont montées avec le kit « Slowfade light antifade » (Molecular Probes) et observées au microscope Zeiss Axioplan2 ou au microscope Zeiss Imager Z1, à l'objectif 100X ou 63X (NA 1.4). Les images ont été capturées avec une caméra Photometrics Coolsnap HQ2 et le logiciel Metamorph<sup>®</sup> et traitées via le logiciel ImageJ.

### **b) Chez les cellules U-2 OS et RPE-1**

Les lamelles comportant les cellules U-2 OS ou RPE-1 sont récupérées et lavées en tampon EMT (PIPES pH6.9 (60 mM), Hepes (25 mM), EGTA (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM)). Les cellules sont fixées au PFA à 3% dilué dans le tampon EMT pendant 10 minutes à TA, puis lavées 2 fois en PBS pendant 5 minutes. Elles sont perméabilisées pendant 10 minutes à TA dans un tampon perméabilisant (0.1% saponine, 10% SVF en PBS). Les cellules sont ensuite immuno-marquées.

Les cellules issues de culture traitées au nocodazole (20 µM) ou au froid (4°C) pendant 45 minutes. Ces différents traitements ont la capacité d'induire ou de favoriser la dépolymérisation des microtubules.

Pour extraire les cellules, après lavage en tampon EMT des lamelles sorties de culture, elles sont incubées dans un tampon d'extraction (0.5% Tritton X100, 10% glycérol dilué dans le tampon EMT) pendant 2 minutes. Puis fixées au PFA 3% dilué dans le tampon EMT pendant 10 minutes à TA. Les cellules sont ensuite neutralisées pendant 10 minutes avec de la glycine (100 mM en PBS). Après lavages et perméabilisation les cellules extraites sont immuno-marquées.

Différents anticorps primaires ont été utilisés : l'anticorps monoclonal 5F2B3 de souris anti-BILBO1 <sup>[130]</sup> dilué au 1/10 ; l'anticorps polyclonal de souris anti-BILBO1 (3960-E, produit au laboratoire) dilué au 1/500 ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-NTD BILBO1 <sup>[136]</sup> dilué 1/50 ; l'anticorps de souris anti-tubuline-α DM1A (Sigma) dilué au 1/500 ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-calnexine dilué au 1/500 ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-giantine dilué au 1/750 ; l'anticorps monoclonal de souris anti-vimentine V9 (Interchim) dilué au 1/250 ; l'anticorps monoclonal de souris anti-tubuline acétylée (Sigma) dilué au 1/2000 ; l'anticorps de lapin anti-péricentrine (Abcam) dilué au 1/1000 ; l'anticorps polyclonal de rat anti-FPC4 dilué au 1/250.

Après 2 lavages de 5 minutes en PBS, les cytosquelettes sont incubés 1 heure à TA avec l'anticorps secondaire dilué en PBS. Différents anticorps secondaires ont été utilisés : l'anticorps anti-IgG de souris conjugué à l'Alexa fluor 564 (Molecular Probes) dilué au 1/400, conjugué au FITC (Sigma) dilué au 1/100 ; l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué au TexasRed (Molecular Probes) dilué au 1/100, conjugué à l'Alexa fluor 594 (Molecular Probes) dilué au 1/400, conjugué au FITC (Sigma) dilué au 1/100 ; l'anticorps anti-IgG de rat conjugué à l'Alexa fluor 488 (Molecular Probes) dilué au 1/400. Pour marquer l'actine filamenteuse (actine-F), de la phalloïdine conjuguée à l'Alexa fluor 568 (Molecular Probes) dilué au 1/160 a été utilisée.

L'ADN du noyau des cellules est marqué avec le DAPI (0.25 µg/mL) pendant 4 minutes à TA. Les lames sont montées avec le kit « Slowfade light antifade » (Molecular Probes) et observées au microscope Zeiss Axioplan2 ou au microscope Zeiss Imager Z1, à l'objectif 100X ou 63X (NA 1.4). Les images ont été capturées avec une caméra Photometrics Coolsnap HQ2 et le logiciel Metamorph<sup>®</sup> et traitées via le logiciel ImageJ.

## 2. Microscopie électronique

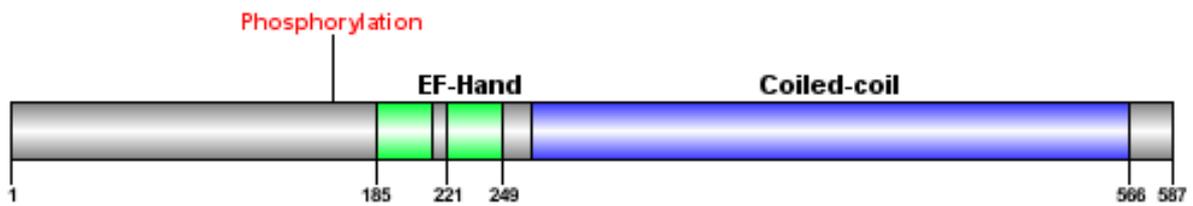
50 mL de cellules de *T. brucei* (forme procyclique) surexprimant GFP-FPC4 ont été collectées (1000 g pendant 10 minutes). Le culot de cellules, conservé dans 500 µL de milieu, est repris dans 25 mL de tampon de fixation (4% de glutaraldéhyde, 4% PFA, 0.5% d'acide tannique, dilué dans 0.1 M de tampon cacodylate pH7.4 (filtré à 0.4 µm). Incubation de 2 heures à TA.

Les cellules sont centrifugées (1000 g pendant 10 minutes) et lavées 3 fois pendant 10 minutes dans 25 mL de tampon 0.1 M cacodylate pH7.4. Suite à ces lavages, une post-fixation de 2 heures (TA, sous hotte chimique) est réalisée dans 8 mL de 1% OsO<sub>4</sub> (tétroxyde d'osmium) dilué dans le tampon 0.1 M cacodylate pH7.4. Les cellules sont lavées 3 fois pendant 10 minutes selon le même protocole que précédemment, puis lavées 3 fois 10 minutes dans 25 mL d'eau milliQ. Elles sont ensuite incubées avec 1% d'acétate d'uranyle à 4°C, pendant la nuit.

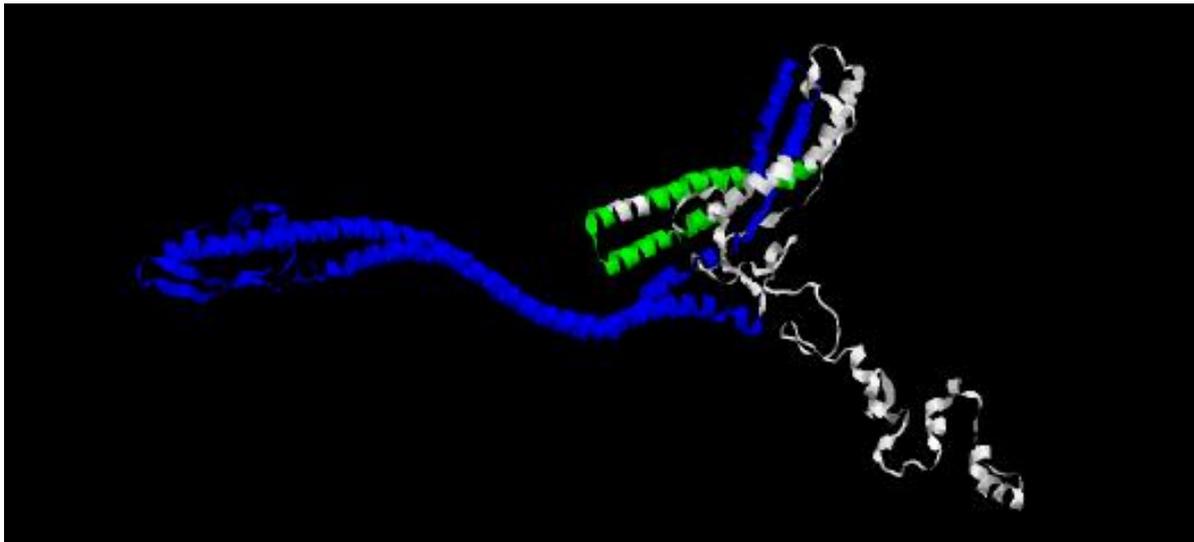
Après ce traitement, les cellules sont collectées et déshydratées en présence d'un gradient croissant d'éthanol (30%, 50%, 70%, 90%, 3 fois en 100%) pendant 30 minutes. Pour permettre l'imprégnation des cellules dans une résine, différents mélanges éthanol/résine Spurs (EMS) (70/30 ; 50/50 ; 30/70 ; 10/90 ; 0/100) ont été mis en incubation avec les cellules pendant 3 heures pour chaque mélange. Ce protocole est suivi d'incubation d'1 heure TA dans 100% de résine et d'une seconde incubation pendant la nuit à TA dans 100% de résine. Le mélange cellules/résine est polymérisé à 60°C pendant la nuit.

Des coupes ultra-fines de 70 nm sont réalisées au microtome à l'aide d'un couteau de diamant. Ces coupes sont colorées 5 minutes à TA avec du citrate de plomb, puis 30 minutes à 60°C avec 5% d'acétate d'uranyle dilué dans 1% d'acide acétique. Après lavages, les coupes sont observées au microscope électronique à transmission « Technai 12 120Kv ». Les images ont été prises *via* une caméra CCD GATAN 11Mpx et traitées par le logiciel imageJ.

# **RESULTATS**



**Figure 28 : Schématisation de la protéine BILBO1.** Présence de 2 motifs EF-Hand : aa. 185 – 213 et 221 – 249, large domaine coiled-coil : aa. 263 – 566. Présence d'un site de phosphorylation : aa. S163, détecté en spectrométrie de masse.



**Figure 29 : Prédiction de la structure secondaire de BILBO1 via le logiciel Phyre2 (indice de confiance >80%).** Le domaine coiled-coil est coloré en bleu et les motifs EF-Hand sont colorés en vert. La conformation du domaine coiled-coil est majoritairement en hélices- $\alpha$ . Ce logiciel prédit un rapprochement d'une partie du coiled-coil vers le domaine N-terminal de la protéine.

# BILBO1 : protéine du FPC

---

## I. Structure primaire et analyse *in-silico* de BILBO1

BILBO1 est une protéine du cytosquelette associée au flagelle de *T. brucei*. En effet, cette protéine est retrouvée dans plusieurs protéomes flagellaires (flagellome) <sup>[86, 143]</sup> du parasite. C'est la première protéine identifiée au collier de la poche flagellaire (FPC), ce qui en fait le premier marqueur de cette structure. Elle comporte deux motifs de fixation au calcium de type EF-Hand (aa. 185 – 213 et 221 – 249) ainsi qu'un large domaine coiled-coil (aa. 266 – 563) (Figure 29). La présence de ces domaines suggère une régulation de la protéine BILBO1 *via* la fixation du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ainsi qu'une capacité d'oligomérisation ou d'interaction avec d'autres protéines (Figure 28).

Les motifs EF-Hand ont été découverts et décrits pour la première fois par Kreysinger et Nockolds en 1973 <sup>[168]</sup>. Ces motifs sont généralement composés de deux hélices- $\alpha$  qui entourent une boucle de 12 résidus. Les acides aminés impliqués dans la fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  sont généralement chargés négativement (Glu : E et Asp : D) <sup>[169, 170]</sup>. La plupart des motifs EF-Hand fonctionnels étudiés, sont présents par paire au sein des protéines. Ils sont impliqués dans la conformation correcte de celles-ci ou leur interaction avec d'autres protéines <sup>[169]</sup>.

Les domaines coiled-coil, retrouvés chez de nombreuses protéines de fonctions diverses, sont impliqués dans les interactions protéines-protéines <sup>[171, 172]</sup>. Ils se composent de 2 à 5 hélices- $\alpha$  capables d'interagir entre elles via des interactions hydrophobes et ioniques. Chaque spire d'hélices comporte 7 acides aminés notés de *a* à *g*. Lors de la formation de dimère d'hélices, les résidus notés *a* et *d* de chaque hélice, généralement non-polaires, permettent d'établir des interactions hydrophobes. Les résidus en position *e* et *g* sont impliqués dans des interactions ioniques qui permettent d'orienter les hélices en conformation parallèle ou antiparallèle. Ces différentes interactions assurent la stabilité du coiled-coil <sup>[171, 172]</sup>.

Une analyse en spectrométrie de masse réalisée par le laboratoire, sur la forme procyclique de *T. b. brucei*, a également révélé la présence d'une phosphorylation sur la sérine en position 163 (Figure 28). De plus, l'analyse du phospho-protéome (protéines phosphorylées) du parasite *T. cruzi* révèle également la présence de cette phosphorylation chez l'homologue de BILBO1 <sup>[173]</sup>. Cette modification post-traductionnelle pourrait jouer un rôle dans la régulation et/ou la stabilité de BILBO1.

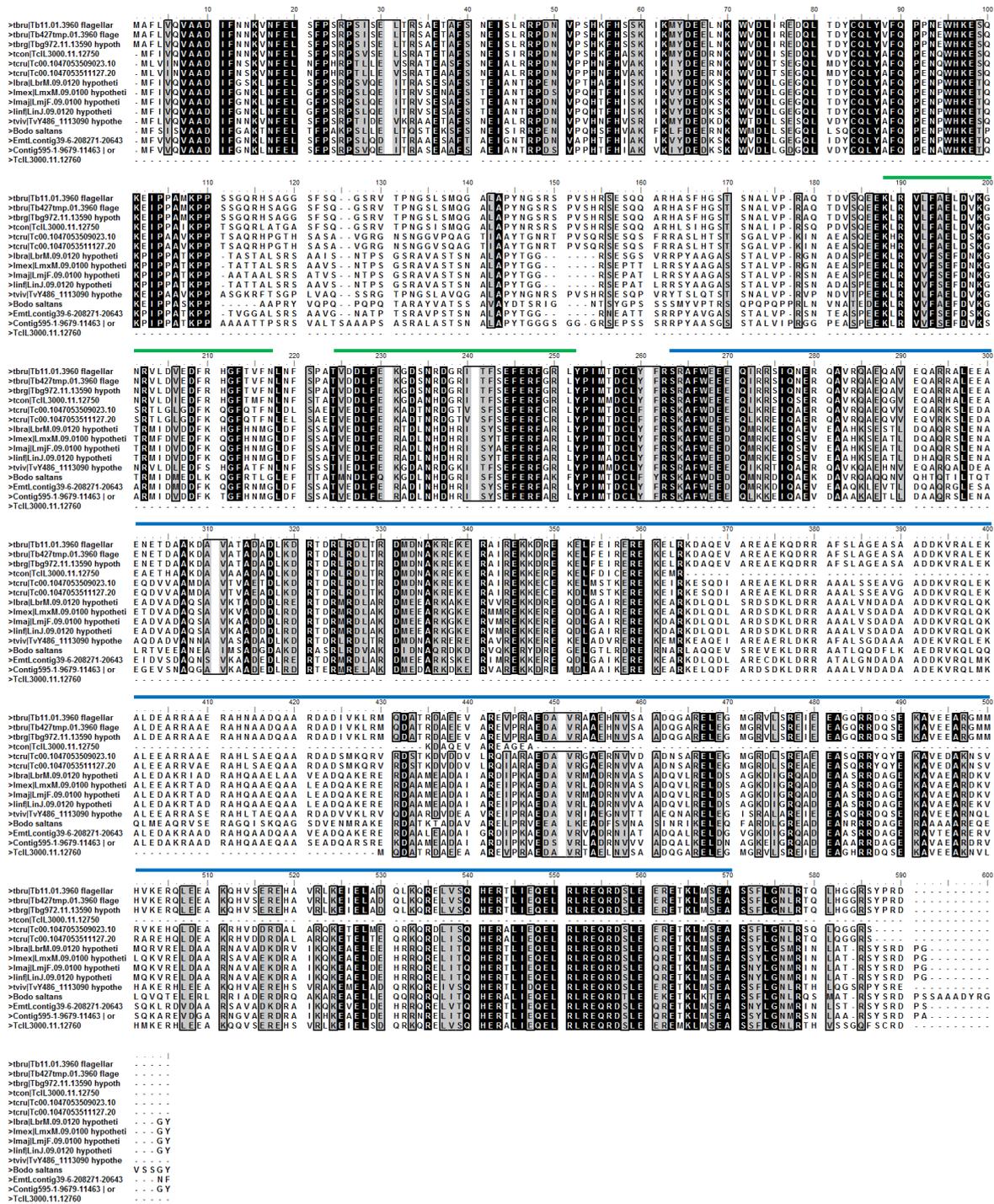


Figure 30 : Alignement de BILBO1 et de ses 15 homologues présents chez les *Kinetoplastidae*. Alignement de BILBO1 et ses homologues *via* le logiciel « BioEdit ». Les motifs EF-Hand sont repérés en vert (trait au-dessus du motif) et le coiled-coil en bleu.

La prédiction de la structure de BILBO1 via le logiciel Phyre2 <sup>[174]</sup> révèle une structure majoritairement en hélices- $\alpha$  (Figure 29). Ce résultat n'est pas surprenant compte-tenu de la présence d'un domaine coiled-coil couvrant plus de la moitié de la protéine (aa. 266-563). L'analyse de ce domaine *via* le logiciel MultiCoil <sup>[175]</sup> fait apparaître 3 régions dont l'organisation diffère au sein du domaine coiled-coil. Ce logiciel permet de prédire l'organisation en dimères ou trimères des coiled-coil. Chez BILBO1, une structure dimérique est prédite entre les acides aminés 375 à 435 et une structure trimérique pour la région 265 - 339. Ces analyses offrent des pistes de réflexion, mais ne permettent pas de conclure sur la véritable conformation de BILBO1.

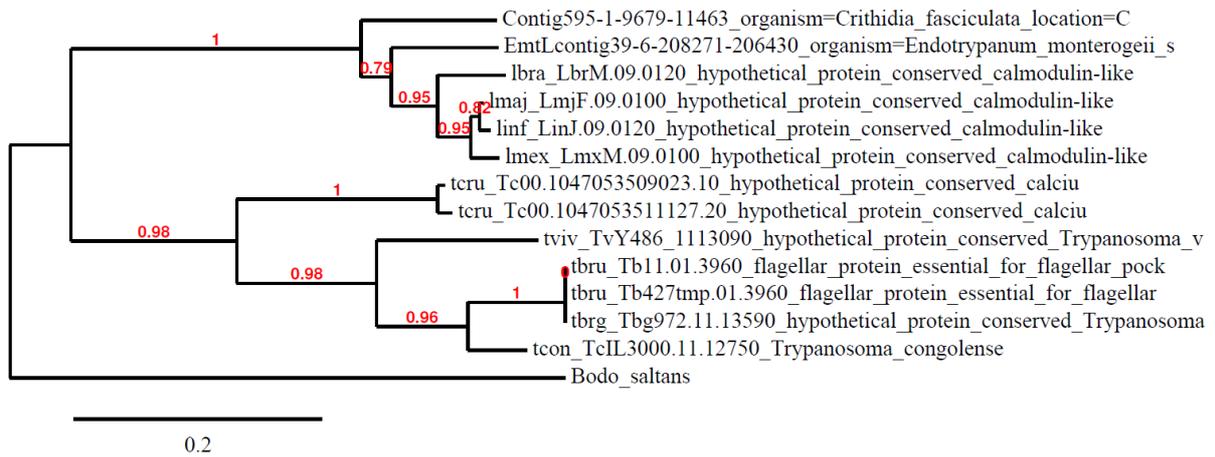
De plus, une analyse *in-silico* effectuée contre des bases de données génomiques a permis d'identifier 15 orthologues de BILBO1 (Figure 30), présents uniquement chez les organismes de la famille des *Kinetoplastidae* : *T. brucei* sp. (100% d'identité), *T. congolense* (86% d'identité), *T. cruzi* (68% d'identité), *T. vivax* (75% d'identité), *Leishmania major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tarentolae* (56% d'identité), *Endotrypanum* (55% d'identité), *Crithidia fasciculata* (53% d'identité), *Bodo saltans* (46% d'identité). L'homologue présent chez *Bodo saltans* est le plus éloigné phylogénétiquement de BILBO1 (Figure 31). Les acides aminés du domaine N-terminal et des motifs EF-Hand sont très conservés entre les différentes espèces. Il est intéressant de noter que chez *T. congolense*, l'homologue de BILBO1 (*TcBILBO1*) fait 373 acides aminés, soit environ 200 acides aminés de moins que chez *T. brucei*. Cependant, l'analyse de l'environnement génétique du gène codant pour *TcBILBO1* permet de constater la présence à sa suite d'un pseudogène codant pour une séquence homologue à celle des 200 derniers acides aminés de BILBO1. Cette analyse suggère une possible erreur lors de l'annotation du génome de *T. congolense* ou l'improbable présence d'un intron au sein de ce gène.

## II. Analyse fonctionnelle de BILBO1

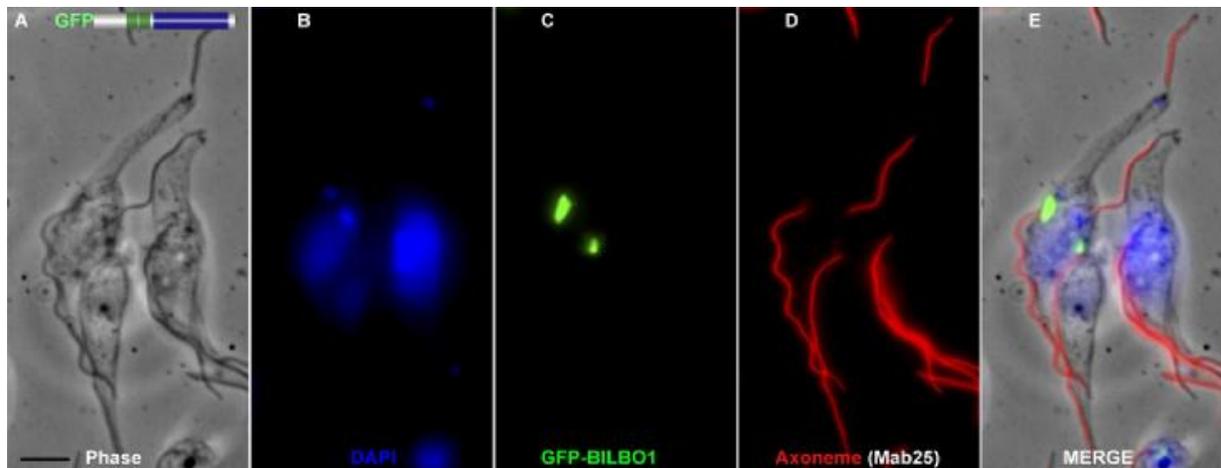
*Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de soumission (voir Annexe)*

Afin de caractériser fonctionnellement BILBO1, trois approches ont été envisagées pour permettre d'analyser la possible interaction BILBO1-BILBO1 :

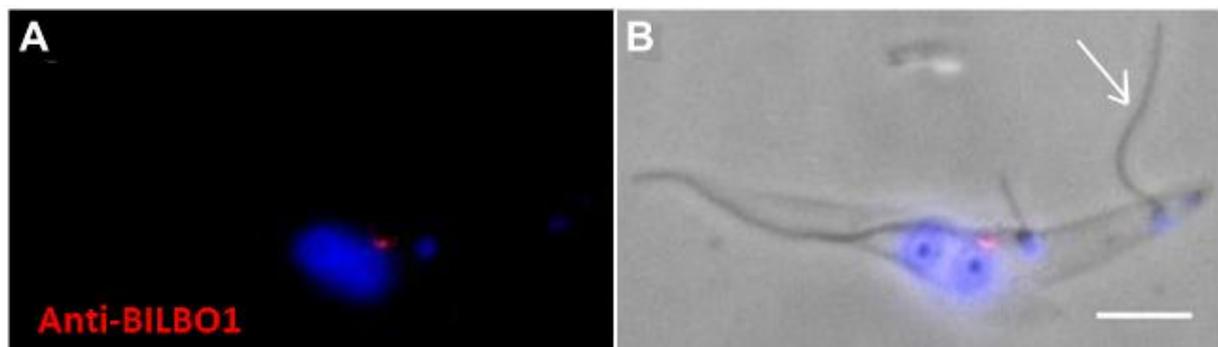
- chez le trypanosome
- en double-hydrate chez la levure
- en système hétérologue (expression en cellules mammifères)



**Figure 31 :** Arbre phylogénétique des 15 homologues de BILBO1 présents chez les différentes espèces de *Kinetoplastidae*, réalisé via le logiciel « Phylogeny.fr » (Dereeper *et al.*, 2008).



**Figure 32 :** La surexpression de GFP-BILBO1 inhibe la division cellulaire de *T. brucei*. Images d'immunofluorescence de cytosquelettes de cellules ayant surexprimée pendant 48 heures GFP-BILBO1, avec marquage de l'ADN au DAPI (bleu), GFP-BILBO1 (vert), Mab25 Anti-*TbSAXO* (marqueur de l'axonème, rouge). La surexpression de GFP-BILBO1 induit des phénotypes similaires à ceux observés après ARNi de *BILBO1* : cellules avec flagelles détachés à l'extrémité postérieure sans poche flagellaire ou FPC associé. Barre d'échelle 5µm.



**Figure 33 :** Images d'immunofluorescence avec l'anticorps Anti-BILBO1 sur des cytosquelettes de cellules (*T. brucei*) induites pour l'ARNi de *BILBO1* (36 heures d'induction). (A) : condition wild-type et (B) : cellules induites pour l'ARN interférence de *BILBO1* pendant 48 heures. On observe une extension de l'extrémité postérieure de la cellule ainsi que la présence d'un flagelle détaché à cette extrémité (flèche blanche) Barre d'échelle=5 µm.

## A. Expression chez les trypanosomes

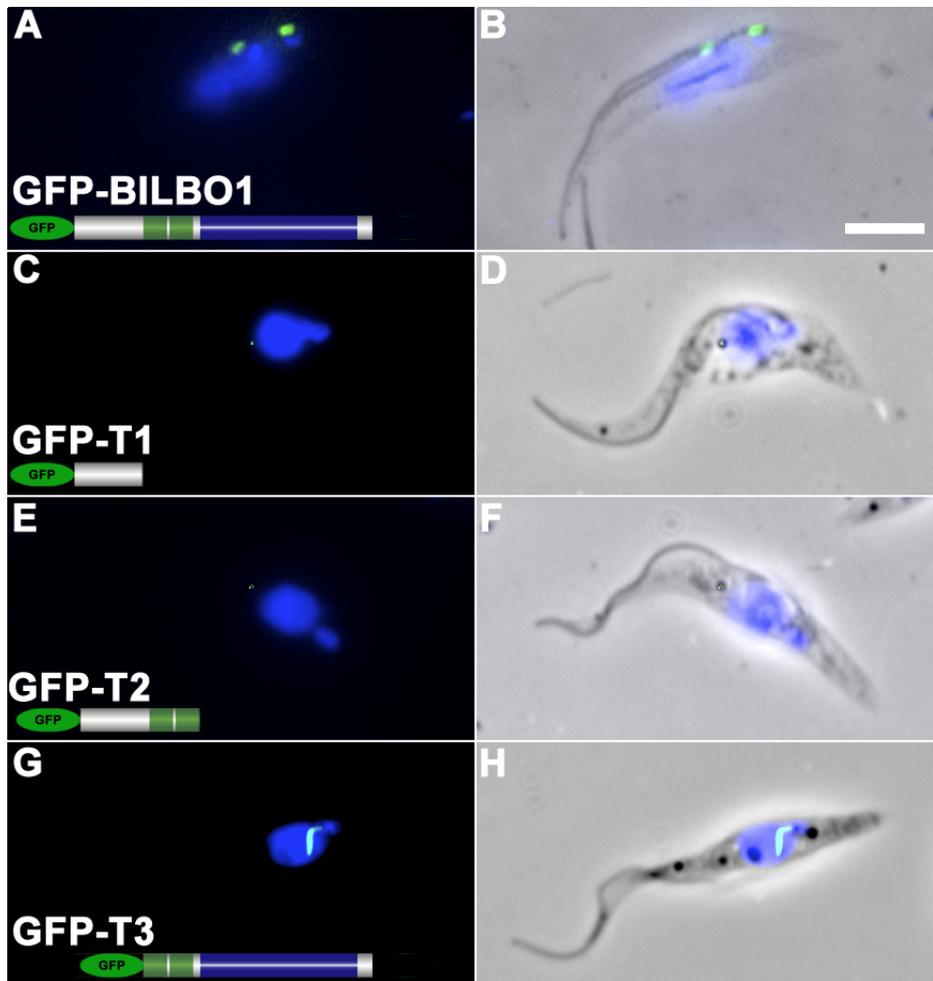
La GFP (Green Fluorescent Protein, GFP) est une protéine qui émet une fluorescence verte après excitation avec des rayons de longueur d'onde de 435 nm. Elle a été initialement identifiée et isolée chez la méduse *Aequorea victoria* <sup>[176]</sup>. Cette protéine auto-fluorescente a été fusionnée à BILBO1 afin de suivre la localisation BILBO1 dans la cellule.

Précédemment, il a été montré que la protéine de fusion BILBO1-GFP (étiquette en C-terminal) était localisée dans une structure en anneau au niveau du FPC (résultats similaires lorsque l'étiquette GFP est en N-terminal) <sup>[130]</sup>. Néanmoins, suite à une surexpression plus longue que 24h, les cellules présentent un phénotype similaire à celui observé lors de l'ARNi de BILBO1 (cellules comportant des flagelles détachées à leur extrémité postérieure étendue) (Figure 32 et 33). La surexpression de BILBO1-GFP, ainsi que celle de GFP-BILBO1 induit un phénotype dominant négatif, se traduisant par une inhibition de la biogenèse de la FP et du FPC. La croissance cellulaire est inhibée et on observe une accumulation de BILBO1-GFP dans une structure sphérique, insoluble et compacte proche du FPC. Cette accumulation de la protéine de fusion au FPC, pourrait bloquer la division et la ségrégation de la poche ainsi que celle du FPC. Des résultats similaires ont été observés avec la protéine de fusion DsRed-BILBO1 (étiquette en N-terminale).

Nous avons cherché à déterminer le rôle de BILBO1 au sein du FPC et à détailler son implication dans la formation de la structure. Les structures primaire et secondaire de BILBO1 ne permettent pas de prédire la fonction de cette protéine. Néanmoins, quelques pistes peuvent être envisagées du fait de la présence de domaines fonctionnels caractérisés. BILBO1 possède deux motifs putatifs de fixation au calcium de type EF-Hand incluant les acides aminés 185 à 213 et 221 à 249. Ceci suggère une possible régulation liée à la fixation du calcium à cette protéine.

BILBO1 comporte également un large domaine coiled-coil en C-terminal incluant les acides aminés 263 à 566 (Figure 28), qui pourrait être impliqué dans une ou plusieurs interactions protéine-protéine. Afin de mettre en évidence les rôles des domaines putatifs de BILBO1, des formes tronquées de la protéine ont été générées et exprimées chez les formes procycliques de *T. brucei*.

- La première troncation (aa. 1 à 170), notée T1 et fusionnée à la GFP, est localisée dans le cytoplasme de la cellule. En effet, après extraction de la membrane plasmique et du cytoplasme, on n'observe plus de fluorescence liée à T1-GFP (Figure 34A-D).



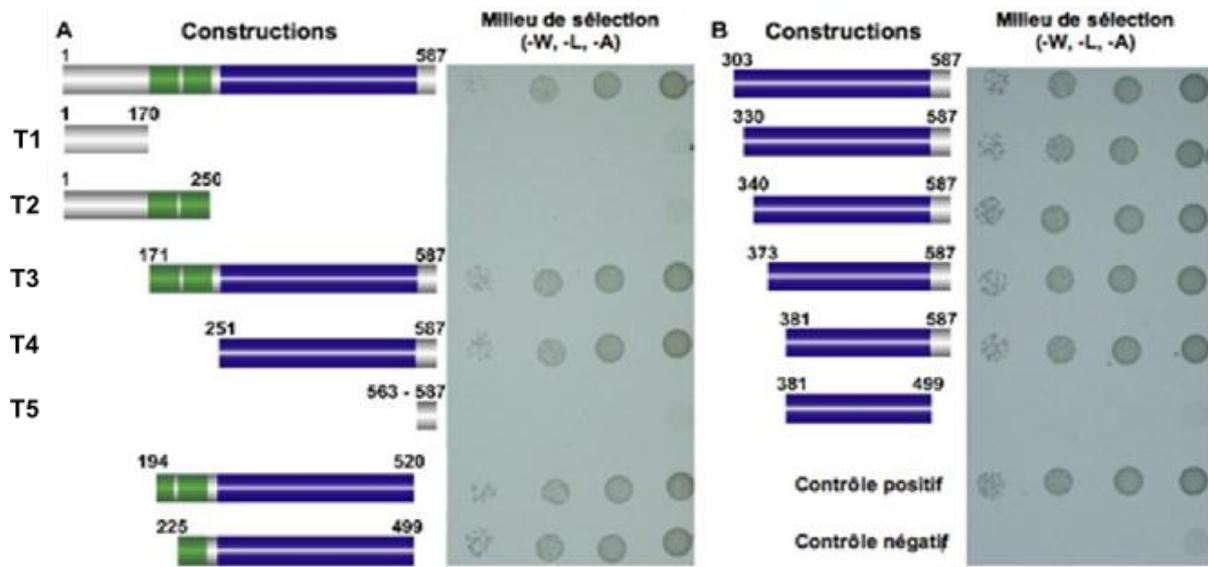
**Figure 34 : Le domaine coiled-coil de BILBO1 forme des polymères chez le parasite forme procyclique.** Images d'immunofluorescence de cytosquelettes de *T. brucei* exprimant des domaines de BILBO1 étiqueté GFP en N-terminal. (A et B) Cellules wild-type marquées par l'anticorps monoclonal de souris anti-BILBO1. (C et D) Cellules exprimant la troncation T1-GFP, (E et F) cellules exprimant la troncation T2-GFP, (G et H) cellules exprimant la troncation T3-GFP. Après extraction de la membrane et du cytoplasme de la cellule, on n'observe plus la localisation de T1 et T2-GFP. T3-GFP est localisé au collier mais la structure du polymère formé n'est pas annulaire. Le domaine T3 est nécessaire à la localisation au collier mais n'est pas suffisant pour la formation de la structure annulaire du FPC. Barre d'échelle= 5  $\mu$ m.

- Des résultats similaires ont été obtenus pour la construction T2-GFP (aa. 1 à 250), celle-ci comporte les deux motifs EF-Hand de la protéine. L'absence de fluorescence après extraction de la membrane et du cytoplasme suggère que ces deux domaines (T1 et T2) ne sont pas suffisants pour permettre un ciblage et/ou une fixation au niveau du FPC (Figure 34E-H).
- La forme tronquée de BILBO1, T3-GFP comportant les motifs EF-Hand, le domaine coiled-coil ainsi que le domaine C-terminal, est suffisante pour obtenir la localisation de la protéine de fusion au niveau du FPC (Figure 34I-L). De plus, une expression plus longue de cette protéine (> 24 heures d'induction) conduit à la formation de polymères linéaires associés au FPC. Ceci implique que ces domaines, présents dans la construction T3-GFP (aa. 171 – 587), confèrent une capacité de polymérisation et de possible interaction avec d'autres protéines du collier. Il est probable que la polymérisation associée à T3 fasse intervenir le domaine coiled-coil.

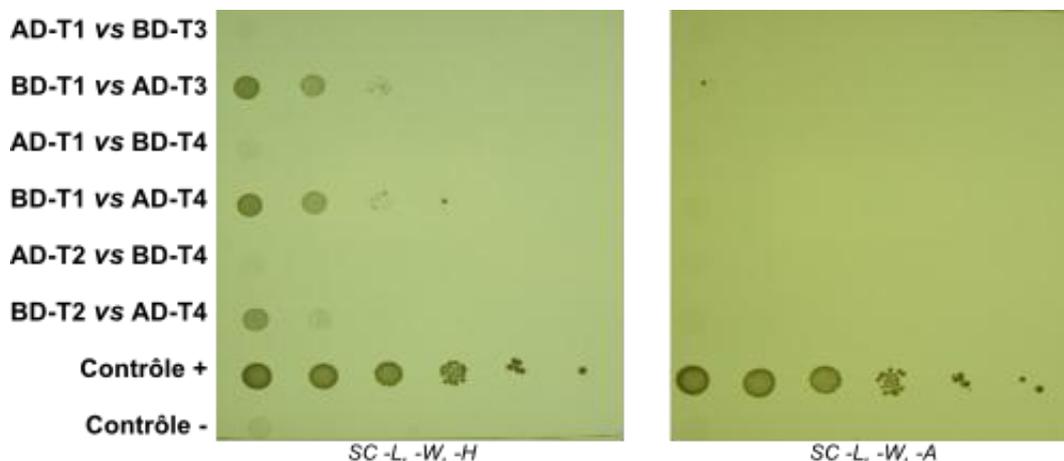
Ces résultats montrent que le domaine N-terminal de BILBO1 n'est pas impliqué dans l'adressage au collier mais qu'il participe à la conformation correcte de la structure annulaire de BILBO1. En effet, en absence de ce domaine la protéine est toujours exprimée au FPC, néanmoins elle forme des polymères linéaires atypiques ayant pour origine la FPC. L'analyse de la capacité de polymérisation de BILBO1 a été poursuivie par une étude en système double-hybride chez la levure <sup>[161]</sup> dans le but d'explorer la possibilité d'une interaction BILBO1-BILBO1 et mettre en lumière les domaines qui pourraient être impliqués.

## **B. Analyse en double-hybride**

Le double-hybride est une technique d'étude des interactions directe entre deux protéines <sup>[160, 161]</sup>. Généralement, cette méthode est réalisée au sein de la levure et elle fait intervenir des protéines de fusion, l'une comportant le domaine d'activation du facteur de transcription Gal4 et l'autre comportant le domaine de fixation à l'ADN de Gal4. Ainsi, le rapprochement physique de ces deux domaines, *via* une interaction protéine-protéine, permet d'activer la transcription de gènes dits rapporteurs placés sous la dépendance d'un promoteur GAL4 <sup>[160]</sup>. Dans le système utilisé pour cette étude, ces gènes rapporteurs sont des gènes d'auxotrophie pour l'adénine et l'histidine, un gène de résistance à l'auréobasidine A et le gène d'expression de l' $\alpha$ -galactosidase. Cette méthode a été utilisée afin d'étudier la potentielle oligomérisation de type BILBO1-BILBO1 ainsi que les domaines impliqués dans celle-ci (*travail réalisé en collaboration avec le Dr. Annelise Sahin, UMR-5234*).



**Figure 35: Analyse de l'interaction BILBO1-BILBO1 par double-hybride dans les levures.** Interactions entre BILBO1 et les différentes tronctions sur un milieu de sélection sans adénine. Seules les tronctions T1, T2, T5 et T13 ne peuvent pas interagir avec BILBO1. Le contrôle positif représente l'interaction positive entre l'antigène-T et la protéine p53, le contrôle négatif représente l'absence d'interaction entre la lamine et l'antigène-T. Aucune auto-activation n'a été observée lors des contrôles préliminaires.



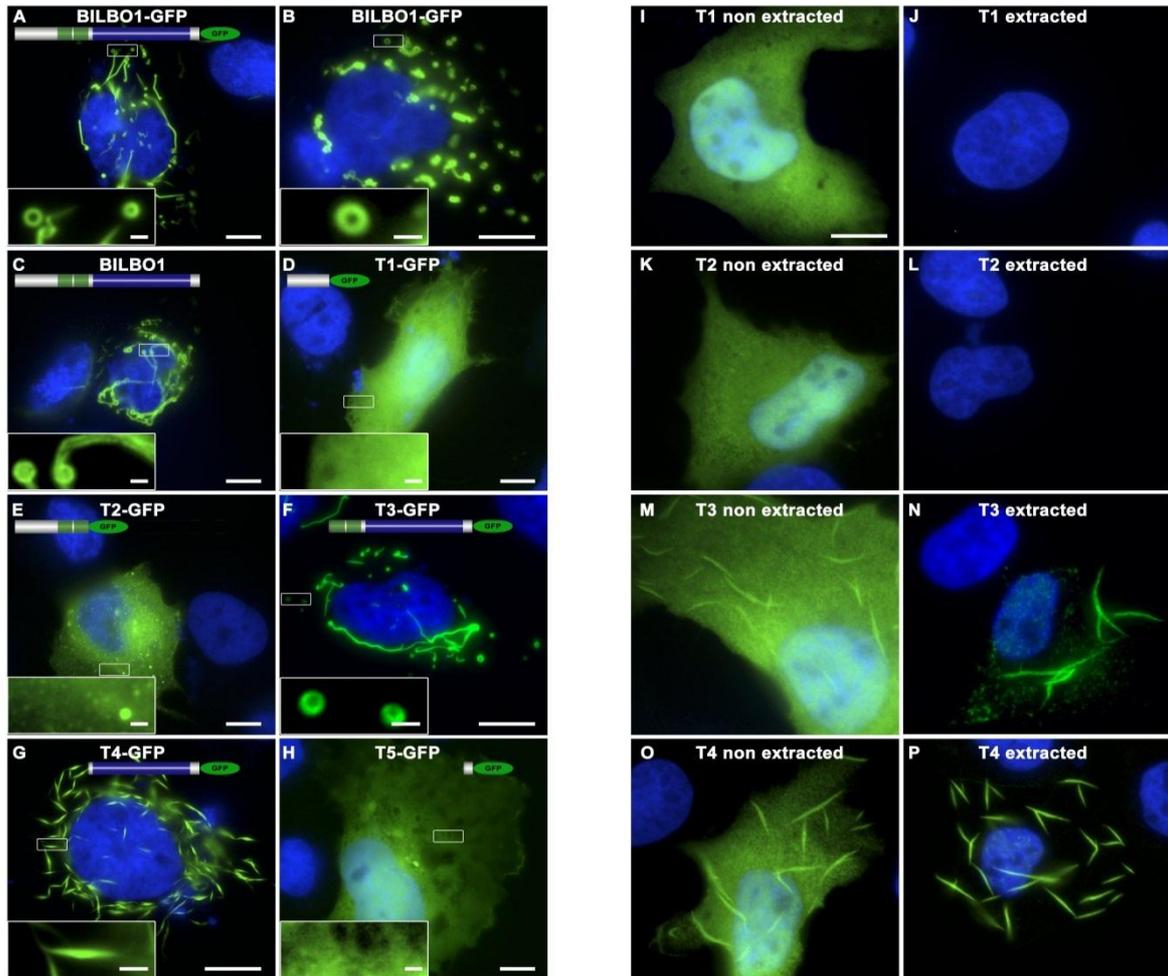
**Figure 36 : Analyse de l'interaction entre différents domaines de BILBO1 par double-hybride dans les levures.** Interactions entre différentes tronctions (T1, T2, T3 et T4) sur un milieu de sélection sans histidine (SC -L, -W, -H) ou sans adénine (SC -L, -W, -A). Sur le milieu sans adénine, aucune interaction n'a été observée entre les domaines testés. Sur le milieu sans histidine, seul T1 fusionné au domaine BD interagit avec T3 ou T4 et seul T2 fusionné au domaine BD interagit avec T4. Le contrôle positif représente l'interaction positive entre l'antigène-T et la protéine p53, le contrôle négatif représente l'absence d'interaction entre la lamine et l'antigène-T.

Différentes interactions ont été testées impliquant la forme entière de BILBO1 et des formes tronquées de la protéine (Figure 35). Ces travaux ont confirmé une interaction entre les formes entières de BILBO1. Les domaines précédemment étudiés chez le trypanosome ont été testés et aucune interaction n'a été trouvée entre BILBO1 et les tronctions T1 (aa. 1 -170) et T2 (aa. 1 -250). Cependant, la tronction T3 (aa. 171 – 587) interagit avec BILBO1 (Figure 35A), ce qui conforte les résultats obtenus chez le trypanosome et démontre l'implication du domaine coiled-coil dans l'interaction BILBO1-BILBO1.

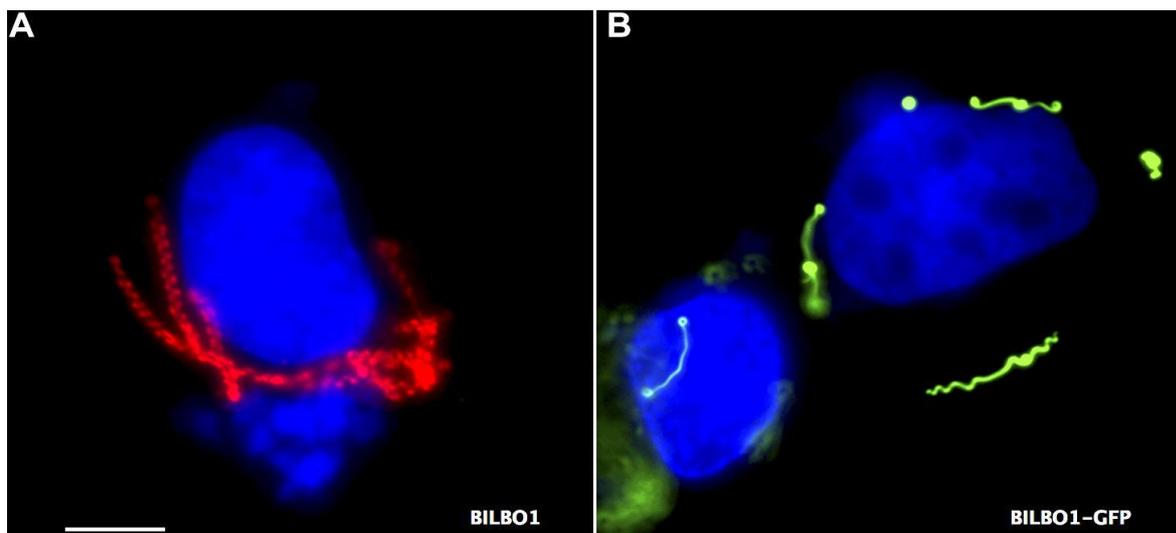
Afin de mettre en évidence le domaine minimal impliqué dans cette interaction, plusieurs tronctions excluant le domaine N-terminal ainsi que les motifs EF-Hand de BILBO1 (aa. 1 – 250) ont été testés. Des tronctions notées T4 à T13 (six de ces tronctions, T8 à T12 résultent des résultats obtenus suite à l'analyse parallèle réalisée par la société Hybrigenics et T13 représente le domaine d'interaction minimale théorique d'interaction avec BILBO1) sont testées en double-hybride (Figure 35A-B). Toutes les tronctions, excepté T13 (aa. 381 – 499, domaine minimal d'interaction théorique) et T5 (aa. 563 – 587, domaine C-terminal), interagissent avec BILBO1. L'absence d'interaction entre T13 et BILBO1 peut être due à la petite taille de T13 (118 acides aminés) et son incapacité à adopter une conformation favorable à l'établissement de cette interaction. Il est également possible que la protéine de fusion ne soit pas exprimée ou qu'elle ne puisse pas être adressée au noyau (lieu d'interaction).

Ces résultats montrent que les 206 derniers acides aminés de BILBO1, constituant le domaine coiled-coil, sont nécessaires et suffisants à l'établissement d'une interaction BILBO1-BILBO1. Le domaine coiled-coil de BILBO1 est donc directement impliqué dans l'interaction de la protéine avec elle-même.

Nous avons également testé si les différents domaines caractérisés chez BILBO1 pouvaient interagir entre eux. Nous avons donc étudié les interactions possibles entre le domaine N-terminal et le domaine coiled-coil, soit T1 *vs* T3, T1 *vs* T4 ainsi que T2 *vs* T4. Pour chacune des combinaisons testées, seul un sens d'interaction s'est révélé positif et ce seulement sur le milieu le plus sensible (milieu sans histidine) (Figure 36). Ce dernier résultat ne permet pas de conclure sur l'existence réelle d'une interaction entre les domaines N-terminal et coiled-coil de la protéine. Il faudra également tester l'interaction de chaque domaine avec lui-même.



**Figure 37 : Expression dans les cellules U-2 OS de BILBO1 et de ses tronçons fusionnés ou non à la GFP en C-terminal.** (A et B) Cellules exprimant BILBO1-GFP pendant 6 heures, (C) cellules exprimant BILBO1 sans étiquette pendant 6 heures. (D – H) cellules exprimant les tronçons T1 à T5 fusionnée à la GFP. (I – P) Cellules exprimant les tronçons T1, T2, T3 et T4 sans étiquette. Immuno-marquage avec l’anticorps anti-NTD BILBO1 et un anticorps polyclonal de souris anti-BILBO1 produit au laboratoire. (J, L, N et P) cellules ayant subi un traitement au détergent neutre permettant d’extraire la membrane des cellules. Barre d’échelle 10  $\mu\text{m}$ , barre d’échelle des agrandissements 1  $\mu\text{m}$ .



**Figure 38 : Structure hélicoïdale de BILBO1 et BILBO1-GFP chez les U-2 OS.** (A) Cellule ayant exprimée BILBO1 pendant 24 heures et immuno-marquée avec Anti-BILBO1 : présence de longues hélices. (B) cellules ayant exprimées BILBO1-GFP pendant 6 heures : présence de spirales irrégulières. Barre d’échelle 10  $\mu\text{m}$ .

## C. Expression en système hétérologue

### 1. Forme entière de BILBO1

Les résultats précédents laissent entrevoir une implication de BILBO1 dans la structure du FPC, via sa capacité à former des polymères. Dans le but d'explorer les propriétés de BILBO1, nous avons exprimé cette protéine (étiquetée avec la GFP ou non), en système mammifère, dans des cellules d'ostéosarcome humain de type U-2 OS <sup>[148]</sup>. *BILBO1* a été cloné dans un vecteur plaçant l'expression du gène d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur viral (promoteur CMV <sup>[154]</sup>). Après transfection transitoire, le ou les vecteurs sont présents de façon ectopique chez la cellule <sup>[153]</sup>. De façon surprenante, nous avons observé qu'après une expression de 24 heures post-transfection, BILBO1 mais également BILBO1-GFP forment de longs polymères présentant pour la plupart des structures de type hélicoïdale et linéaire (Figure 37A-C). Ces polymères insolubles se localisent à proximité du noyau et se propagent dans la cellule. Même après extraction de la membrane et du cytoplasme, ces structures restent présentes dans la cellule. Nous avons pu observer, qu'une plus longue expression de BILBO1 (> 24 heures) était toxique pour la cellule. En effet, à ce stade les polymères de BILBO1 ont envahi toute la cellule, ce phénomène pourrait prévenir la division cellulaire. La GFP seule, exprimée chez les cellules U-2 OS est diffuse dans le cytoplasme <sup>[177]</sup>.

La capacité de polymérisation de BILBO1 pourrait intervenir dans la conformation de la structure annulaire du FPC chez *T. brucei*. Nous avons voulu observer les prémices des polymères formés par BILBO1 (étiqueté ou non) après une plus courte expression (6 heures) en cellule U2OS. De façon intrigante, BILBO1-GFP est capable de former une structure annulaire d'un diamètre moyen de 700 nm. Ces anneaux sont observés de façon isolés ou liés à de longs polymères, au sein de la cellule. Nous avons constaté que 6 heures d'expression étaient optimales à la formation d'un grand nombre de structures annulaires. Ces résultats mis en relation avec ceux de BILBO1 non-étiqueté, montrent que la GFP fusionnée à BILBO1, favorise la polymérisation annulaire de BILBO1.

En effet, non-étiquetée BILBO1 ne forme pas d'anneaux, mais des structures de type sphériques de 1 µm de diamètre environ, hélicoïdales et/ou linéaires. Notons que dans les deux conditions d'expression, avec ou sans étiquette, BILBO1 forme des structures linéaires et hélicoïdales. Cependant lorsqu'on compare les spirales de BILBO1 et celles de BILBO1-GFP, des différences apparaissent, notamment concernant la longueur et la régularité de la spirale. En effet, BILBO1 (sans étiquette) forme des structures hélicoïdales dont la longueur variable (Figure 38A).

Au contraire, lorsque BILBO1 est étiqueté GFP, les structures hélicoïdales formées sont de taille plus modeste et on observe au sein de la même structure des variations au niveau du pas entre chaque spire et le diamètre de celles-ci (Figure 38B). Ces résultats attestent des propriétés intrinsèques de BILBO1 à polymériser et suggèrent que la fusion à la GFP stabilise ou favorise la formation d'anneaux dont le diamètre est proche de celui du FPC (diamètre d'environ 500 nm).

## 2. Troncations de BILBO1

Afin de mettre en lumière les domaines impliqués dans la polymérisation annulaire de BILBO1, des troncations de la protéine ont été fusionnées à la GFP et exprimées dans les U-2 OS (*travail réalisé en collaboration avec le Pr. Ed Byard, Université Winnipeg, Canada*). Cinq troncations T1 (aa. 1 - 170), T2 (aa. 1 - 250), T3 (aa. 171 - 587), T4 (aa. 251 - 587) et T5 (aa. 565 - 587) ont été exprimées de façon indépendante, durant 6 heures dans les cellules mammifères (Figure 37).

Les troncations T1 (domaine N-terminal de la protéine, Figure 37D) et T5 (domaine C-terminal de la protéine, Figure 37H) ne forment pas de polymères. On observe une expression diffuse de ces protéines de fusion dans toute la cellule et après extraction des membranes et du cytoplasme, aucune fluorescence liée à la présence de ces protéines n'est observable, ce qui suggère que ces protéines sont solubles et possèdent pas de propriété de polymérisation.

Après expression de la troncation T2 (domaine N-terminal + motifs EF-Hand), on observe un marquage diffus dans la cellule ainsi que de petites accumulations. Après traitement au détergent, aucune fluorescence n'est visible dans les cellules, ce qui implique que T2 soit également soluble (Figure 37E).

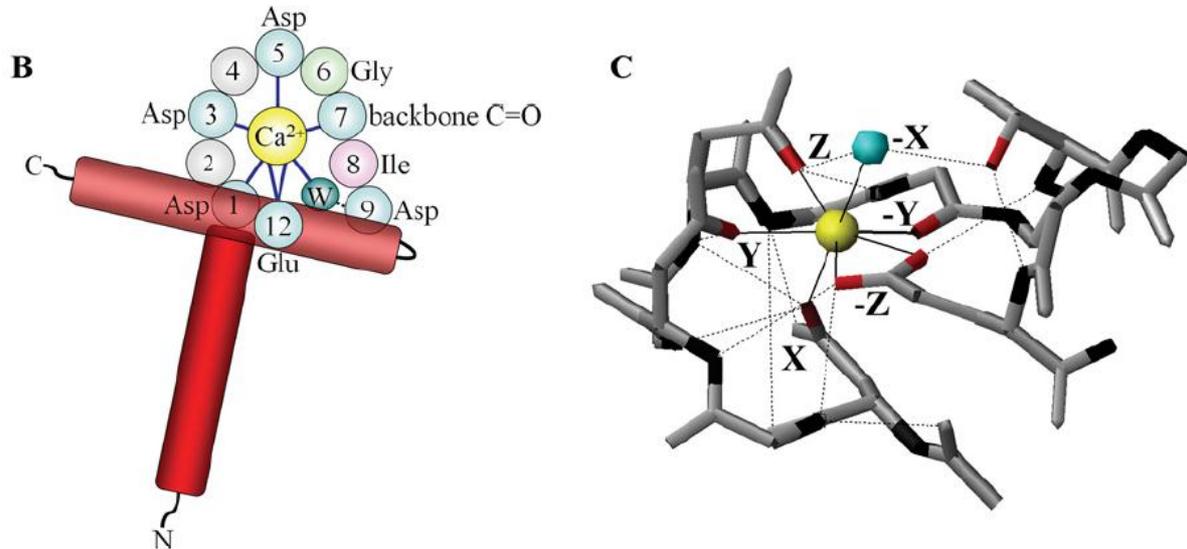
La troncation T3 (motifs EF-Hand + domaine coiled-coil + domaine C-terminal) produit de petites structures annulaires et ovoïdes ainsi que des structures linéaires dont la conformation se rapproche de celle de la forme entière de BILBO1 et BILBO1-GFP (Figure 37F). Ces structures restent présentes après traitement au détergent. Ce résultat suggère une capacité de polymérisation et de formation d'anneaux associée à T3.

La troncation T4 (domaine coiled-coil + domaine C-terminal) forme des longs et moyens fuseaux (forme type cure-dent) qui sont connectés les uns aux autres (Figure 37G). Comme T3, après extraction des membranes les polymères de T4 sont toujours visibles.

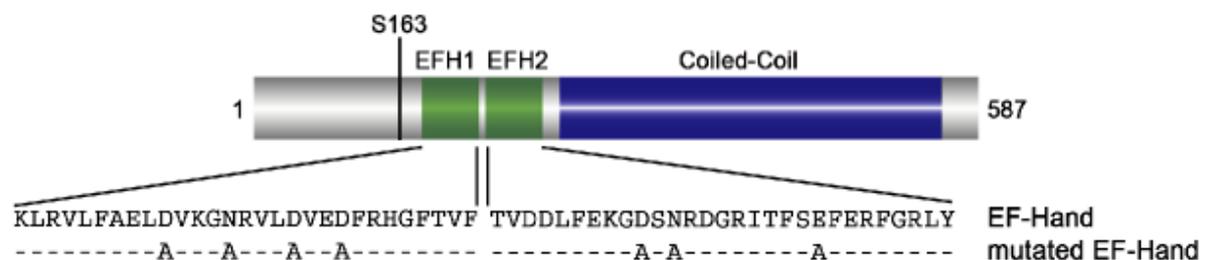
Ces résultats montrent l'implication directe du domaine coiled-coil dans la capacité de polymérisation de BILBO1.

**A**

EF-loop position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
coordinating ligand	X sc		Y sc		Z sc		-Y bb		-X sc*			-Z sc2
most common	Asp 100%	Lys 29%	Asp 76%	Gly 56%	Asp 52%	Gly 96%	Thr 23%	Ile 68%	Asp 32%	Phe 23%	Glu 29%	Glu 92%
also frequently observed		Ala Gln Thr Val Ile Ser Glu Arg	Asn	Lys Arg Asn	Ser Asn		Phe Lys Gln Tyr Glu Arg	Val Leu	Ser Thr Glu Asn Gly Gln	Tyr Ala Thr Leu Glu Lys	Asp Lys Ala Pro Asn	Asp



**Figure 39 : Représentation d'un motif EF-Hand de type canonique.** (A) : Tableau représentant les acides aminés majoritairement retrouvés dans la boucle impliquée dans la fixation au calcium, notamment au niveau des positions X, Y, Z, -Y, -X, -Z. (B) : Schéma de la structure EF-Hand fixant le calcium, en rouge sont représentés les hélices  $\alpha$ , en bleu sont représentés les acides aminés impliqués dans la fixation au calcium, en violet : les résidus hydrophobes. (C) : Structure du motif EF-Hand (bille jaune :  $\text{Ca}^{2+}$ , bille bleue : eau). D'après Gifford *et al.*, Biochemical Journal, 2007.



**Figure 40 : Schéma des mutations effectuées au niveau des motifs EF-Hand (EFH1 et 2) de la protéine BILBO1.** Les acides aminés impliqués dans la fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  (acides aminés chargés) sont mutés en alanine (acide aminé non-polaire). Ces mutations inhibent la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$ .

De plus, bien que le domaine N-terminal de BILBO1 (motif de fixation au calcium EF-Hand inclus) ne soit pas suffisant pour permettre une polymérisation, il semble nécessaire pour permettre d'établir une polymérisation de type annulaire, sphérique ou hélicoïdale de la protéine. Des résultats similaires ont été observés après expression des différentes troncations sans étiquette GFP, excepté pour la troncation T3. Dans ce cas, on observe la présence de petits et moyens fuseaux dont la conformation se rapproche de celle de T4. Ce résultat suggère une influence de la GFP sur la configuration des polymères de T3 et cette modification pourrait également mettre en jeu les motifs EF-Hand présent chez T3 (Figure 37I-P).

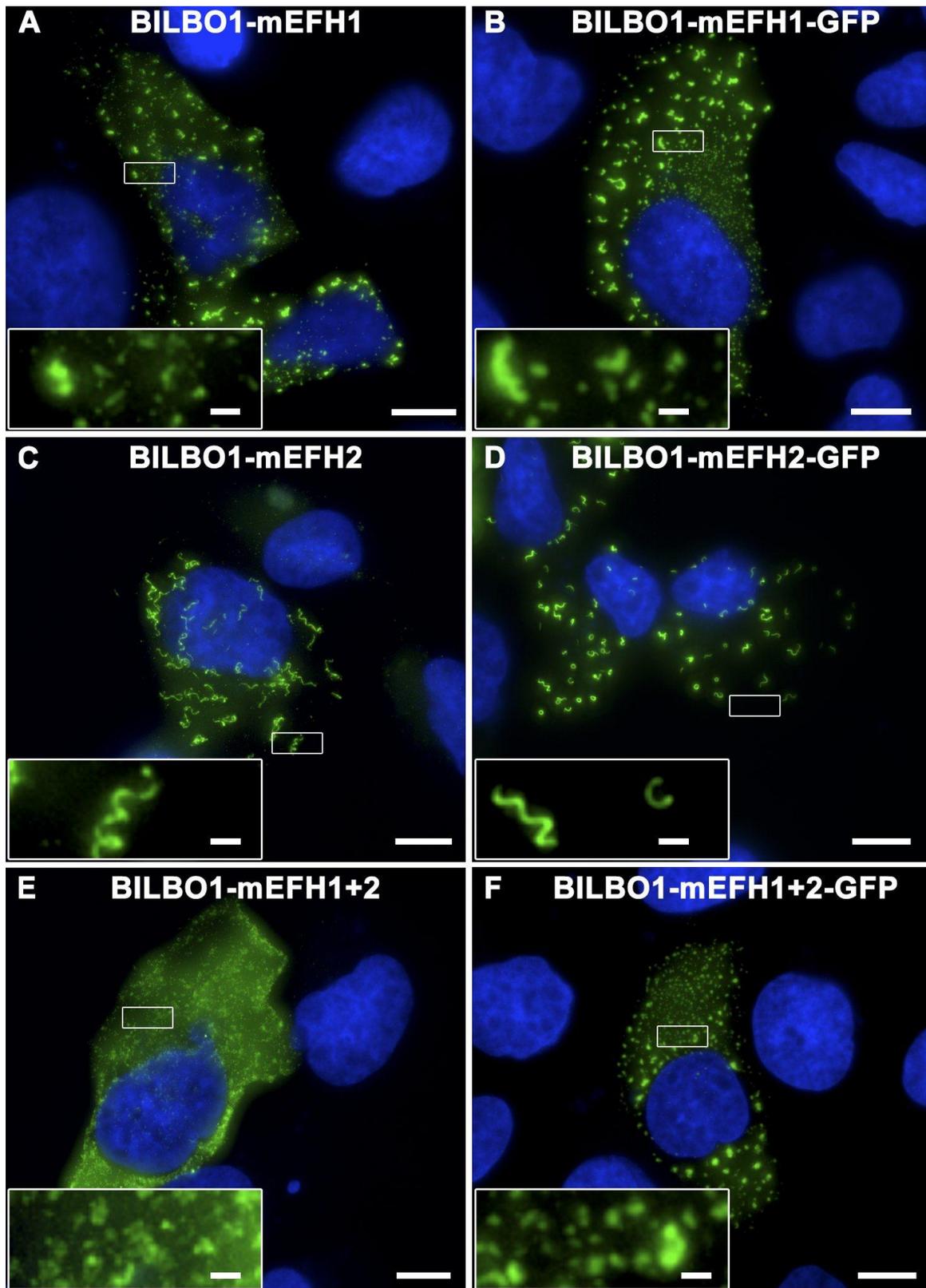
Les résultats obtenus suite à cette expérience confirment l'implication et la nécessité du domaine coiled-coil dans la polymérisation de BILBO1. Toutefois, il est possible que les motifs EF-Hand, peut-être *via* une fixation au  $Ca^{2+}$ , influent sur la conformation tridimensionnelle de BILBO1 ainsi que sur la forme des polymères formés.

### 3. Mutations des motifs EF-Hand

Les deux motifs EF-Hand présents chez BILBO1 (motif 1 (EFH1) : aa. 185 – 213 et motif 2 (EFH2) : 221 – 249) décrivent une configuration appelée pseudo EF-Hand <sup>[169]</sup>, où l'un des deux motifs est non-canonique. En effet, les motifs EF-Hand sont généralement classés en deux catégories : les motifs dits standards ou canoniques, pour lesquels les acides aminés impliqués dans la liaison au calcium, et principalement ceux décrits dans les positions +X, +Y et +Z, sont majoritairement des acides aspartiques (Asp) (Figure 39).

Le motif EFH2 de BILBO1 peut, à ce titre être décrit comme standard, alors que le motif EFH1, où les positions +X, +Y et +Z sont respectivement Asp, lysine (Lys) et asparagine (Asn) est classé comme non-standard (non-canonique). En effet, la présence de lysine (acide aminé chargé positivement) en position +Y, n'a été décrite que chez les motifs EF-Hand non-canoniques <sup>[169, 170]</sup>. Les acides aminés présents dans ces motifs sont conservés chez les homologues de BILBO1 exprimés par les différentes espèces de *Kinetoplastidae* séquencés à ce jour.

Afin d'étudier l'implication de ces motifs dans la forme des polymères de BILBO1, des protéines BILBO1 mutées au niveau des motifs EFH1 et/ou 2 ont été générés et exprimés chez les U-2 OS (Figure 40 et 41) (*travail réalisé par le Dr. M. Bonhivers et N. Landrein, UMR-5234*). Les acides aminés 194, 198, 202 et 205 (motif EFH1) et les acides aminés 230, 232 et 241 (motif EFH2 : mutation des acides aminés en position +X, +Y et +Z) ont été mutés en alanine (Ala).



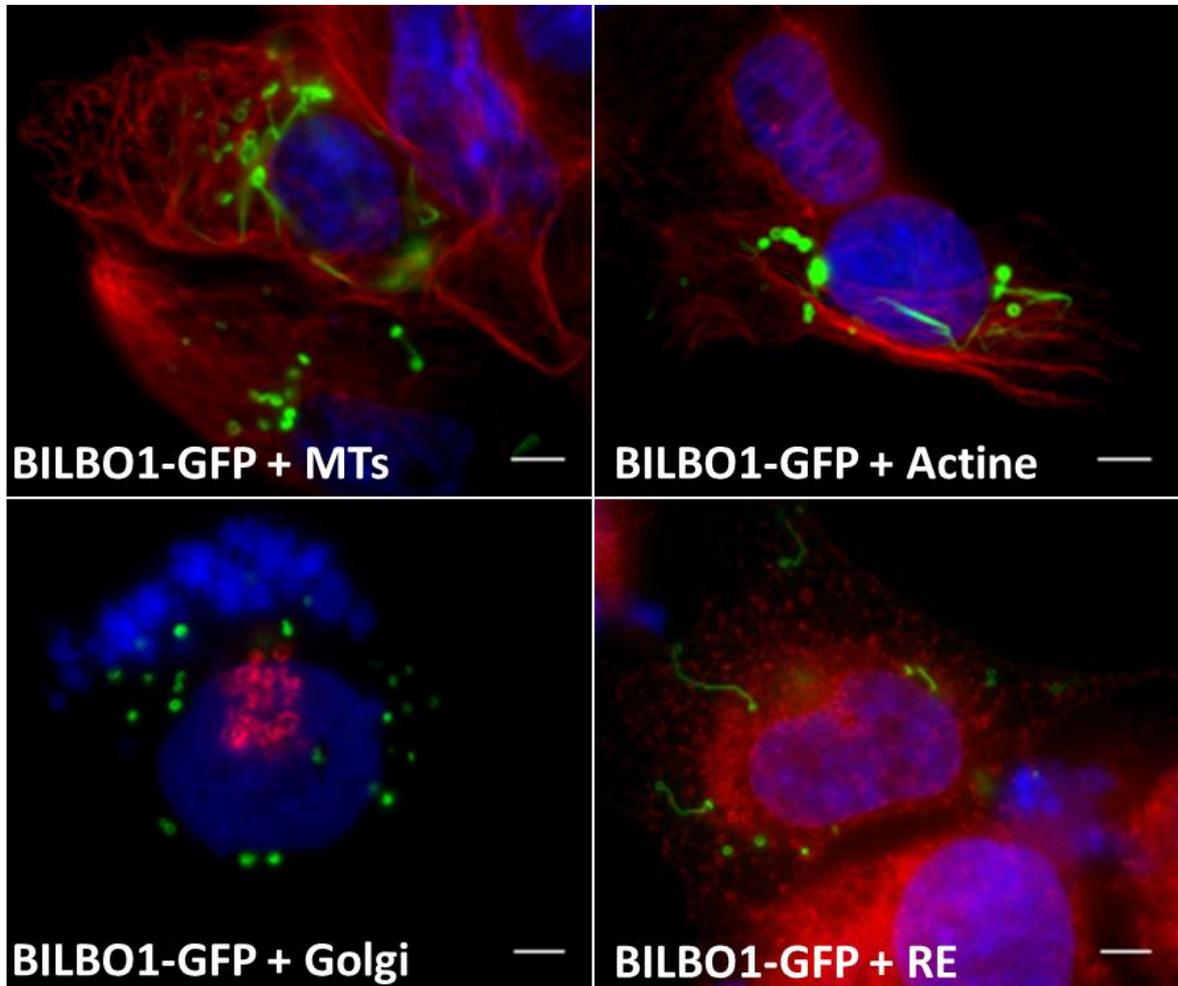
**Figure 41 : Images d cellules U-2 OS exprimant des formes mutées de BILBO1.** Les motifs EF-Hand ont été mutés séparément et simultanément. Nous avons observé les structures formées par les formes mutées de BILBO1 fusionnées (B, D et F) ou non (A, C et E) à la GFP. Peu de différences sont observées en présence ou en absence de GFP. La mutation du premier motif EF-Hand, mEFH1 (aa.185-213), inhibe la formation de polymères de BILBO1 (A et B). Le même type de résultat est observé après mutation simultanée des deux motifs (C et D). La mutation du second motif EF-Hand, mEFH2 (aa. 221-249), induit la formation unique de polymères de conformation hélicoïdale. Barre d'échelle 10 µm, barre d'échelle de l'agrandissement 1 µm.

Chacun des acides aminés mutés est chargé et pourrait être impliqué dans la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$ . La mutation de ces acides aminés en acides aminés non-polaires doit inhiber la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou modifier la conformation des motifs EF-Hand <sup>[178]</sup> (Figure 40). Toutes les mutations générées au niveau des motifs EF-Hand, que ce soit sur un seul des motifs ou les deux, entraîne une modification de la forme de polymérisation relative à BILBO1. Comme précédemment, les mutants de la protéine ont été exprimés en association ou non avec une étiquette GFP. Aucune différence notable n'a été observée en présence ou en absence de l'étiquette GFP.

- La mutation du motif EFH1 suffit à annihiler la capacité de polymérisation annulaire ou hélicoïdale de BILBO1-GFP. On observe de petites accumulations dispersées dans la cellule (Figure 41A et B). Ce qui pourrait impliquer que la mutation de ce motif modifie la conformation de la protéine et inhibe l'interaction possible entre les domaines coiled-coil de BILBO1.
- La mutation du motif canonique, soit le motif EFH2 induit la formation d'une unique conformation de polymères de BILBO1. On observe exclusivement la formation de polymères hélicoïdaux (Figure 41C et D). L'inhibition de la fonction de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  de l'EFH2 inhibe la capacité de polymérisation en structure sphériques, annulaires ou linéaires de BILBO1 et BILBO1-GFP.

Ce résultat suggère une régulation de la conformation de BILBO1 via le  $\text{Ca}^{2+}$ . La mutation du motif EFH1, motif non-canonique, semble modifier considérablement la conformation de BILBO1. En effet, la protéine n'est plus capable de former des polymères. Ceci pourrait résulter d'une inhibition de l'accessibilité des domaines coiled-coil ou une modification de leur conformation. Le second motif influence également la conformation de la protéine ainsi que celle des polymères formés. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse, en observant les polymères formés par BILBO1 en absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , par exemple suite à l'action d'un agent (ex : caféine) permettant de vider les réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  et de le sortir de la cellule <sup>[179]</sup>.

Fusionnée à la GFP, BILBO1 est capable de former des différents polymères notamment de structure annulaire. Toutefois, sans cette étiquette, BILBO1 est encore capable de polymériser en structures hélicoïdales, linéaires ou sphériques. Dans ce cas la présence de la GFP pourrait mimer l'interaction de BILBO1 avec une autre protéine présente dans le FPC, ce qui pourrait stabiliser la structure annulaire dans laquelle se retrouve BILBO1.



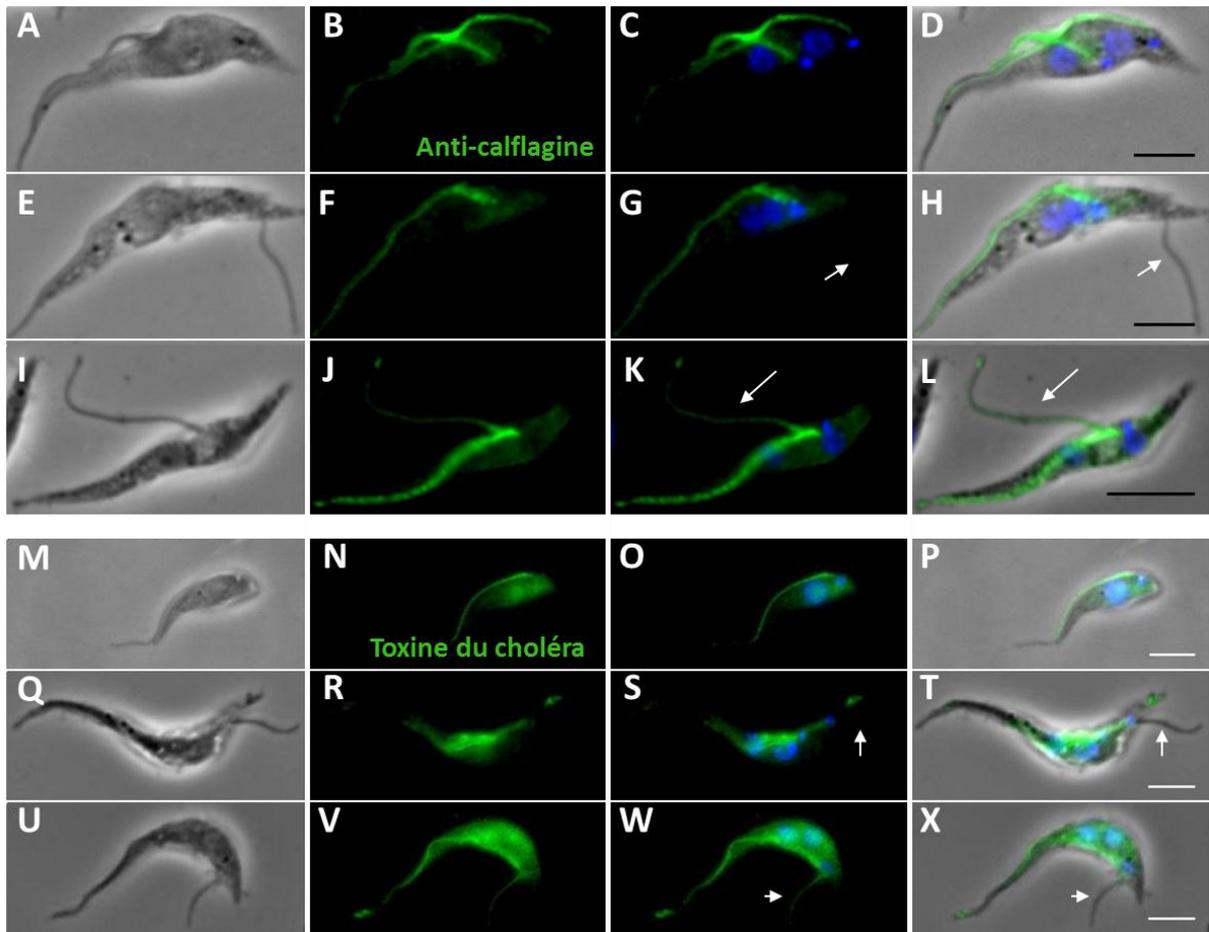
**Figure 42 : BILBO1 n'est pas associée au cytosquelette d'actine ou de microtubules, ni au Golgi ou RE chez les U-2 OS.** Expression de BILBO1-GFP pendant 6 heures chez les U-2 OS. Les microtubules (MTs) sont marqués par l'anti-tubuline  $\alpha$ , les filaments d'actine (actine-F) sont marqués par la phalloïdine couplée au Texas-Red, le Golgi est marqué par l'anti-giantine et le réticulum endoplasmique (RE) est marqué par l'anti-calnexine. Barre d'échelle 5 $\mu$ m.

Nous avons étudié l'interaction possible de BILBO1 et BILBO1-GFP avec le cytosquelette (notamment microtubules et actine) ou certains organites (réticulum endoplasmique (RE) et appareil de Golgi) de la cellule mammifère et aucune association n'a été observée entre les structures de BILBO1 et le réseau de microtubule ou d'actine de la cellule, ou encore avec le RE ou le Golgi (Figure 42). Des immuno-marquages de ces différentes structures et organites ont été réalisés sur des cellules U-2 OS exprimant BILBO1-GFP. L'ensemble de ces résultats suggère que BILBO1 a une capacité intrinsèque de polymériser en une structure hélicoïdale en l'absence de protéines spécifiques de *T. brucei* et que cette polymérisation fait intervenir le domaine coiled-coil de la protéine.

### III. Rôle de BILBO1 et du FPC chez *T. brucei*

L'une des fonctions putatives décrite pour caractériser le FPC serait sa capacité à représenter une barrière de diffusion flagellaire capable comme l'anneau de septines présent à la base des cils primaires des cellules mammifères et à l'annulus des spermatozoïdes, ou encore à la jonction entre la levure mère et le bourgeon fille <sup>[132, 133]</sup>. Cependant aucun homologue de structure primaire de septine n'a été retrouvé dans le génome des *Kinetoplastidae*. Ceci n'exclut pas la possible présence chez *T. brucei*, de protéines ayant la même fonction chez ses organismes. A la base des cils primaires, les septines s'assemblent en hétéro-oligomères pour former des polymères ayant une structure annulaire. Cet anneau de septines constituerait une barrière de diffusion responsable de la rétention ou du passage des divers molécules et protéines à la membrane ciliaire. Des expériences de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) <sup>[180]</sup>, qui permettent de suivre le transport de molécules dans une cellule, ont permis d'établir la présence d'une barrière de diffusion à la base des cils primaires des cellules mammifères <sup>[132]</sup>. Cette barrière serait impliquée dans la rétention des protéines membranaires à la membrane ciliaire. Nous avons voulu étudier l'hypothèse selon laquelle le collier de la poche flagellaire constituerait une barrière de diffusion chez *T. brucei* <sup>[130]</sup>.

Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé une lignée cellulaire de *T. brucei* (forme procyclique) dans laquelle l'ARN interférence (ARNi) de *BILBO1* a été induit <sup>[130]</sup>. Comme décrit par Bonhivers *et al.* en 2008, l'ARNi de BILBO1 inhibe la biogenèse d'un nouveau FPC et d'une nouvelle FP lors de la division cellulaire. De plus, les nouveaux flagelles formés ne sont pas associés à une poche flagellaire. Nous avons observé la localisation de différents constituants de la membrane flagellaire du parasite chez ces mutants induit pour l'ARNi de *BILBO1*.



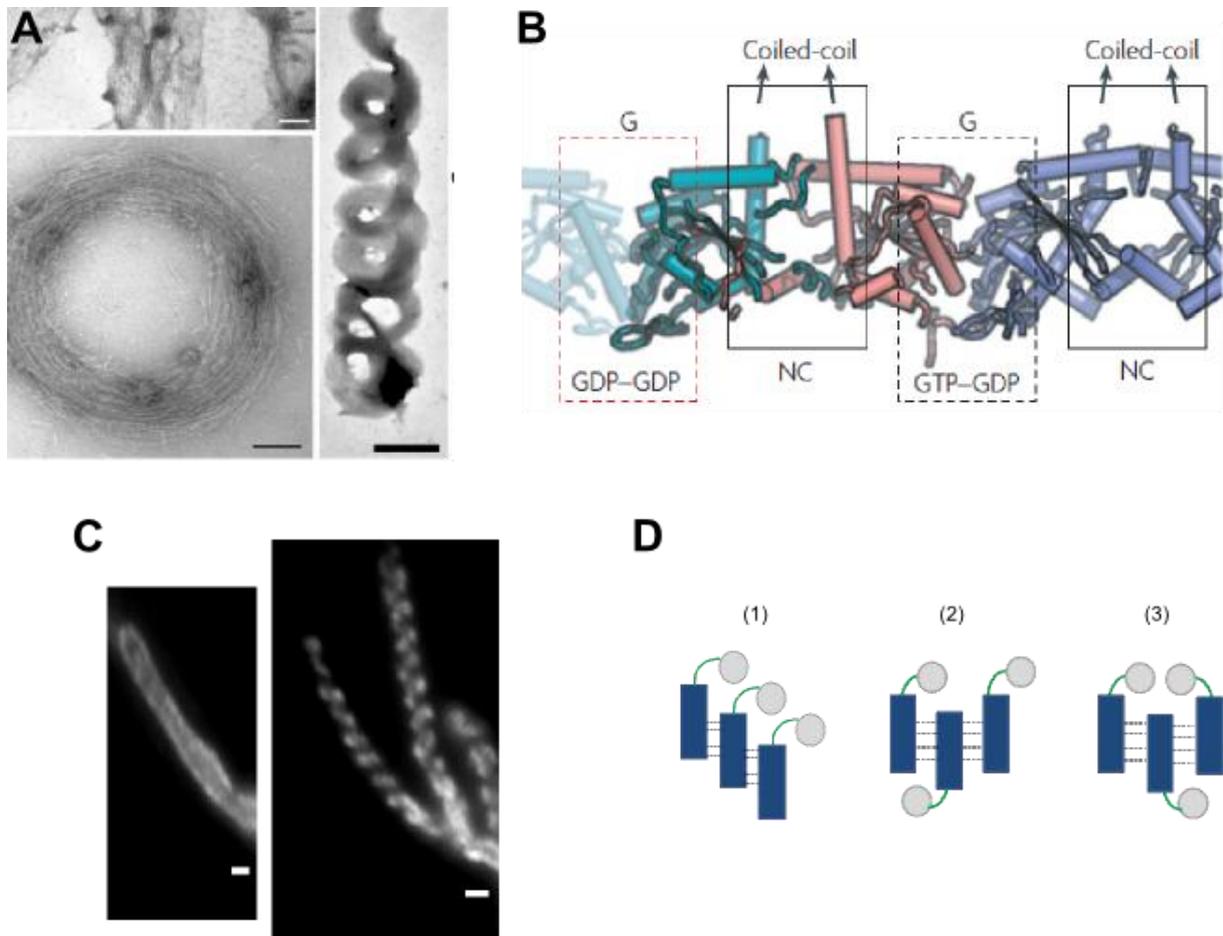
**Figure 43 : Le collier de la poche flagellaire est impliqué dans la localisation flagellaire de la calflagine et du ganglioside GM1.** Images d'immunofluorescence de *T. brucei* (forme procyclique), (A - L) Marquage avec l'anti-calflagine, (M - X) Marquage du ganglioside GM1 avec la toxine du choléra sous-unité B conjuguée au FITC. (A - D et M - P) : cellules parentales, (E -L et Q - X) : cellules induites pour l'ARNi de *BILBO1* pendant 36 heures. Il n'y a pas de localisation flagellaire de la calflagine ou du ganglioside GM1 sur le flagelle détaché lorsque celui-ci n'est lié à aucune poche ou FPC, mais lorsqu'il émerge d'une poche flagellaire et d'un FPC fonctionnel : présence de ces deux composants à la membrane flagellaire. Les flèches blanches désignent le flagelle détaché. Barre d'échelle 5 $\mu$ m.

La localisation de deux composants de la membrane flagellaire ont été étudié par immunofluorescence chez le parasite : la calflagine <sup>[181]</sup> (protéine flagellaire fixant le Ca<sup>2+</sup>) et le ganglioside GM1 <sup>[182]</sup> (glycosphingolipide lié à un résidu d'acide sialique). Ces deux composants sont principalement présents à la membrane flagellaire où ils sont associés aux radeaux lipidiques <sup>[182]</sup>.

Suite à l'inhibition de la formation du FPC, on n'observe pas la présence de calflagine ou de ganglioside GM1 sur le flagelle détaché (nouveau flagelle) à l'extrémité postérieure de la cellule, or ces deux composants sont toujours présents à la membrane du flagelle qui reste attaché à la cellule et qui possède toujours une poche flagellaire et un FPC (ancien flagelle) (Figure 43E-H et Q-T). Ce résultat suggère que le FPC est nécessaire au recrutement et à la séquestration de la calflagine et du ganglioside GM1 à la membrane flagellaire. Cette hypothèse est renforcée par le résultat observé chez les cellules où on observe deux flagelles qui émergent de la même poche flagellaire et donc du même FPC. Dans ces cellules, l'ancien flagelle reste attaché à la cellule et le nouveau est complètement détaché. De plus dans ce cas, la calflagine ainsi que le ganglioside GM1 sont localisés à la membrane des deux flagelles présents dans la cellule (Figure 43I-L et U-X). On observe néanmoins que la fluorescence associée à ces deux composants est plus faible sur le flagelle détaché (nouveau flagelle). Ce phénotype pourrait impliquer une altération dans l'adressage ou l'accessibilité à la membrane flagellaire de ces deux composants. L'étude des différents constituants de collier permettra de mieux étudier sa fonctionnalité au sein du trypanosome.

#### **IV. Discussion**

BILBO1 est la première protéine identifiée au collier de la poche flagellaire, sa présence s'est révélée nécessaire à la biogenèse du collier mais également celle de la poche flagellaire. L'étude réalisée par Archer *et al.* <sup>[183]</sup> montre une augmentation du niveau d'expression des ARN de *BILBO1* en fin de phase G1, soit au cours de la duplication et ségrégation des kinétoplastes. Ces données suggèrent que BILBO1 intervient très tôt dans la biogenèse du collier et de la FP. On retrouve des homologues de cette protéine chez les tous les *Kinetoplastidae* séquencés à ce jour, mais il n'en existe aucun chez les autres eucaryotes. Le caractère essentiel et la spécificité de BILBO1 en font une cible thérapeutique potentielle dans la lutte contre les trypanosomiasés et notamment contre la HAT.



**Figure 44 : Polymérisation des septines (A et B) et de BILBO1 (C et D).** (A) : Images observées au microscope électronique à transmission, après coloration négative des polymères formés (fuseaux, anneau, hélices) par les septines 2, 6 et 7, *in vitro*. Barre d'échelle fine 100 nm ; barre d'échelle épaisse 500 nm. Publiée par Kinoshita *et al.*, *Developmental Cell*, 2002. (B) : Modèle d'oligomérisation des septines faisant intervenir les domaines de fixation à la GTP et coiled-coil. Publiée par Weirich *et al.*, *Nature*, 2008. (C) : Images d'immunofluorescence réalisée sur des cellules U-2 OS exprimant BILBO1 (24 heures après transfection). BILBO1 est marqué par l'anticorps monoclonal de souris anti-BILBO1. BILBO1 forme des polymères linéaires et hélicoïdaux. Barre d'échelle 1  $\mu$ m. (D) : Modèles d'interaction (parallèle ou anti-parallèle) BILBO1-BILBO1 faisant intervenir le domaine coiled-coil de la protéine. En bleu : domaine coiled-coil ; en vert : motifs EF-Hand ; en gris : domaine N-terminal.

Cette protéine possède deux motifs EF-Hand dont la présence suggère une régulation via le  $\text{Ca}^{2+}$ , ainsi qu'un large domaine coiled-coil nécessaire à la polymérisation de la protéine. L'expression ectopique de BILBO1-GFP en cellules mammifères se traduit par la formation de structures linéaires, hélicoïdales et annulaire. Ce dernier phénotype (structure annulaire) n'étant observé en absence de l'étiquette GFP, suggère un rôle de la GFP dans la conformation de la structure obtenue. En effet, dans ce cas la GFP pourrait soit changer la conformation de la protéine et ainsi autoriser de nouvelles interactions, soit mimer l'impact d'une protéine interagissant avec BILBO1. Dans ces deux cas la GFP serait capable d'induire et stabiliser la formation d'une structure en anneau comparable à celle retrouvée au FPC, chez *T. brucei*.

La conformation des polymères de BILBO1 (structure hélicoïdale et annulaire) rappelle celle des polymères formés par les septines <sup>[184]</sup>. Les septines appartiennent à la famille des protéines fixant la GTP, elles sont retrouvées chez pratiquement tous les eucaryotes <sup>[135, 185, 186]</sup>. Chez les levures, les cellules épithéliales et les spermatozoïdes, les septines s'oligomérisent et forment des anneaux <sup>[135, 257]</sup>. Chez ces organismes, les septines jouent un rôle dans la cytokinèse, la dynamique du cytosquelette et la compartimentation des membranes. Les septines sont capables d'interagir avec le cytosquelette d'actine, les microtubules mais également avec les membranes. Chez l'Homme, il existe 14 septines différentes <sup>[185]</sup>. Des travaux de polymérisation des septines 2, 6 et 7 *in vitro*, montrent que ces protéines forment après hydrolyse de la GTP, des hétéro-oligomères de conformations diverses (hélices, anneaux et fuseaux) <sup>[184]</sup> (Figure 44A). Les polymères formés impliquent les domaines de fixation à la GTP et coiled-coil <sup>[184, 185]</sup>. Les polymères de septines sont très similaires à ceux formés par BILBO1 et BILBO1-GFP chez les cellules U2-OS (Figure 44).

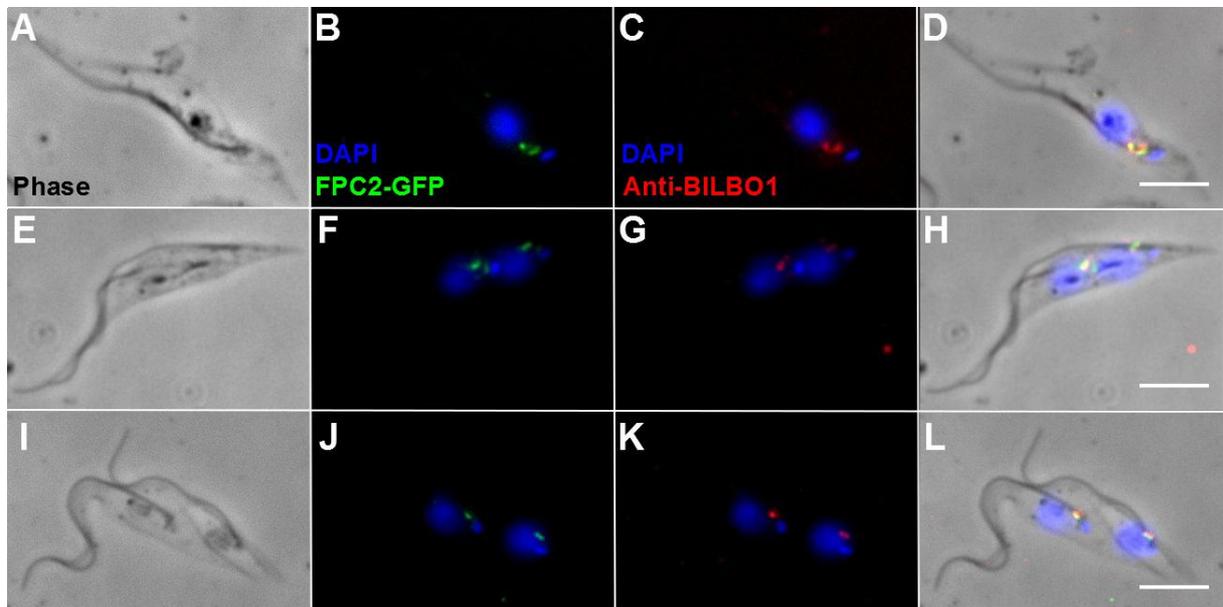
Or les septines sont identifiées comme constituant majeur d'une barrière de diffusion présente à la base des cils primaires chez les mammifères. Chez les levures, elles forment également une barrière de diffusion interconnectée avec deux autres barrières liées au réticulum endoplasmique et au noyau, à la base du bourgeon fille. Cependant, bien que la propriété de polymérisation semble similaire entre BILBO1 et les septines (protéines à domaine de fixation à la GTP), il n'y a pas d'homologie de séquences entre ces protéines (BILBO1 et septines) et aucun homologue de septines n'a été identifié dans le génome de *T. brucei*.

Toutefois, la probabilité que le FPC agisse comme barrière de diffusion et/ou de rétention a été exploré chez les cellules pour lesquelles la formation du collier a été inhibée (souche induite pour l'ARNi de *BILBO1*). Chez ces cellules, l'absence de FPC et de FP entraîne une modification de la localisation de la calflagine et du ganglioside GM1.

Ces protéines et molécules de la membrane flagellaire ne sont plus visibles à la membrane du flagelle dépourvu de FP. Ce phénotype pourrait être une conséquence de l'absence d'une barrière de diffusion associée à ce flagelle. L'un des postulats émis est que le FPC constitue cette barrière. Néanmoins, ces résultats à eux seuls ne permettent pas de conclure sur la véracité de cette hypothèse. En effet, il est possible que ce soit l'absence de la FP qui inhibe l'adressage de ces deux molécules à la membrane flagellaire.

Chez *T. brucei*, la FP constitue le lieu de transit de nombreux échanges moléculaires <sup>[110]</sup>. De plus, la calflagine est une protéine dont la localisation à la membrane flagellaire dépend de la présence d'une modification post-traductionnelle particulière. En effet, seules les calflagines palmitoylées sont localisées à la membrane flagellaire <sup>[187]</sup>. La voie de sécrétion des souches induites pour l'ARNi de BILBO1 étant perturbé <sup>[130]</sup>, on peut imaginer que l'inhibition de cette modification altère l'adressage correct de cette protéine.

Ces différents travaux suggèrent un rôle structural important de BILBO1 dans la formation du FPC chez *T. brucei*. Cette protéine est en effet capable de former des polymères dont la structure peut être modulée par les motifs EF-Hand présents dans la cellule. Ces polymères dépendent de la présence du domaine coiled-coil de BILBO1. De plus, il semble que l'interaction de BILBO1 avec d'autres protéines puisse influencer la conformation des polymères formés par BILBO1. L'identification des partenaires de la protéine chez le parasite devrait permettre de mieux comprendre la structure du FPC.



**Figure 45** : Immunofluorescence réalisée sur des cytosquelettes de *T. brucei* (procyclique) après 48 heures de surexpression de FPC2-GFP. FPC2-GFP est marquée par un anticorps polyclonal anti-GFP (visualisé en vert), BILBO1 est marquée par un anticorps monoclonal anti-BILBO1 (visualisé en rouge) et l'ADN est marqué par le DAPI (visualisé en bleu). Les images A à D représentent une cellule en phase G1 du cycle cellulaire : notée 1K1N (1 kinétoplaste + 1 noyau). Les images E à L représentent des cellules en phase G2/M : notées 2K2N. Au cours du cycle cellulaire FPC2-GFP co-localise partiellement avec BILBO1 au collier de la poche flagellaire. Barre d'échelle : 5µm.

# FPC2 : nouvelle protéine du FPC

---

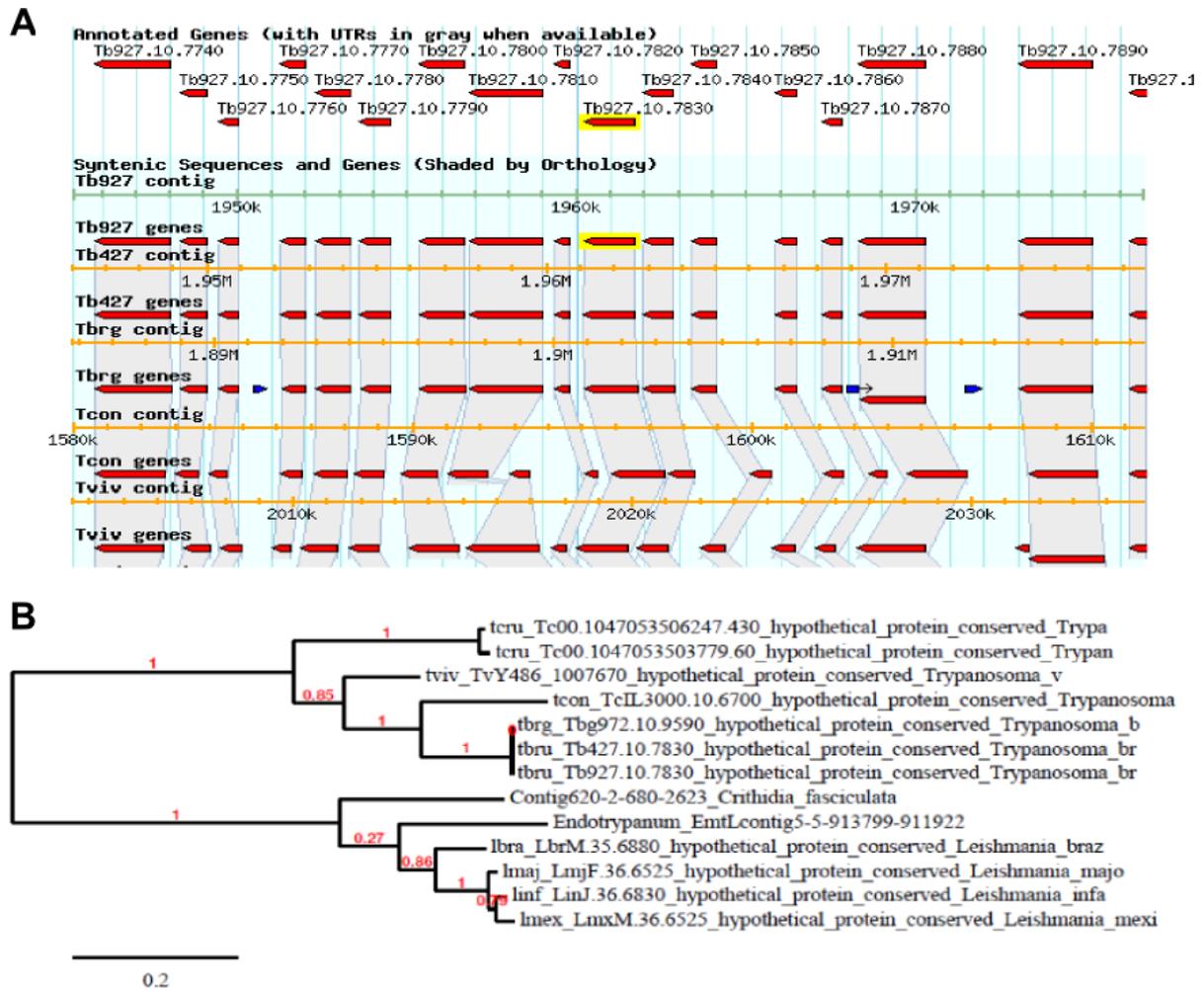
## I. Introduction

Cette protéine a été identifiée par l'équipe du Dr. Robinson, selon le même processus que celui ayant mené à l'identification de BILBO1<sup>[130]</sup>. En effet, dans le but d'identifier de nouvelles protéines liées ou appartenant au cytosquelette flagellaire de *T. brucei*, des souris ont été immunisées avec un extrait de protéines flagellaires de *T. brucei*. L'équipe a isolé et produit un anticorps monoclonal marquant le corps basal du parasite en immunofluorescence. Lors de la recherche de l'antigène reconnu par cet anticorps, une électrophorèse en deux dimensions (séparation selon pI et masse moléculaire) suivie d'un western-blot a permis d'isoler un spot protéique renfermant une dizaine de protéines candidates. Ces protéines ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse<sup>[188]</sup>, par la Plateforme Protéome du Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux. Les protéines-antigènes candidates ont été surexprimées chez *T. brucei*, fusionnées à la GFP (*Travail réalisé en collaboration avec le Dr Denis Dacheux, UMR-5234*). L'une des protéines étudiées a été localisée au niveau du collier de la poche flagellaire et partiellement colocalise avec BILBO1 (Figure 45). Cette protéine, contrairement à BILBO1 n'a été retrouvée dans aucun des protéomes flagellaires de *T. brucei*<sup>[86, 143]</sup>. Des travaux d'analyse transcriptomique réalisée chez *T. brucei*, révèle que le taux d'ARNm de *FPC2* augmente légèrement au cours de la phase G2/M, lors de la division cellulaire<sup>[183]</sup>. De plus, ce taux d'ARN se révèle plus important chez la forme procyclique que chez la forme sanguine<sup>[189]</sup>. Ceci implique une régulation de l'expression de *FPC2* au cours du cycle de différenciation du parasite.

Dans un souci d'uniformisation des noms de gènes et de protéines chez le trypanosome<sup>[190, 191, 192]</sup>, cette protéine de 56 kDa, localisée au collier de la poche flagellaire (FPC) a été nommée *FPC2* (pour Flagellar pocket collar 2). C'est la deuxième protéine identifiée au FPC de *T. brucei*.

### A. Analyse *in-silico*

D'après la base de données TritypDB<sup>[193]</sup>, *FPC2* est codé chez *T. brucei* par le gène Tb927.10.7830. Ce gène unique de 1527 pb est présent sur le chromosome 10.



**Figure 46 :** Analyse des homologues de Tb927.10.7830 (*FPC2*). L'image A est une représentation schématique de l'environnement génétique de *FPC2* chez *T. brucei*, ainsi que celui de ses homologues chez les autres espèces de *Kinetoplastidae*. L'environnement génétique de *FPC2* est conservé chez les *Kinetoplastidae* (TritrypDB). L'image B est un arbre phylogénétique (diagramme) des homologues de *FPC2* chez les *Kinetoplastidae* (Phylogeny.fr). Deux principales branches évolutives apparaissent : l'une regroupant les espèces du genre *Trypanosoma* et l'autre regroupant les leishmanies, *Endotrypanum* et *Crithidia fasciculata*.

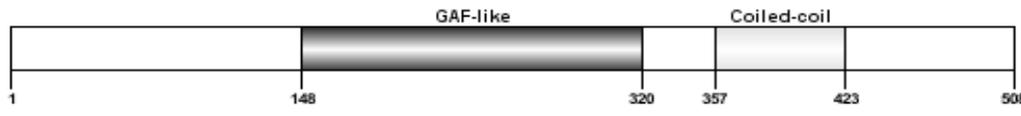
Il existe des homologues de ce gène chez les autres *Kinetoplastidae* (% d'identité avec *T. brucei* spp. ~100%, *T. congolense* 67%, *T. vivax* 65%, *T. cruzi* 55%, *Leishmania* 35%, *Crithidia fasciculata* 38%, *Endotrypanum* 35%) dont les génomes sont entièrement séquencés (Figure 46B et 48). A ce jour, on distingue 12 homologues connus de *FPC2*. L'environnement génétique et l'ordre des gènes entourant *FPC2* reste identique entre les différentes espèces de trypanosomes et très similaire à celui retrouvé chez les leishmanies (Figure 46A). En effet, *FPC2* est inclus dans un cluster de gènes qui est conservé entre les *Kinetoplastidae* de séquence connue <sup>[194, 195]</sup>, excepté chez le protozoaire *Bodo saltans*.

La majorité des gènes encadrant *FPC2* ne sont pas caractérisés et n'ont pas de fonction putative. *FPC2* est entouré de plusieurs gènes codant pour des protéines classées comme « hypothétiques » (pas de domaine fonctionnel connu) et d'un gène codant pour une L-iso-aspartyl méthyltransférase (intervenant dans la réparation de résidus acide aspartique, altérés par le temps). Aucun de ces gènes ne présente d'homologies avec *FPC2* et il n'existe pas d'homologue de *FPC2* chez les autres eucaryotes ou autres organismes. *FPC2* est donc spécifique et caractéristique des *Kinetoplastidae*. Parmi ces homologues, on distingue deux branches évolutives majeures (Figure 46B) :

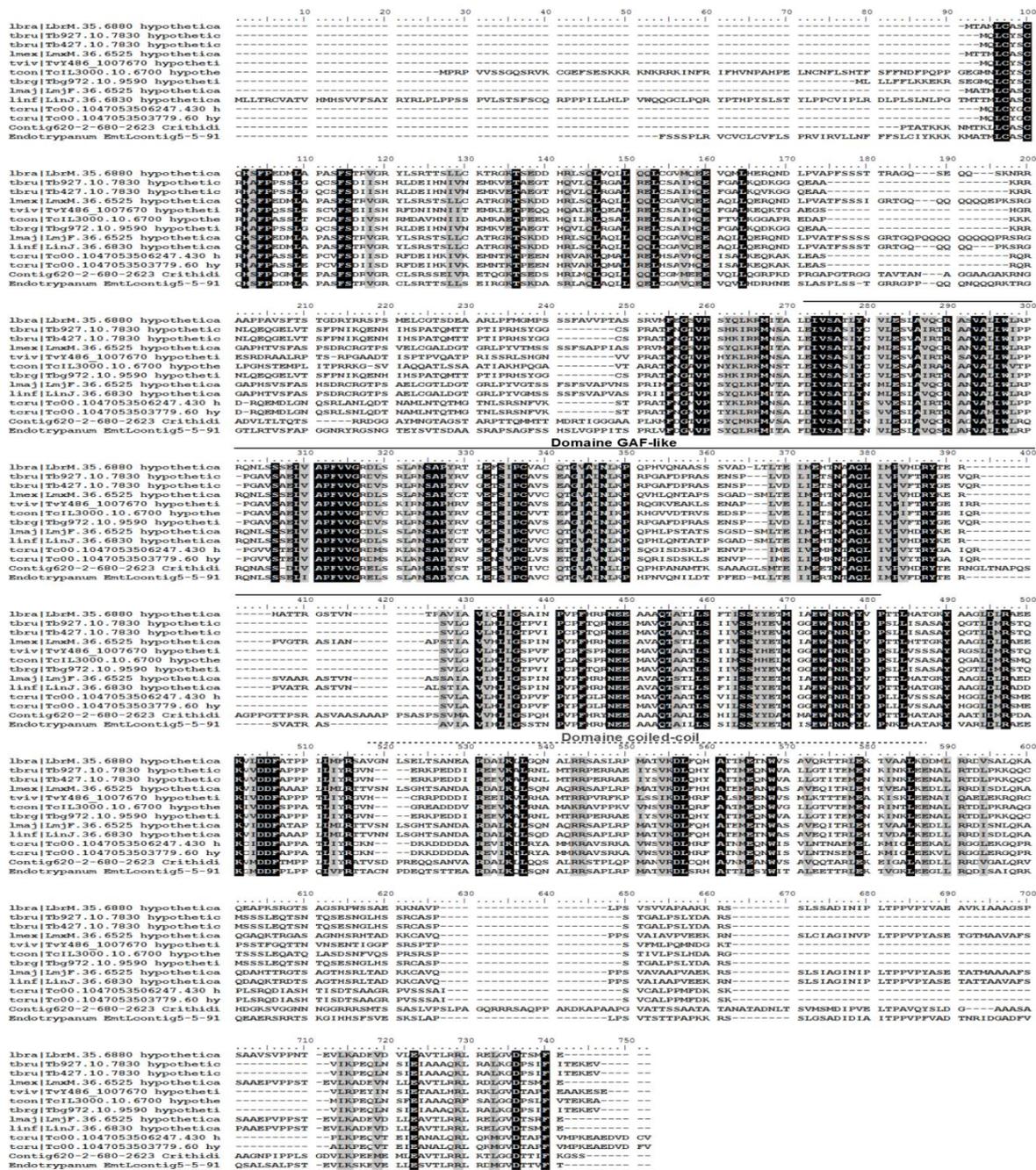
- un clade regroupant les leishmanies, *C. fasciculata* et *Endotrypanum*,
- un clade regroupant les organismes du genre *Trypanosoma* (*T. brucei*,...).

Cette distinction évolutive est observée pour la majorité des gènes homologues présents chez les *Kinetoplastidae*, notamment pour celui codant pour l'ARN ribosomal 18S, marqueur génétique généralement utilisé pour établir la phylogénie entre plusieurs organismes. En effet, le premier clade cité ici regroupe les organismes pour lesquels les homologues de la protéine *FPC2* possèdent un pourcentage d'identité avec Tb927.10.7830 inférieure à 50%. Le gène *FPC2* n'est toutefois pas retrouvé chez *Bodo saltans*, alors que d'autres gènes du même cluster, notamment celui codant pour la L-iso-aspartyl méthyltransférase est présent chez cet organisme. *FPC2* étant présent chez toutes les espèces de l'ordre des *Trypanosomatidae* annotés, son absence chez les *Bodonidae* (ordre auquel appartient *Bodo saltans*), suggère que *FPC2* pourrait être spécifique des *Trypanosomatidae*.

La protéine *FPC2* ne présente aucune homologie de séquence avec BILBO1. *FPC2* est une protéine de 508 acides aminés qui ne possède pas de domaines transmembranaires et peu de domaines fonctionnels sont prédits.



**Figure 47 :** Représentation schématique de la structure primaire de FPC2. Protéine de 508 acides aminés comportant deux domaines putatifs intervenant dans l'interaction protéine-protéine. Ces domaines sont notés GAF-like (aa. 148 – 320) et coiled-coil (aa. 357 – 423).



**Figure 48 :** Alignement des 12 homologues de FPC2 présents chez les *Kinetoplastida* via ClustalW. Le pourcentage d'identité entre les homologues présents chez les sous-espèces de *T. brucei* varie entre 98 et 100%. Les homologues les plus éloignés, représentants des pourcentages d'identité inférieurs à 50%, sont retrouvés chez les leishmanies, *Endotrypanum* et *Crithidia*. Les acides aminés surlignés en noir sont identiques entre les différentes protéines, les zones surlignées en gris sont celles où 90% des acides aminés sont identiques entre les homologues.

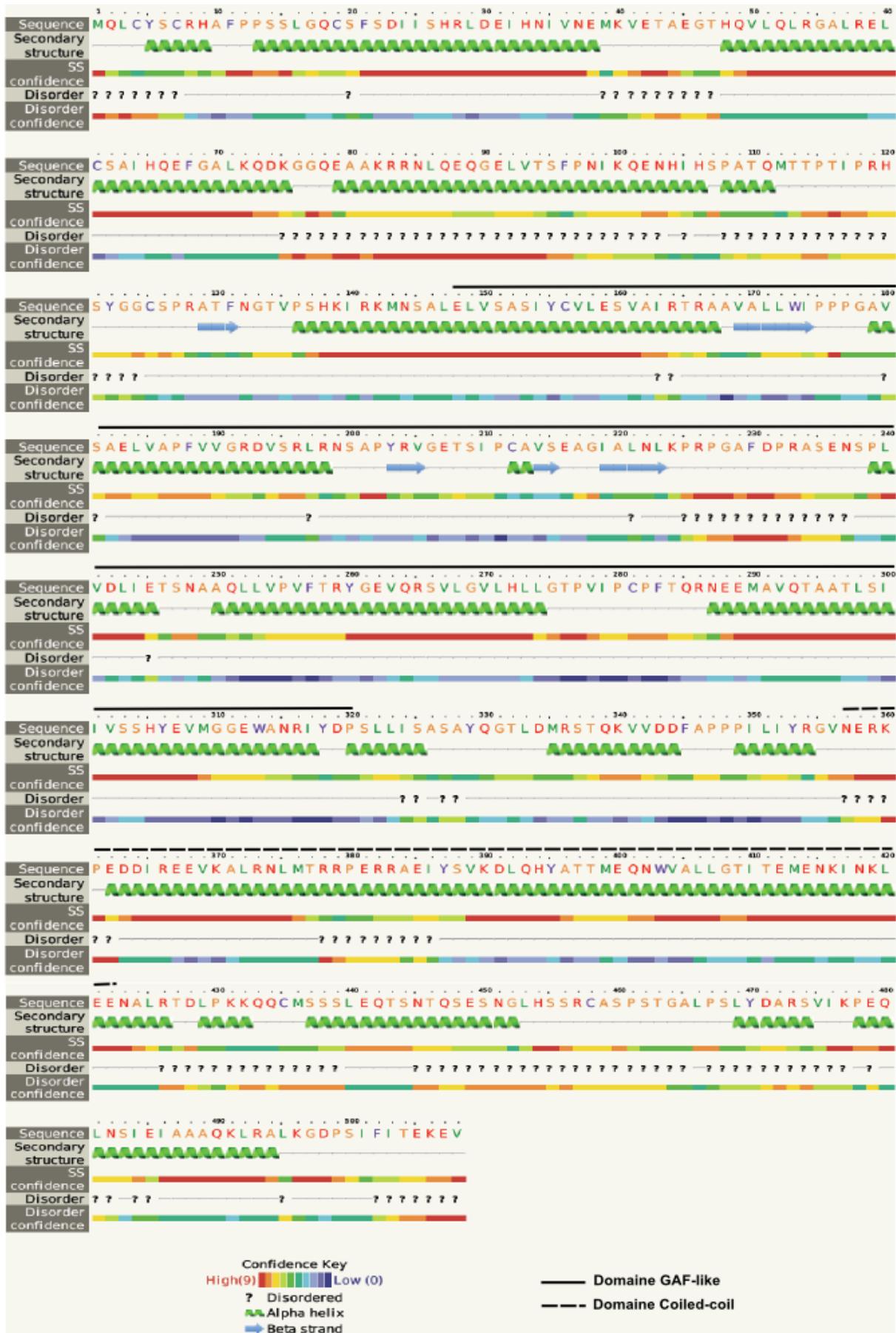
En effet, l'analyse *in silico* a permis d'identifier, via Marcoil (serveur de prédiction de coiled-coil <sup>[196, 197]</sup>), un domaine coiled-coil (aa. 357 à 423) en C-terminal de la protéine avec une probabilité supérieure à 50% (Figure 47). La présence d'hélices  $\alpha$  (structure secondaire prédite par le serveur Jred <sup>[198]</sup>) au niveau de ce domaine concorde avec l'identification de ce domaine comme étant un domaine coiled-coil (Figure 49). Les domaines coiled-coil sont constitués de répétition d'heptades d'acides aminés répertoriés de *a* à *g*. Ces acides aminés sont généralement de nature hydrophobe en position *a* et *d*, et chargés en position *e* et *g* <sup>[171, 172]</sup>. Chez FPC2, le domaine coiled-coil comporte 6 séquences d'heptades où 40% des acides aminés sont conservés entre les différents homologues (Figure 48). Dans la littérature les domaines coiled-coil sont généralement associés à une fonction d'interaction protéine-protéine <sup>[107, 172]</sup>. De même chez FPC2, ce domaine pourrait intervenir dans l'interaction de FPC2 avec elle-même ou avec une autre protéine. Une recherche d'homologie de séquence, menée via le serveur Blastp, a permis d'identifier une région de FPC2 présentant une homologie avec une autre protéine du parasite codée par le gène Tb927.10.4920. La protéine codée par ce gène est homologue au domaine GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, Adenyl cyclases et FhlA) généralement retrouvé chez les phosphodiesterases. Dans ces protéines, le domaine GAF est impliqué dans la dimérisation des protéines <sup>[199]</sup>. Chez FPC2, la présence de plusieurs feuillets  $\beta$  et de quelques hélices  $\alpha$  au sein de ce domaine, est en accord avec sa caractérisation en tant que domaine « GAF-like » <sup>[200]</sup> (Figures 47 et 49). L'un des deux domaines précités ou les deux, pourrait intervenir dans l'interaction de FPC2 avec elle-même ou avec une autre protéine.

## **B. Localisation de FPC2 chez *T. brucei* et interaction**

### **1. Expression et localisation de FPC2 chez *T. brucei***

Un anticorps polyclonal de souris dirigé contre la forme entière de FPC2 avait été produit au laboratoire. Cet anticorps peut reconnaître la protéine FPC2 (56 kDa), ainsi qu'une bande supplémentaire à ~70 kDa en western-blot chez les formes procycliques (Figure 53C) et sanguines du parasite.

Néanmoins en immunofluorescence sur une cellule « wild-type », aucun signal de fluorescence n'est visible. Cette fluorescence n'est détectée que lorsque FPC2 est surexprimée, ce qui pourrait impliquer qu'en condition normale, FPC2 est peu accessible à l'anticorps.



**Figure 49 :** Représentation schématique de la structure secondaire prédite par le logiciel Phyre 2.0 : prédiction d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  au sein de la protéine FPC2. Les structures prédites dans le domaine GAF-like sont des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$ , dans le domaine coiled-coil, seuls des hélices  $\alpha$  sont prédites. Ces résultats concordent avec la caractérisation des domaines fonctionnels définis chez FPC2.

Après 48 heures de surexpression, la protéine de fusion FPC2-GFP est localisée et visualisée en immunofluorescence, au niveau du collier de la poche flagellaire chez *T. brucei* (Figure 45).

## 2. Interactions de FPC2

Un test d'interaction en double-hybride réalisé chez la levure révèle une interaction positive entre la protéine FPC2 et elle-même. Afin de caractériser cette interaction et de déterminer si les domaines coiled-coil et GAF-like sont impliqués, des tests d'interaction en système double-hybride complémentaires devront être réalisés.

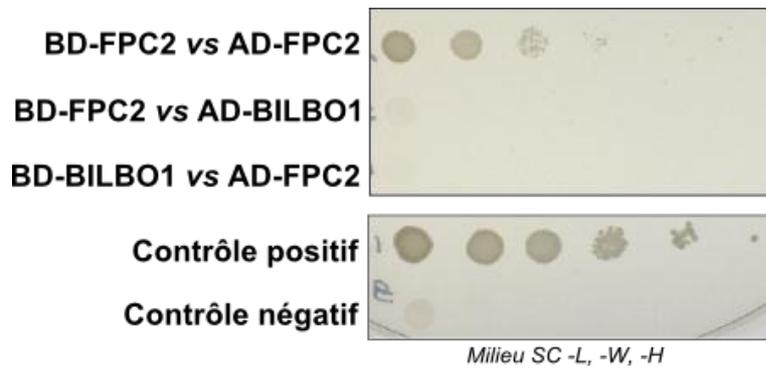
On observe également une co-localisation partielle entre FPC2-GFP et BILBO1. Afin de caractériser les interactions possibles entre FPC2 et BILBO1, un test de double-hybride chez la levure a été réalisé. Aucune interaction n'est observée entre BILBO1 et FPC2 (Figure 50) (*Les tests d'interaction en double-hybride des protéines BILBO1 vs FPC2 et FPC2 vs FPC2 ont été réalisés par le Dr Annelise Sahin, UMR-5234*).

## II. Analyse fonctionnelle

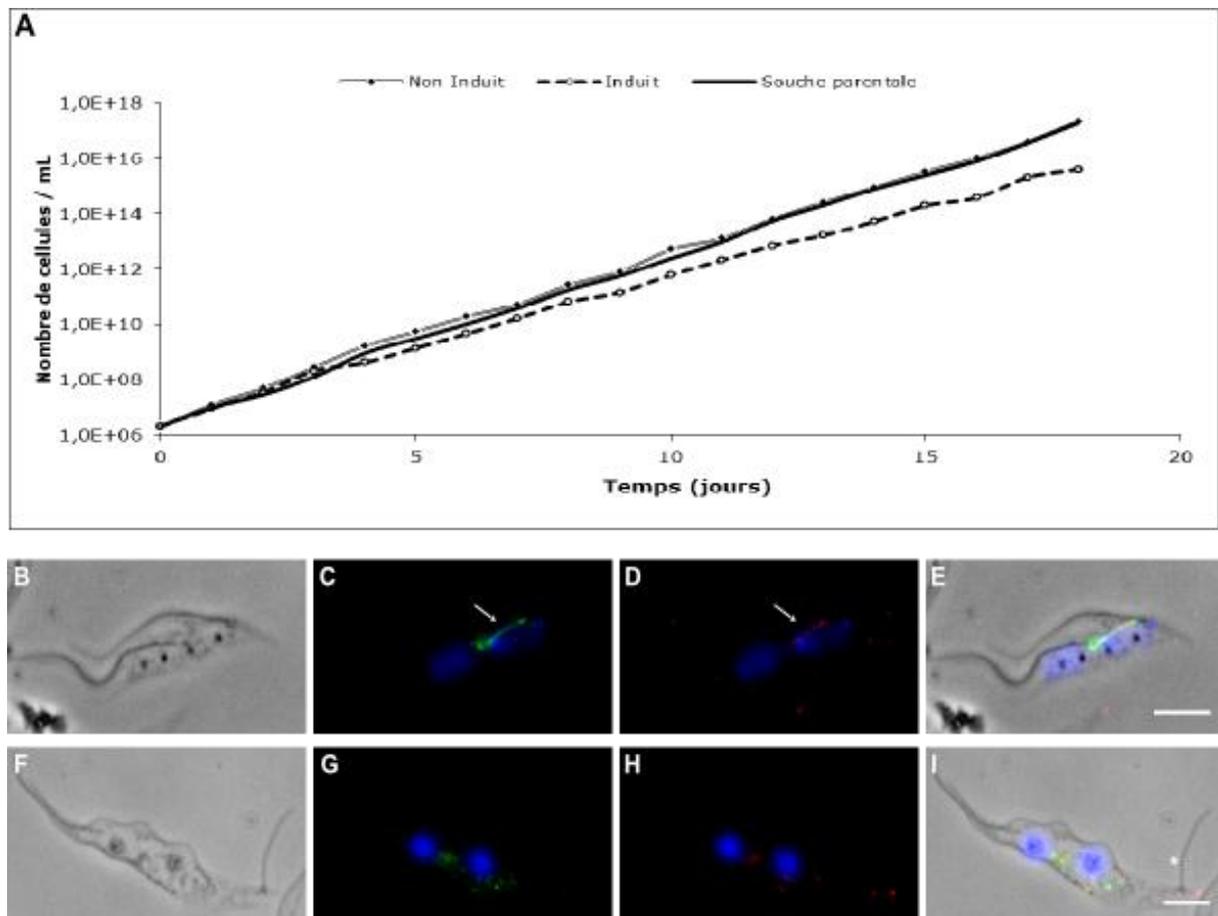
### A. Surexpression de la protéine de fusion FPC2-GFP

*Ce travail a été réalisé par Christophe Chopard durant son MASTER2.*

La protéine de fusion FPC2-GFP surexprimée pendant quelques heures chez *T. brucei* (48h d'induction), colocalise partiellement avec BILBO1 durant tout le cycle de division cellulaire (Figure 45). Cette localisation est toujours observée après extraction du cytoplasme et de la membrane des cellules, suggérant ainsi que FPC2 appartient à une structure du cytosquelette de *T. brucei*. Après une plus longue surexpression, une légère inhibition de la croissance cellulaire est observée (Figure 51A), elle est accompagnée d'une augmentation de la population de cellules possédant un flagelle détaché (similaire au phénotype observé suite à l'ARN interférence de BILBO1) (Figure 51F-I) et de cellules multinucléées (Figure 51B-E). Il semble que la surexpression de FPC2-GFP entraîne une altération de la division du collier de la poche flagellaire et un défaut de cytokinèse. De façon intéressante, on peut noter que pendant la phase G2/M du cycle cellulaire, on observe un phénotype aberrant au niveau de la structure du collier. En effet, pendant cette phase du cycle, lorsque l'on surexprime FPC2-GFP, on peut observer la formation d'une structure linéaire entre les deux kinétoplastes nouvellement ségrégués. Cette structure linéaire renferme FPC2-GFP ainsi que BILBO1.



**Figure 50 :** Test d'interaction de FPC2 et BILBO1 en double-hybride chez la levure. Sur milieu sélectif d'interaction (SC -L, -W, -H), FPC2 interagit avec elle-même. Néanmoins, elle n'interagit pas avec BILBO1. Le contrôle positif représente l'interaction entre la protéine p53 et l'antigène-T. Le contrôle négatif teste l'interaction entre la lamine et l'antigène-T.



**Figure 51 :** Analyse de la surexpression de FPC2-GFP chez *T. brucei* (procyclique). L'image A : courbe représentant la croissance des cellules surexprimant FPC2-GFP par rapport aux cellules non-induites et celles de la souche parentale. Au bout d'une dizaine de jours, il y a une légère inhibition de la croissance cellulaire. Ce phénotype est corrélé avec l'apparition des cellules multinucléées (images B – E) ainsi que de cellules présentant un phénotype ARNi de BILBO1 (élongation de l'extrémité postérieure avec présence d'un flagelle détaché (image F- I). Certaines cellules comportent une structure linéaire renfermant FPC2-GFP ainsi que BILBO1, entre deux poches flagellaires nouvellement ségréguées (structure désignée par une flèche blanche sur les images C et D). FPC2-GFP est marquée par un anticorps anti-GFP (vert) ; BILBO1 est marquée par l'anti-BILBO1 (rouge) et l'ADN est marqué au DAPI (bleu).

En condition normale, BILBO1 n'est jamais observé au sein d'une structure linéaire au cours du cycle cellulaire, ce qui témoigne d'une modification de la biogenèse du collier ou d'une altération de sa division. De plus l'apparition de phénotypes similaires à ceux observés lors de l'ARNi de *BILBO1* ou sa surexpression <sup>[130]</sup>, laisse supposer que la surexpression de FPC2-GFP altère la biogenèse du FPC. Ces résultats suggèrent que comme BILBO1, FPC2 appartient au collier de la poche flagellaire de *T. brucei*.

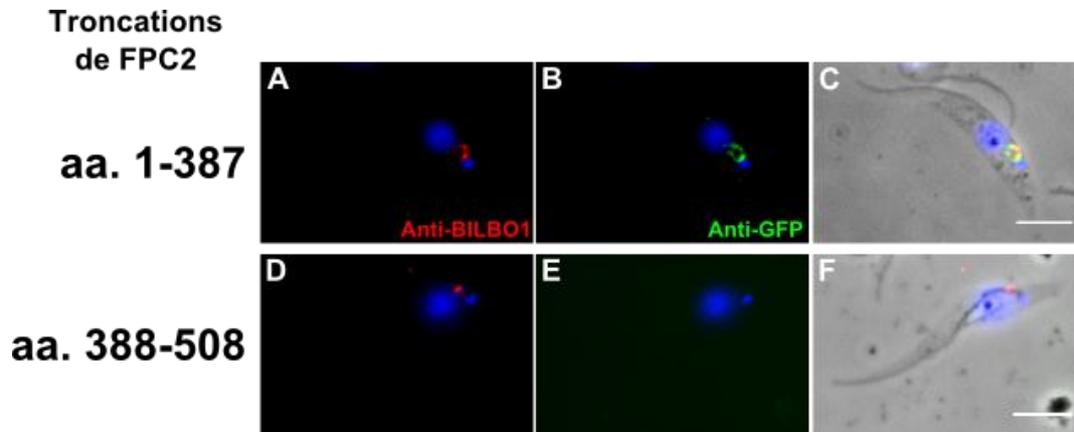
Afin de poursuivre cette étude, différentes troncations de FPC2-GFP ont été surexprimées chez le parasite. Les résultats obtenus montrent que la troncation N-terminale (1-387) est suffisante pour observer une localisation au niveau du collier. Au contraire, le domaine coiled-coil/C-terminal (aa. 388-508) n'est pas localisé au collier et reste cytoplasmique (Figure 52). La troncation N-terminale pourrait contenir la séquence permettant l'adressage et la rétention de la protéine au collier. De façon intéressante, il faut noter que cette troncation comporte entièrement le domaine caractérisé GAF-like. Ainsi, la localisation au FPC de la protéine FPC2 pourrait être une conséquence de son interaction avec une autre protéine au sein du collier. Une étude du même type sur le rôle de ce domaine chez le parasite permettrait de mettre à jour sa fonction.

Toutefois, ces analyses ne permettent pas de mettre en évidence le rôle de FPC2 chez *T. brucei*, l'étude de la fonction de la protéine est poursuivie par l'induction du « knock-down » de FPC2.

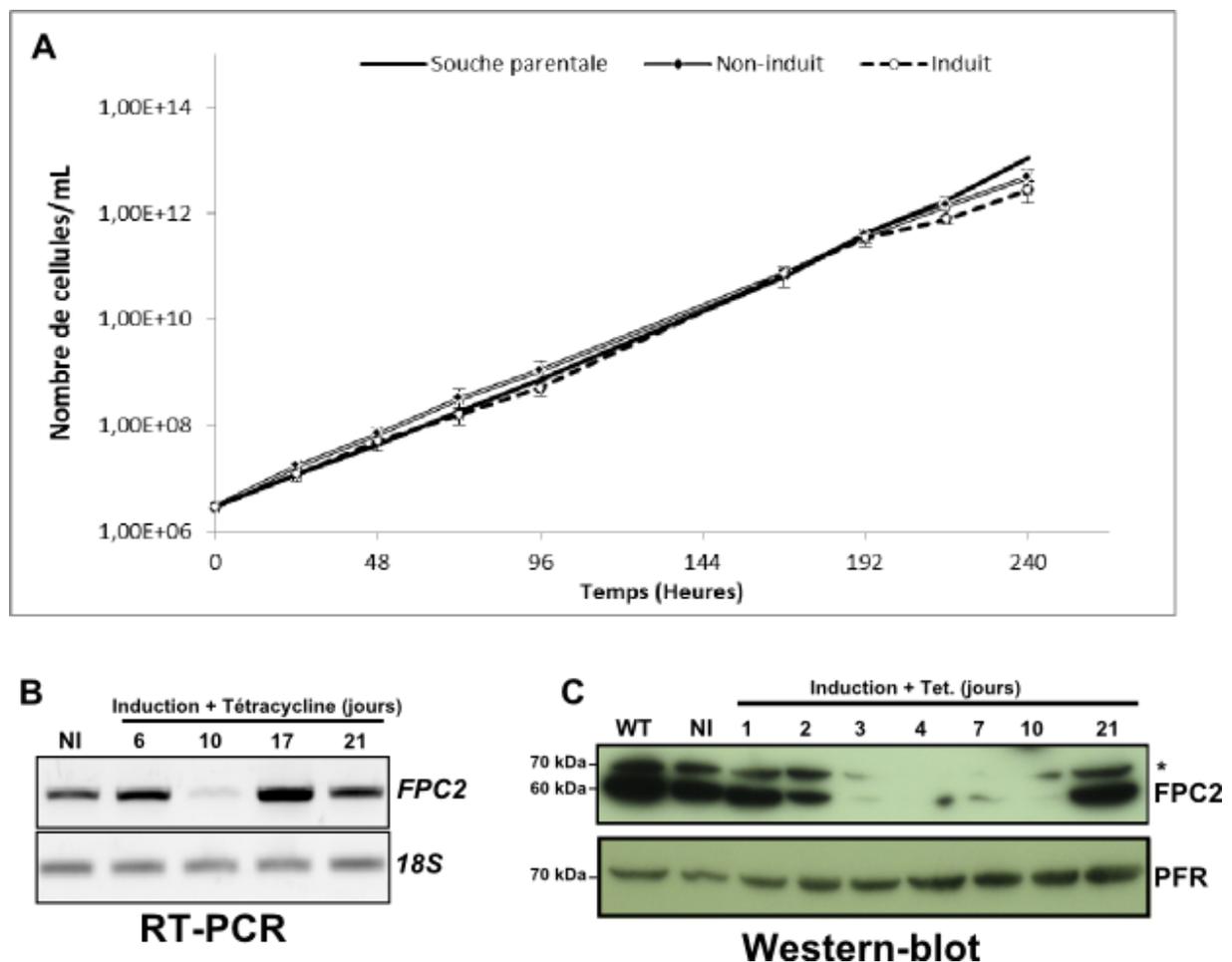
## **B. « Knock-down » ou ARN interférence de *FPC2***

Le « knock-down » ou ARN interférence (ARNi) de *FPC2* devrait permettre via l'induction de la diminution de l'expression de FPC2, d'analyser la fonction de la protéine chez *T. brucei* <sup>[201]</sup>. L'ARN interférence (ARNi) est un mécanisme cellulaire impliqué dans la régulation de l'expression de gènes. Il permet notamment de réduire l'expression d'un gène via la dégradation de ces ARN messagers (ARNm). Ce mécanisme a été identifié en 1990, chez les plantes <sup>[202]</sup>, depuis il a été mis en évidence chez les Hommes, les insectes, les parasites protozoaires... <sup>[203]</sup>.

Plusieurs lignées cellulaires sont testées, leur croissance est suivie en condition induite et non-induite, l'expression de la protéine est également contrôlée par RT-PCR et western-blot. Ces tests ont révélé que les souches transfectées pour exprimer un ARNdb ciblant *FPC2*, ne présentent pas de défauts de croissance visible (Figure 53A).



**Figure 52 :** Image d'immunofluorescence réalisée sur des cytosquelettes de forme procyclique de *T. brucei* surexprimant des formes tronquées de FPC2. (A-C) : Cellules surexprimant la troncation (aa. 1-387) de FPC2 fusionnée à la GFP. FPC2-GFP est marquée par un anticorps anti-GFP. (D-F) : Cellules surexprimant la troncation (aa. 388-508) de FPC2 fusionnée à la GFP. BILBO1 est marquée par l'anticorps monoclonal de souris anti-BILBO1 et les formes tronquées de FPC2 fusionnées à la GFP sont marquées par un anticorps anti-GFP. Les 387 premiers acides aminés de FPC2 sont nécessaires et suffisants à l'adressage et à la localisation de la protéine au FPC. Barre d'échelle 5  $\mu$ m.



**Figure 53 :** Analyse de l'effet de l'ARNi de *FPC2* chez *T. brucei* (procyclique). (A) : courbe représentant la croissance des cellules génétiquement modifiées pour produire l'ARNi de *FPC2*, en condition induite et non-induite, par rapport à la souche parentale. Aucune différence de croissance n'est visible entre les différentes souches. (B) : RT-PCR semi-quantitative, représentant le taux d'expression des ARNm de *FPC2* chez les souches induites et non-induites pour produire l'ARNi de *FPC2*. L'amplification de l'ARN *18S* permet de contrôler la charge d'ARN dans chaque réaction. (C) : Western-blot réalisé sur des cytosquelettes de cellules induites et non-induites pour l'ARNi de *FPC2* avec un anticorps polyclonal anti-FPC2, l'astérisque désigne la bande supplémentaire d'environ 70 kDa reconnue par l'anti-FPC2. La PFR marquée par un anti-PFR permet de contrôler la charge déposée.

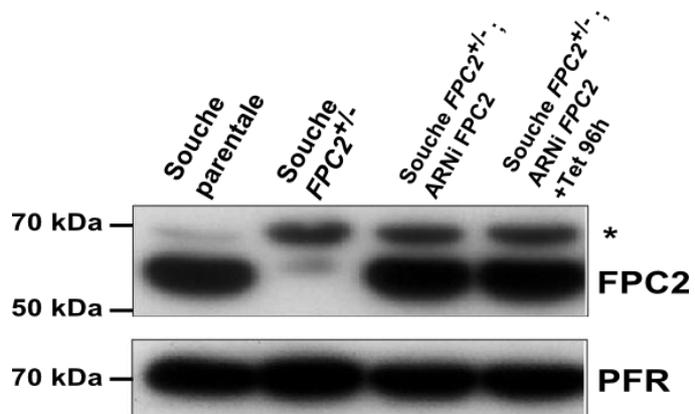
On observe une diminution de 80% du taux d'ARNm de *FPC2* après 10 jours d'induction de l'ARN interférence (Figure 53B). Toutefois, après 17 jours d'induction le taux d'expression de *FPC2* revient à un niveau comparable à la condition non-induite. En western-blot, dès 5 jours d'induction et même après 21 jours d'induction, la bande à 56 kDa reconnue par l'anti-FPC2 n'est plus visible. (Figure 53C).

D'autres constructions (vecteur exprimant un ARN sens et anti-sens ciblant la totalité de l'ORF de *FPC2*) ont été testées chez les souches sanguines et procycliques du parasite. Après induction de l'ARNi, des résultats similaires ont été observés chez ces souches qui ne présentent pas de défauts de croissance. Il est toutefois intéressant de noter que l'anti-FPC2 reconnaît une bande supplémentaire à environ 70 kDa dont le taux diminue également après induction de l'ARN interférence de *FPC2*. Ce résultat laisse supposer que la bande à 70 kDa pourrait représenter une forme modifiée de la protéine FPC2, migrant à une taille supérieure que celle attendue (Figure 53C). Une étude en spectrométrie de masse pourrait permettre de confirmer si cette bande représente une forme de FPC2.

Après 20 jours d'induction de l'ARNi de FPC2, le taux d'expression des ARNm de *FPC2* est revenu à un niveau similaire à celui des cellules non-induites, ce qui traduit une réversion de la souche et une adaptation génétique du parasite afin de réguler l'expression de la protéine FPC2 (Figure 53B). Les résultats obtenus ne permettent pas de proposer une fonction relative à cette protéine au sein du collier. En effet, le niveau basal de la protéine FPC2, qui demeure chez le parasite au cours de l'induction de l'ARNi pourrait suffire à maintenir sa fonctionnalité. Cette approche d'étude fonctionnelle par génétique inverse ne permet pas de conclure sur le rôle de la protéine. L'ambiguïté qui demeure suite à l'ARNi de *FPC2* incite à se tourner vers une stratégie plus poussée permettant de mettre à jour la fonction de cette protéine : le « knock-out » du gène *FPC2*.

### C. « Knock-out » (KO) ou extinction du gène *FPC2*

Le KO implique le retrait d'un gène du génome de l'organisme <sup>[165]</sup>. *T. brucei* est un organisme diploïde, le gène *FPC2* est donc présent sous deux allèles. L'enjeu est donc de retirer successivement les allèles de *FPC2*, en les remplaçant par recombinaison homologe au locus, par des gènes de résistance à un antibiotique (*PAC* : gène de résistance à la puromycine codant pour la puromycine N-acetyl-transférase <sup>[204]</sup> et *BSD* : gène de résistance à la blasticidine codant pour la blasticidine S désaminase <sup>[205, 206]</sup>). Deux semaines sont nécessaires à l'obtention de souche procyclique de *T. brucei* génétiquement modifiée.



**Figure 54 :** Western-blot réalisé sur des cytosquelettes de cellules issues de la souche parentale, de la souche FPC2<sup>+/-</sup>, ainsi que de la souche FPC2<sup>+/-</sup> induites et non-induites pour l'ARNi de *FPC2* avec un anticorps polyclonal anti FPC2, l'astérisque désigne la bande supplémentaire d'environ 70 kDa reconnue par l'anti-FPC2, cette protéine semble être plus exprimée chez les souches ayant comme fond génétique FPC2<sup>+/-</sup>. La PFR marquée par un anti-PFR permet de contrôler la charge déposée.

Dans l'éventualité que le KO de *FPC2* soit létal, une construction permettant de compléter de façon conditionnelle ce phénomène, est intégré à la souche <sup>[207]</sup>. En effet, cette souche pourra exprimer la protéine de fusion FPC2-GFP après induction par la tétracycline.

L'extinction du 1<sup>er</sup> allèle (*Δfpc2::BSD/FPC2* ou *Δfpc2::PAC/FPC2*) entraîne une diminution du taux d'expression de FPC2, visible en western blot. De façon intéressante, on observe également une diminution du taux d'expression de la protéine reconnue à 70kDa. Toutefois, ces événements ne sont pas accompagnés d'effets sur la croissance cellulaire ou d'apparition de phénotype anormaux chez la cellule

Deux conditions sont testées lors de l'extinction du 2<sup>e</sup> allèle :

- une lignée (*Δfpc2::BSD/Δfpc2::PAC*), où les deux allèles du gène *FPC2* seront remplacés. Si FPC2 est essentielle pour la survie de *T. brucei*, cette lignée ne sera pas viable. Ceci rendrait impossible toute analyse fonctionnelle de cette protéine. Aussi, une seconde lignée pourvue d'un système de « rescue » a également été générée.
- Le KO des deux allèles du gène *FPC2* sera réalisé chez une lignée capable de surexprimer de façon inductible la protéine de fusion FPC2-GFP (*Δfpc2::BSD/Δfpc2::PAC, FPC2::GFP*). Au cours du remplacement du second allèle de *FPC2*, soit pendant deux semaines, l'expression de FPC2-GFP a été induite.

Cependant dans les deux cas, l'extinction du 2<sup>e</sup> allèle se révèle impossible. En effet, après extraction de l'ADN génomique de ces souches, une PCR permettant d'amplifier spécifiquement le gène *FPC2* est réalisée. Cette technique a permis de confirmer la présence de *FPC2* au sein de chacune des souches. L'utilisation d'amorces spécifiques des régions flanquantes du gène *FPC2* (régions 5'UTR et 3'UTR entourant le gène) a permis de montrer, qu'au moins un des deux allèles de *FPC2* est toujours présent à son locus. Ceci bien que la présence des deux gènes de résistance *BSD* et *PAC* ait été contrôlée. Ce résultat suggère une intégration aléatoire de la cassette sensée remplacer le second allèle de *FPC2*. Aucune lignée KO du gène *FPC2* n'a pu être obtenue.

Aussi, afin de diminuer le taux d'expression de *FPC2* chez la souche *FPC2*<sup>+/-</sup>, une autre approche a été testée, en induisant chez cette souche l'ARNi de *FPC2*. De manière surprenante, en condition induite ou non-induite de l'ARNi, le taux d'expression de *FPC2* ne varie pas et de surcroît, le niveau d'expression semble être revenu à la condition parentale (Figure 54).

Ce phénotype inattendu pourrait être dû à une adaptation du parasite au cours de la sélection. En effet, si on suppose qu'une diminution drastique et rapide de *FPC2* soit handicapante voire létale pour *T. brucei*, on peut penser que celui-ci cherchera à moduler et maintenir l'expression de *FPC2* afin de garantir sa survie et sa multiplication. Généralement, l'impossibilité d'obtention d'une souche viable KO du gène *FPC2 Δfpc2::BSD/Δfpc2::PAC*, pourrait traduire de son caractère essentiel pour la survie du parasite <sup>[165]</sup>.

### III. Discussion

*FPC2* est une protéine spécifique des *Trypanosomatidae*, localisée au niveau collier où elle colocalise partiellement avec BILBO1. L'analyse *in silico* révèle la présence d'un domaine coiled-coil et d'un domaine « GAF-like ». Ces deux domaines pourraient être impliqués dans l'interaction de *FPC2* avec elle-même ou avec d'autres protéines. L'analyse fonctionnelle montre l'implication du domaine N-terminal (aa. 1-387) de la protéine dans son adressage au collier. Les résultats d'ARNi et de KO témoignent de la difficulté d'obtention d'une souche viable démunie du gène *FPC2*. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'absence de *FPC2* soit létale pour le parasite <sup>[208, 209]</sup>. Durant la phase de sélection des parasites modifiés génétiquement, il est possible que *T. brucei* se soit adapté afin de conserver une expression suffisante de *FPC2* pour maintenir la viabilité de la souche <sup>[165]</sup>. Les travaux de transcriptomique réalisés chez *T. brucei*, montrent une expression plus importante de *FPC2* chez les formes procycliques du parasite et le pic d'expression est observé en phase G2/M, soit durant la mitose et la cytokinèse au cours du cycle cellulaire <sup>[183, 189]</sup>. Il est intéressant d'observer que c'est pendant cette phase que l'on observe une altération de la structure du FPC, après surexpression de *FPC2*-GFP. Ces résultats pourraient impliquer que *FPC2* intervient tard au cours du cycle cellulaire, après la duplication et la ségrégation de la poche et du FPC. On peut envisager que *FPC2* intervient dans la ségrégation des structures du collier, lors de la phase G2/M chez *T. brucei*.

Il faut noter que dans le cadre de ces mêmes études, le pic d'expression de BILBO1 apparaît très tôt au cours du cycle, en fin de la phase G1, lors de la duplication des corps basaux et de la duplication de la poche et du FPC. Résultats concordant avec les études fonctionnelles réalisées sur BILBO1 montrant que sa diminution altère le cycle cellulaire au cours d'évènements précoces tels que la division de la poche flagellaire. *FPC2* pourrait donc intervenir lors d'évènements plus tardifs que la duplication du FPC, au cours du cycle cellulaire. L'analyse *in silico* de *FPC2* révèle deux domaines fonctionnels pouvant intervenir dans le phénomène d'interaction protéine-protéine, un domaine coiled-coil ainsi qu'un domaine caractérisé GAF-like.

Nous avons montré par double-hybride chez la levure que FPC2 n'interagit pas avec BILBO1. Cependant FPC2 interagit avec elle-même et pourrait donc participer à la formation de la structure du FPC. L'analyse fonctionnelle réalisée sur les troncations de FPC2 a révélé que le fragment de FPC2 contenant le domaine N-terminal ainsi que le domaine GAF-like était suffisant pour cibler et maintenir la protéine au FPC. Toutefois, les résultats obtenus à ce jour sur FPC2, ne permettent pas de statuer sur la fonction de la protéine ou sur son possible caractère essentiel chez *T. brucei*.

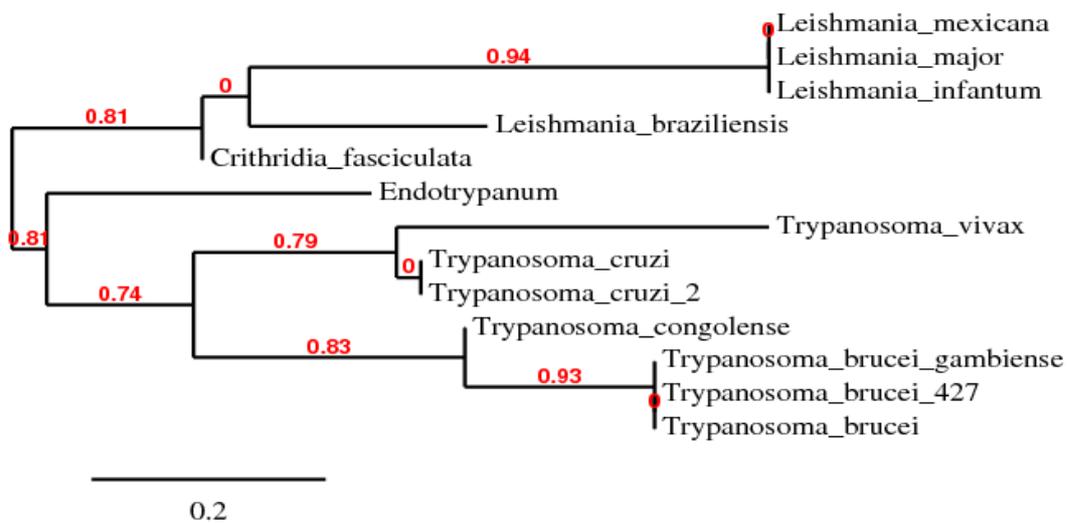


Figure 55 : Arbre phylogénétique des homologues de FPC4 réalisé après un alignement des homologues de FPC4 via le logiciel « Phylogeny.fr ».

# FPC4 : partenaire de BILBO1

---

Deux cribles double-hybride réalisés contre une banque génomique de *T. brucei*, chez la levure, ont permis d'identifier 8 partenaires protéiques potentiels de BILBO1 chez le parasite. Pour réaliser ces cribles, BILBO1 a été fusionné au domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription Gal4 et des fragments d'ADN génomique du parasite ont été fusionnés au domaine d'activation de Gal4. Ces deux cribles réalisés indépendamment (un crible effectué par la société Hybrigenics et un autre *via* une banque génomique de *T. brucei* produite au laboratoire) ont permis d'identifier une protéine que nous avons nommé FPC4.

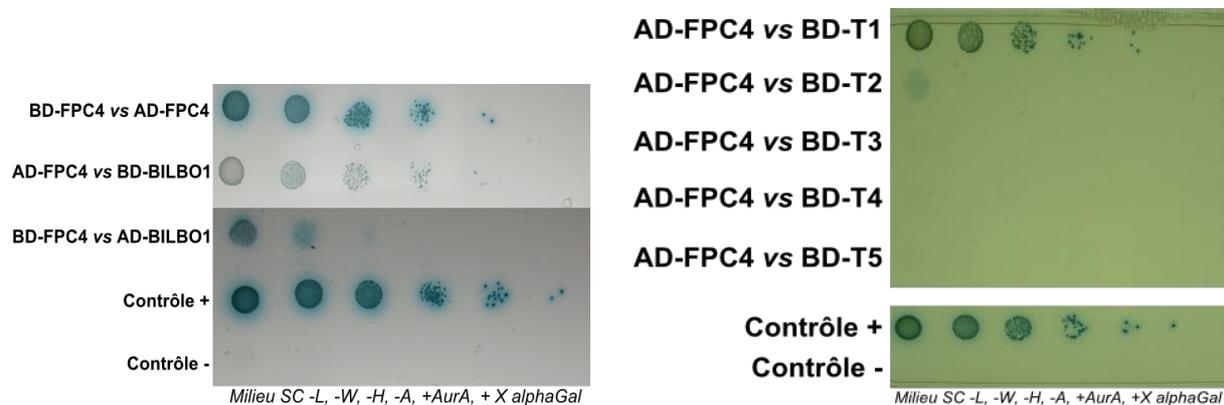
FPC4 n'avait pas été étudiée, nous avons donc cherché à définir la localisation de cette protéine, son interaction avec BILBO1 et son implication dans la formation du FPC. Cette protéine ne figure dans aucun des protéomes flagellaires de *T. brucei* publiés [86, 143], contrairement à BILBO1.

## I. Analyse *in-silico*

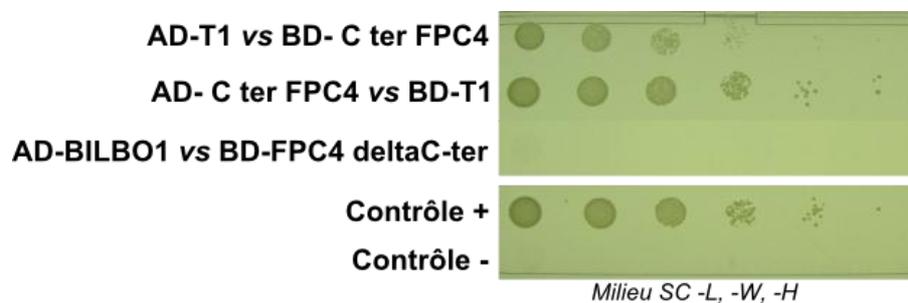
FPC4 est une protéine d'environ 50 kDa (444 aa.) qui comporte des homologues retrouvés uniquement chez les *Kinetoplastidae*. Il existe des homologues de ce gène chez les autres *Kinetoplastidae* (% d'identité avec *T. brucei* spp. ~100%, *T. congolense* 38%, *T. vivax* 21%, *T. cruzi* 25%, *Leishmania* 15%, *Crithidia fasciculata* 15%, *Endotrypanum* 15%) dont les génomes sont entièrement séquencés. Il existe une plus grande divergence entre les homologues de *FPC4* (Figure 55) que celle observée entre les homologues de *BILBO1* et *FPC2*.

L'environnement génétique et l'ordre des gènes entourant *FPC4* reste identique entre les différentes espèces de trypanosomes et est similaire à celui retrouvé chez les leishmanies. La majorité des gènes encadrant *FPC4* ne sont pas caractérisés et n'ont pas de fonction putative. *FPC4* est entouré de plusieurs gènes codant pour des protéines classées comme « hypothétiques ».

FPC4 est aussi classée comme « hypothétique » sur la base de données TritypDB (<http://tritypdb.org/tritypdb/>). Aucun domaine fonctionnel n'a été identifié chez FPC4 ou chez ses homologues *in silico*. Le logiciel de prédiction Phyre2 ne permet pas de prédire la conformation tridimensionnelle de FPC4. Il n'existe aucune homologie entre FPC4 et BILBO1 ou une autre protéine de *T. brucei*.



**Figure 56 :** Test d'interaction en double-hybride chez la levure, réalisé sur un milieu de sélection stringent (SC-L, -W, -H, -A, +AurA, +X  $\alpha$ -Gal). FPC4 interagit avec BILBO1 et elle-même dans les deux sens testés. Des tests d'interaction impliquant des troncations de BILBO1 (T1 à T5) ont permis d'identifier le domaine d'interaction de FPC4 avec BILBO1, soit le domaine N-terminal (T1). On observe le même résultat dans les deux sens d'interaction. Le contrôle positif représente l'interaction entre la protéine p53 et l'antigène-T. Le contrôle négatif teste l'interaction entre la lamine et l'antigène-T.



**Figure 57 :** Test d'interaction en double-hybride chez la levure, réalisé sur le milieu de sélection SC -L, -W, -H. Le domaine C-terminal de FPC4 interagit avec la troncation T1 de BILBO1, soit le domaine N-terminal. Il n'y a pas d'interaction entre BILBO1 (forme entière) et la forme tronquée de FPC4 sans domaine C-terminal. Le contrôle positif représente l'interaction entre la protéine p53 et l'antigène-T. Le contrôle négatif teste l'interaction entre la lamine et l'antigène-T.

## II. Interactome

Les interactions entre les protéines identifiées au FPC ont été testées en double-hybride chez la levure <sup>[210]</sup>. FPC4 a été fusionnée au domaine de fixation à l'ADN ou au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4, les interactions possibles avec BILBO1 et FPC4 elle-même ont été testées chez la levure.

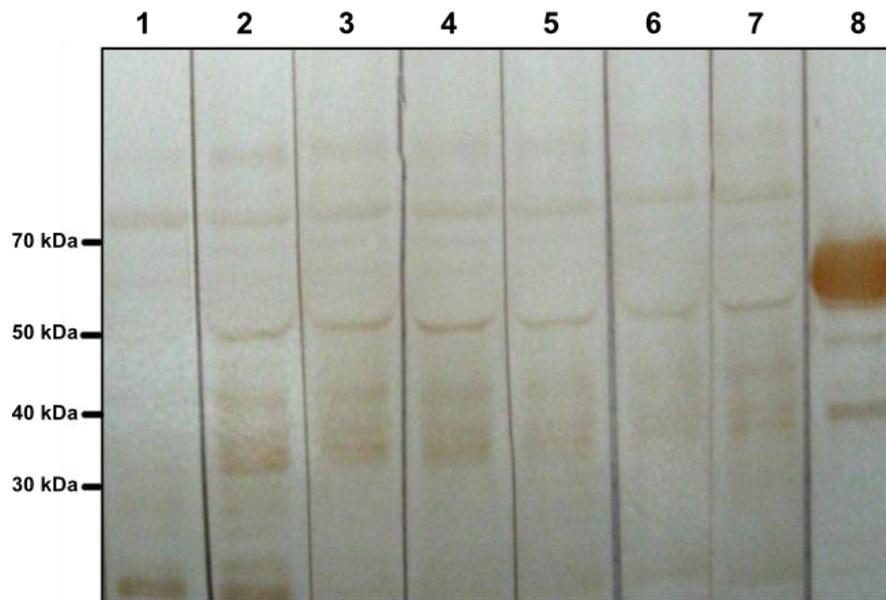
L'interaction entre FPC4 et BILBO1 (formes entières) a été testée en utilisant BILBO1 en appât et en proie et les résultats obtenus confirment l'interaction entre les protéines FPC4 et BILBO1 dans les deux sens et dans tous les milieux sélectifs d'interaction utilisés, même le plus stringent (milieu SC -L, -W, -H, -A, +AurA, +X  $\alpha$ -galactosidase) (Figure 56). Ceci suggère une forte interaction entre ces protéines.

Une analyse plus poussée utilisant 5 fragments de BILBO1, notés T1 à T5 (cf chapitre BILBO1) a permis d'identifier le domaine N-terminal de BILBO1 comme domaine d'interaction avec FPC4 (Figure 56). De plus, les cribles en double-hybride réalisés contre une banque génomique de *T. brucei*, utilisant BILBO1 comme appât ont identifiés une séquence d'interaction avec BILBO1 se situant en C-terminal de la protéine FPC4 (357-444). Ces résultats suggèrent que l'interaction entre BILBO1 et FPC4 fait intervenir les domaines N-terminal de BILBO1 et C-terminal de FPC4.

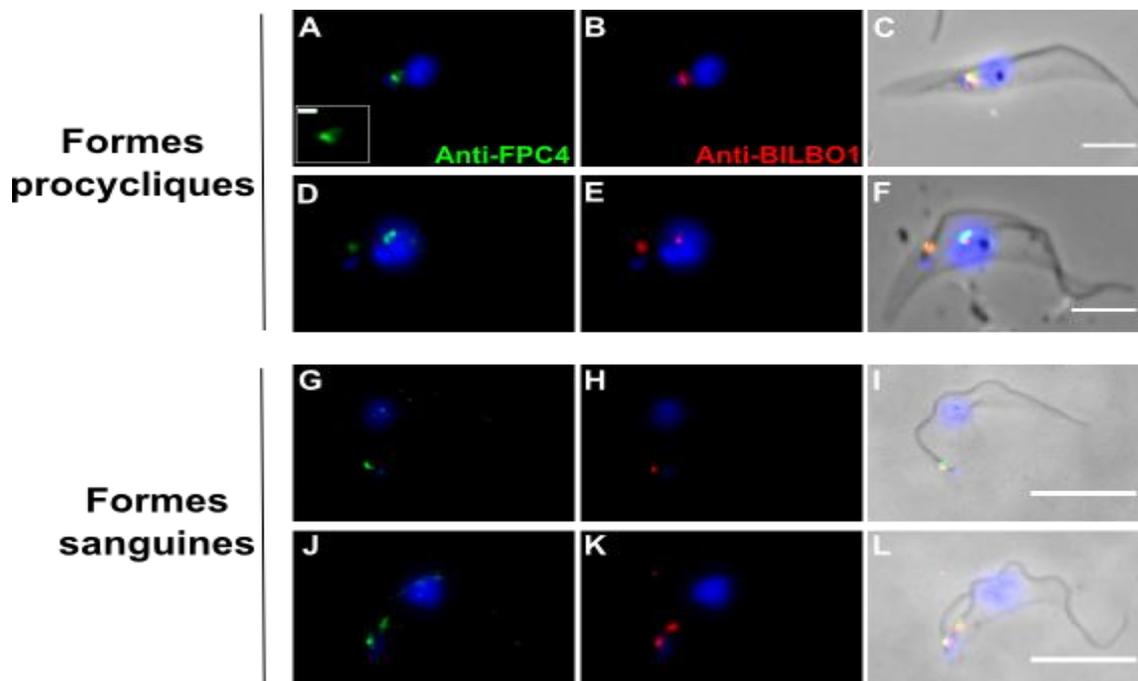
Afin de confirmer l'implication de ces deux domaines (N-terminal de BILBO1 et C-terminal de FPC4) dans l'interaction qui engage BILBO1 et FPC4, ces domaines ont été testés en double-hybride chez la levure (Figure 57). Les troncations de FPC4, soit le fragment FPC4<sup>ΔC-ter</sup> (aa. 1-356) et le fragment C-terminal de FPC4 (aa. 357-444) sont respectivement testés en interaction avec la forme entière de BILBO1, mais également avec le domaine N-terminal de BILBO1. Seule la forme tronquée de FPC4 contenant le domaine C-terminal est capable d'interagir avec BILBO1. Nous avons également confirmé, sur tous les milieux testés et dans les deux sens, l'interaction entre le domaine C-terminal de FPC4 et le domaine N-terminal de BILBO1 (Figure 57).

De plus, dans ce système double-hybride, FPC4 interagit avec elle-même (Figure 56). Ceci suggère une capacité d'oligomérisation de la protéine.

Ces résultats, identifiant FPC4 comme partenaire de BILBO1 suggèrent une localisation de FPC4 au niveau du FPC chez *T. brucei*, ainsi qu'une interaction directe entre BILBO1 et FPC4.



**Figure 58 : Western-Blot (WB) réalisé sur des préparations de cytosquelettes de souche de *T. brucei* ayant surexprimé FPC4 pendant 72 heures.** Chaque ligne de dépôt contient les protéines du cytosquelette d'environ  $10^7$  cellules ; Migration dans un gel à 8% d'acrylamide. Différents paramètres ont été testés pour chaque ligne de dépôt. En ligne 1 : Immuno-marquage avec le sérum pré-immunisation du rat sélectionné ( $d=1/1000$ ) ; pour les lignes 2 à 7 : Immuno-marquage avec le sérum post-immunisation anti-FPC4 de rat ( $d=1/1000$ ) ; en ligne 8 : Immuno-marquage avec un anticorps monoclonal de souris anti- $\alpha$ -tubuline (TAT1,  $d=1/1000$ ). Pour les lignes 2 à 7, des concentrations croissantes de lait (0, 0.5, 1, 2, 4, 5%) ont été utilisées lors de l'étape de blocage avant immuno-marquage. Le changement de ce paramètres ne modifie pas le profil protéique marquée, on peut néanmoins observée une bande à 50 kDa reconnue par l'anticorps (taille de FPC4 attendue = 50 kDa), elle migre juste sous la tubuline.



**Figure 59 : Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *T. brucei*, co-marquage avec le monoclonal de souris anti-BILBO1 (rouge) et le polyclonal de rat anti-FPC4 (vert), l'ADN est marqué au DAPI (bleu).** A-F : Formes procycliques de *T. brucei* ; G-L : Formes sanguines du parasite, où (A-C et G-I) représentent des cellules de configuration 1K1N (1 kinétoplaste et 1 noyau) et (D-F et J-L) représentent des cellules de configuration 2K1N (2 kinétoplastes et 1 noyau). Barre d'échelle : 5  $\mu$ m (A-F) et 10  $\mu$ m (G-L).

### III. Analyse fonctionnelle

#### A. FPC4 : protéine du FPC chez *T. brucei*

##### 1. Production d'un anticorps polyclonal anti-FPC4

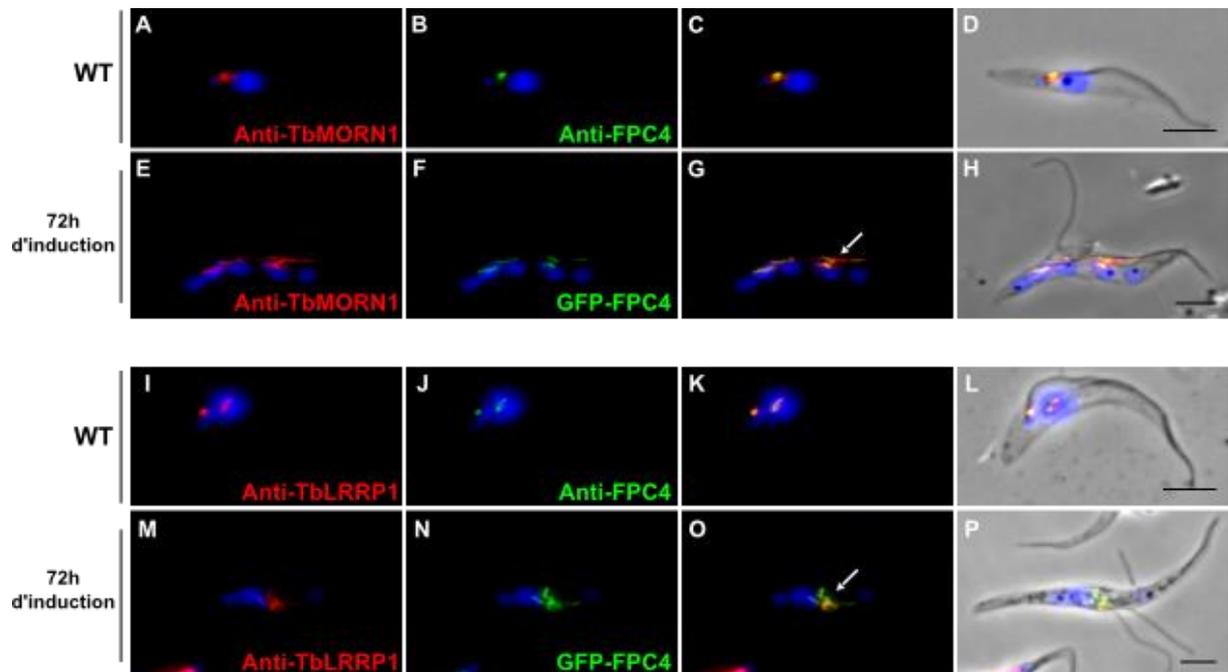
FPC4 a été exprimé chez la bactérie *E. coli*, fusionnée à une étiquette histidine placée en N-terminal et en C-terminal de la protéine. Chez la bactérie, la protéine est insoluble et retrouvée dans les corps d'inclusions. Ceux-ci sont solubilisés en présence de 8M Urée <sup>[211]</sup>. La protéine est ensuite purifiée par affinité sur colonne de nickel <sup>[212]</sup> et reprise dans un tampon dénaturant à 6M Urée (pH8). La protéine purifiée (His-FPC4-His) a été utilisée pour immuniser des rats et produire un sérum polyclonal anti-FPC4.

Cet anticorps, testé en Western-blot reconnaît la protéine purifiée. Néanmoins, dans un lysat cellulaire de *T. brucei* un grand nombre de protéine est reconnu. Ce marquage aspécifique du polyclonal anti-FPC4 n'a pas pu être réduit ou aboli par les différentes solutions de blocage et les différents lavages plus ou moins stringents réalisés lors du Western-blot (présence de Tween 20, avec ou sans BSA, avec ou sans lait, avec ou sans NaCl). Pour toutes ces conditions le même profil protéique a été observé (Figure 58). Différentes concentrations de cellules ont été testées pour des préparations de cytosquelettes et de flagelles, cependant les résultats observés n'ont pas été améliorés.

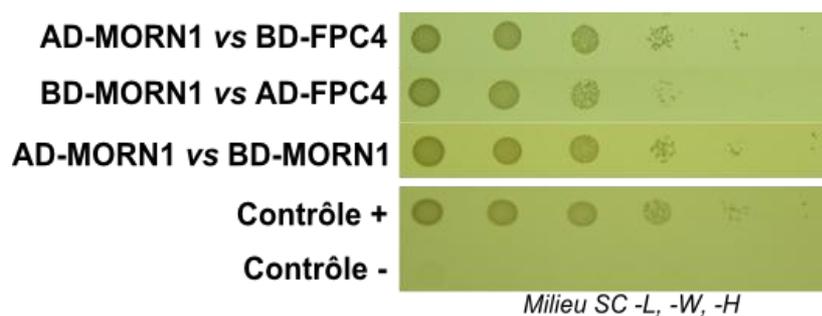
Nous avons donc cherché à purifier de façon plus affine les anticorps anti-FPC4. Deux types de purifications ont été testés : l'anticorps polyclonal a été purifié contre une préparation de cytosquelettes d'une souche de *T. brucei* pour laquelle l'ARNi de *FPC4* a été induit pendant 72 heures (en effet, après 72 heures d'induction, FPC4 n'est plus détecté en immunofluorescence (Figure 68)) ; l'anticorps a également été purifié contre une membrane PVDF <sup>[213]</sup> recouverte d'un lysat de cytosquelettes issus d'une souche pour laquelle l'ARNi de *FPC4* a été induit pendant 240 heures (après 240 heures d'induction de l'ARNi de *FPC4*, seuls 30% des ARN messagers de FPC4 subsiste au sein de la cellule) et aucun changement n'a été observé dans le profil protéique quel que soit les conditions, induite ou non-induite.

##### 2. Localisation de FPC4 chez *T. brucei*

En immunofluorescence, l'anticorps polyclonal de rat anti-FPC4 permet le marquage de FPC4 sur des cytosquelettes de *T. brucei* sous forme procyclique ou sanguine (Figure 59).



**Figure 60 : Co-localisation de TbMORN1 et TbLRRP1 avec FPC4.** Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *T. brucei*, co-marquage avec le polyclonal de rat anti-FPC4 (vert) et le polyclonal de lapin anti-TbMORN1 ou le monoclonal de souris anti-TbLRRP1 (rouge), l'ADN est marqué au DAPI (bleu). A-D et I-L représentent des cellules wild-type ; E-H et M-P représentent des cellules surexprimant GFP-FPC4 depuis 72 heures, la flèche désigne les structures linéaires dans lesquelles sont exprimées GFP-FPC4. Barre d'échelle : 5µm.



**Figure 61 : Test d'interaction en double-hybride chez la levure, réalisé sur le milieu de sélection SC -L, -W, -H.** La protéine MORN1 interagit avec elle-même ainsi qu'avec FPC4. Le contrôle positif représente l'interaction entre la protéine p53 et l'antigène-T. Le contrôle négatif teste l'interaction entre la lamine et l'antigène-T.

Ce marquage permet d'établir la localisation de la protéine au collier de la poche flagellaire (FPC) où elle colocalise partiellement avec BILBO1 tout au long du cycle de division cellulaire du parasite. FPC4 est localisée dans une structure en crochet dont la boucle colocalise avec BILBO1 (Figure 59).

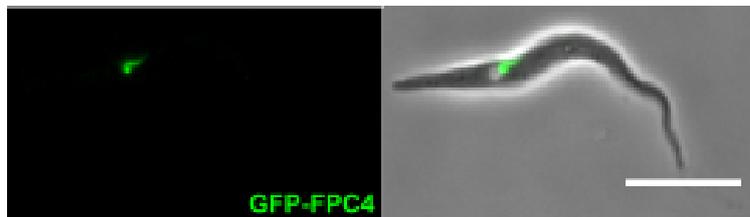
De façon intéressante, cette structure est très similaire à celle dans laquelle on retrouve les protéines *TbMORN1* [138] et *TbLRRP1* [139] chez *T. brucei*. Ces deux protéines ont été identifiées au sein d'une « structure » appelée bilobe, située entre le kinétoplaste et le noyau [39]. Elles ont été caractérisées comme impliquées dans la régulation de la duplication du Golgi. Ces deux protéines sont localisées dans une structure en forme de crochet qui colocalise partiellement avec BILBO1 [138, 139]. Des co-marquages réalisés avec les anticorps anti-*TbMORN1* et anti-*TbLRRP1* ainsi qu'avec l'anticorps anti-FPC4, montrent que la protéine FPC4 colocalise partiellement avec *TbMORN1* et *TbLRRP1* au sein de structure en crochet de forme très similaire (Figure 60A-D et I-L).

### 3. Interaction entre FPC4 et les protéines du bilobe

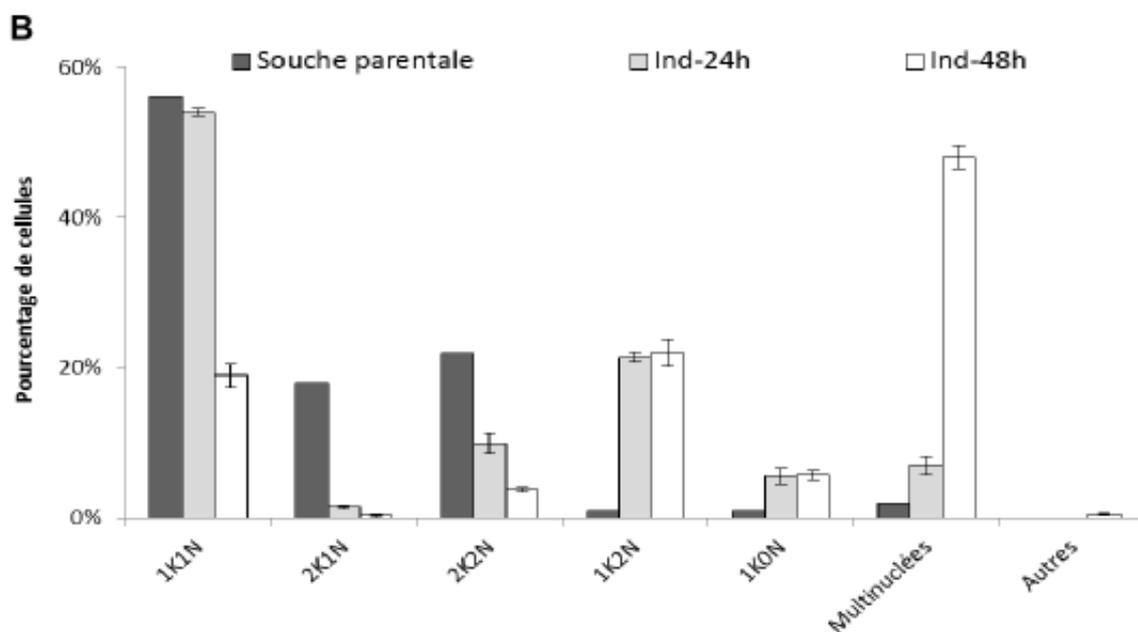
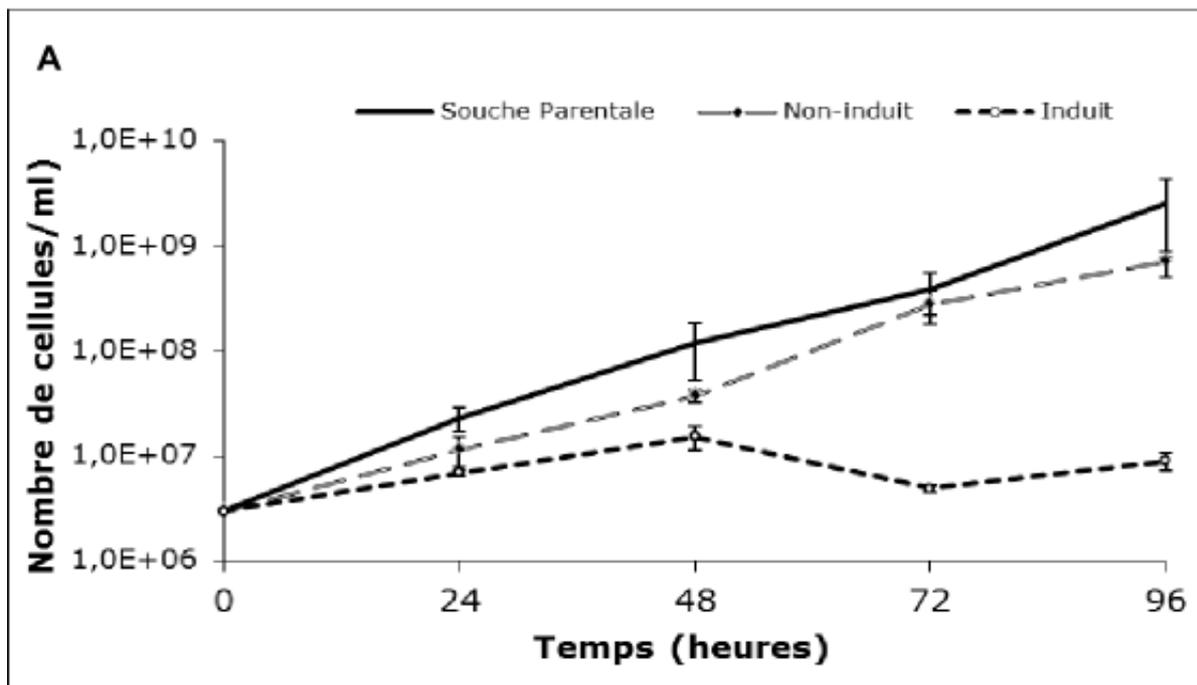
Les deux protéines du bilobe citées précédemment ne présentent aucune homologie entre-elles ou avec FPC4. Des tests d'interactions en double-hybride chez la levure, ont été réalisés afin de déterminer si FPC4 pouvait interagir avec *TbMORN1* ou *TbLRRP1*, ou encore si ces deux protéines pouvaient interagir avec BILBO1 ou entre-elles.

Les résultats de cette analyse montrent que FPC4 interagit avec *TbMORN1* (Figure 61), mais pas avec *TbLRRP1*. De plus, nous avons montré que ces deux protéines (*TbMORN1* et *TbLRRP1*) n'interagissent pas avec BILBO1.

*TbMORN1* et *TbLRRP1* ont été identifiées au niveau du bilobe de *T. brucei*, à partir d'analyses protéomiques indépendantes [138, 139]. Aucune analyse de l'interaction potentielle entre ces deux protéines n'a été publiée à ce jour, toutefois nos travaux montrent que dans le système levure, *TbMORN1* et *TbLRRP1* n'interagissent pas entre elles. De plus, on ne retrouve une interaction entre *TbMORN1* et elle-même que sur le milieu d'interaction le plus sensible et le moins stringent testé (milieu SC - Histidine), ce qui pourrait traduire une interaction faible entre la protéine et elle-même. Ces résultats suggèrent que FPC4 pourrait être impliquée dans le lien protéique existant entre les protéines du FPC, tel que BILBO1, et celles du bilobe, tel que *TbMORN1*.



**Figure 62 :** Cellule (*T. brucei*) où GFP-FPC4 a été surexprimée pendant 3 heures. GFP-FPC4 est localisée dans une structure en crochet proche de la poche flagellaire. Barre d'échelle 5 $\mu$ m.



**Figure 63 :** (A) : Courbe de croissance des cellules surexprimant GFP-FPC4. Après 48 heures de surexpression, la croissance des cellules est inhibée : effet toxique. Après 96 heures de surexpression il y a une reprise de la croissance, traduisant une réversion de la souche. (B) : Comptage du type de cellules retrouvées après induction de la surexpression de GFP-FPC4 (500 cellules comptées, n=3).

Des analyses fonctionnelles de surexpression et d'ARN interférence de *FPC4* ont été réalisées, afin de déterminer le rôle de FPC4 au sein du FPC.

## **B. Surexpression de FPC4 chez *T. brucei***

### **1. Surexpression de GFP-FPC4**

La protéine de fusion GFP-FPC4 a été surexprimée de façon inductible <sup>[165]</sup> chez la forme procyclique de *T. brucei*. Après une courte expression (3 heures), GFP-FPC4 se localise dans une structure en crochet, au FPC où elle colocalise partiellement avec BILBO1. Comme FPC4, la protéine de fusion GFP-FPC4 se localise au FPC (Figure 62).

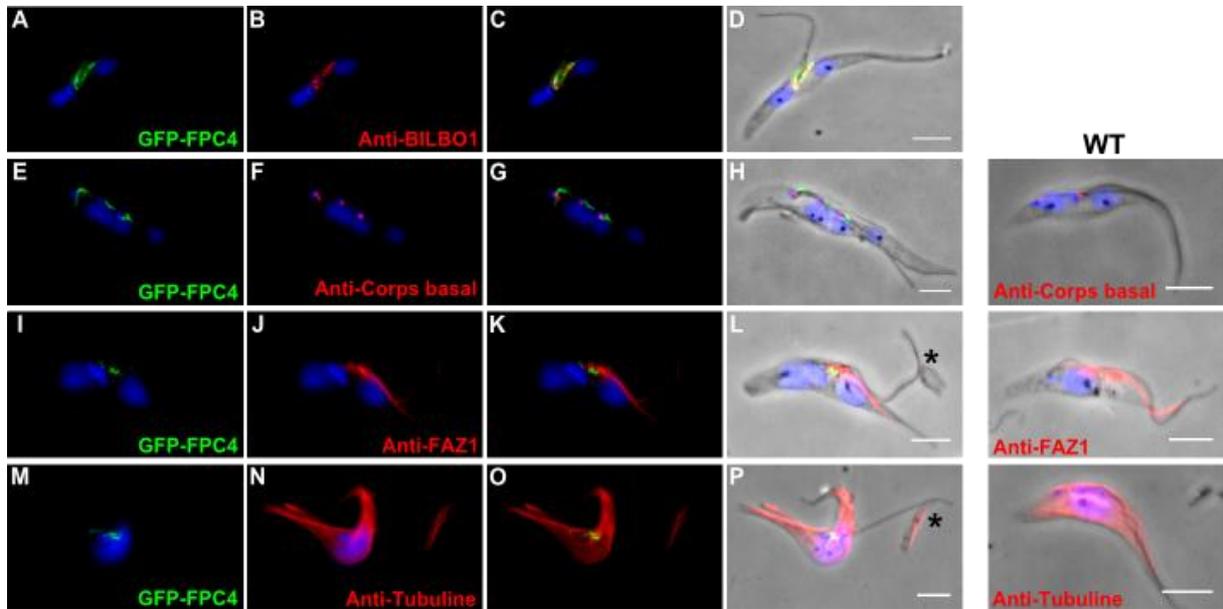
Une plus longue expression de la protéine de fusion entraîne une inhibition de la croissance cellulaire. En effet après 48 heures de surexpression, on observe une diminution de la croissance qui persiste jusqu'à 72 heures d'induction. Après 72 heures d'induction, la croissance diminue de plus de 98% (Figure 63A). Il y a donc un effet toxique de la surexpression de la protéine de fusion, ce qui traduit un effet dominant négatif de cette surexpression <sup>[214]</sup>. On observe une reprise de la croissance après 96 heures de surexpression, qui pourrait témoigner de l'apparition d'une réversion de la souche induite <sup>[215]</sup>.

#### **a) Observation en microscopie optique**

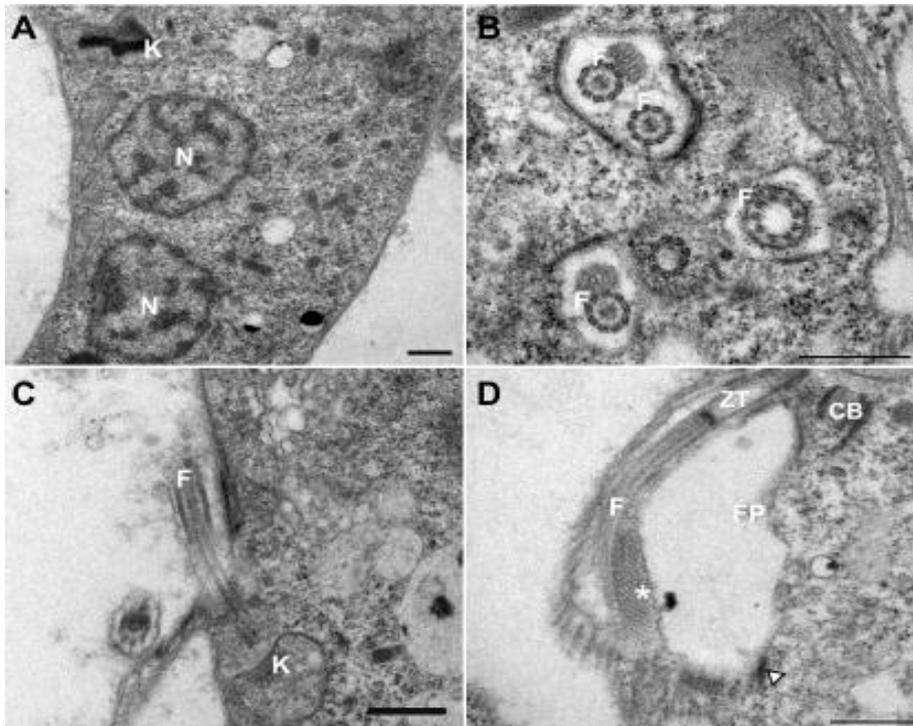
L'inhibition de la croissance s'accompagne aux premières heures de l'induction (dès 24 heures) d'une inhibition de la ségrégation des kinétoplastes, soit une augmentation du nombre de cellules 1K2N (Figure 63B et 65A). Faisant suite à ce phénotype, on observe une augmentation de la population de cellules multinucléées, multiflagellées et présentant des flagelles détachés toujours motiles.

Après 48 heures d'induction, environ 50% de la population cellulaire totale est représenté par des cellules multinucléées, ce qui traduit un défaut de cytokinèse chez la souche induite (Figure 63B). En effet, les cellules observées ont plusieurs noyaux, plusieurs corps basaux et flagelles et on constate dans la majorité des cas une altération de l'organisation de la FAZ (Figure 64I-L).

Chez un faible pourcentage des cellules comportant un flagelle détaché (moins de 5%), on a observé des flagelles détachés qui présentent à leur extrémité un fragment de corps cellulaire comportant des microtubules, qui reste associé via la FAZ au flagelle (Figure 64I-P). Ce phénomène pourrait résulter d'une altération qui fragiliserait la FAZ. De ce fait, suite au battement du flagelle et à une cytokinèse aberrante, on pourrait observer un détachement d'un fragment de corps cellulaire qui reste associé au flagelle.



**Figure 64** : Immunofluorescence des cytosquelettes de cellules surexprimant GFP-FPC4 après 48 heures d'induction. A-D : co-marquage GFP-FPC4 (vert) et BILBO1 par le monoclonal de souris anti-BILBO1 (rouge) ; E-H : GFP-FPC4 (vert) et marquage des corps basaux par l'anticorps de souris mAb15 (rouge) ; I-L : GFP-FPC4 (vert) et marquage de la FAZ par l'anticorps de souris anti-FAZ1 (rouge) ; M-P : GFP-FPC4 (vert) et marquage des microtubules par l'anticorps de souris TAT1 (rouge). L'astérisque désigne un fragment de corps cellulaire rattaché via la FAZ à une extrémité du flagelle. Barre d'échelle : 5µm.



**Figure 65** : Coupes de cellules fixées ayant surexprimé GFP-FPC4 pendant 72 heures, analysées en microscopie électronique à transmission. K : Kinétoplaste, N : Noyau, F : Flagelle, FP : Poche flagellaire, ZT : Zone de transition, CB : Corps basal, l'astérisque désigne la PFR, la tête de flèche désigne une structure dense aux électrons à la zone de sortie du flagelle qui pourrait représenter le collier de la poche flagellaire. Barre d'échelle : 500 nm.

Un phénomène quasiment similaire a récemment été observé suite à l'ARN interférence d'une kinésine orpheline *TbKIN-D* chez *T. brucei* où un flagelle caractérisé comme détaché, reste associé *via* la FAZ à un fin corps cellulaire <sup>[216]</sup>.

### **b) Observation en microscopie électronique**

L'analyse en microscopie électronique à transmission, de l'ultrastructure de la FP et du FPC sur des coupes ultrafines des cellules surexprimant GFP-FPC4, permet de montrer une altération de la structure du FPC ainsi que l'apparition de phénotypes aberrants au sein de la FP.

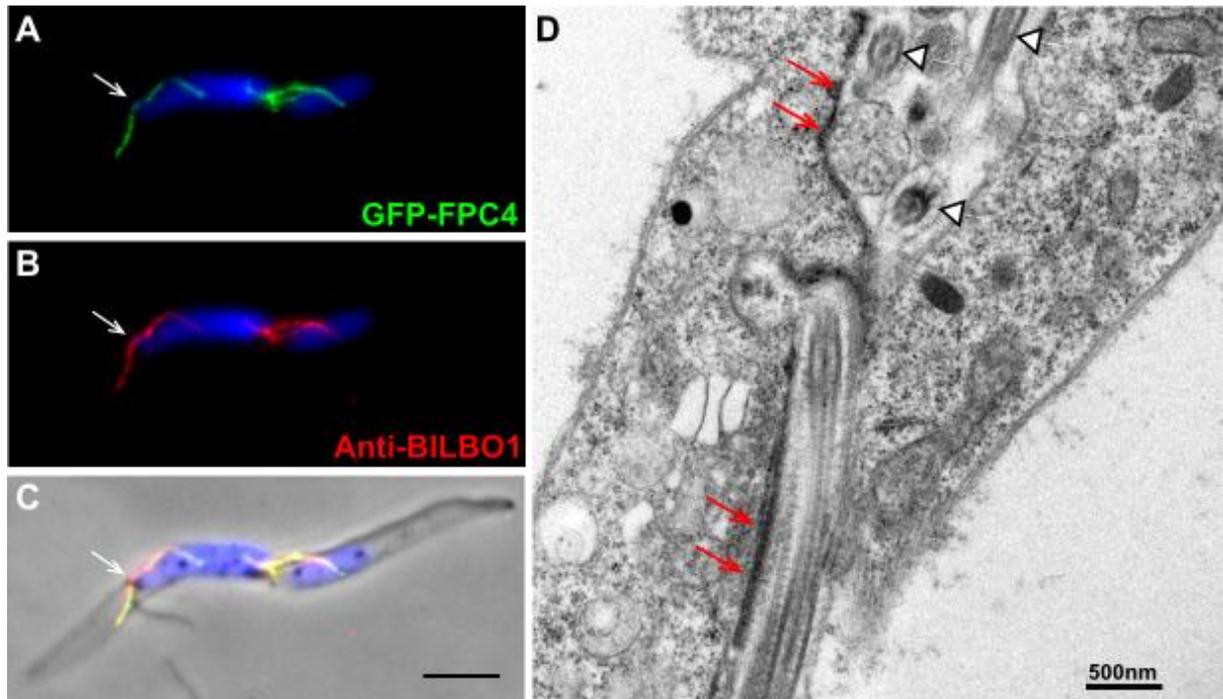
On observe après 72 heures de surexpression de GFP-FPC4 un élargissement de la poche flagellaire. En effet, la distance mesurée entre la zone de transition du flagelle et le site de sortie du flagelle est d'environ de 2 à 3  $\mu\text{m}$ , au lieu des 500nm mesuré chez les cellules parentales (Figure 65D).

Au sein de la FP, on peut également observer plusieurs vésicules, suggérant une altération de la fonctionnalité de la poche. Celle-ci étant normalement impliquée dans les phénomènes d'endocytose et d'exocytose chez *T. brucei* (Figure 66D). Il faut également noter la présence au sein du même FP de plus de deux flagelles suggérant une inhibition de la division de la FP (Figure 65B et 66D).

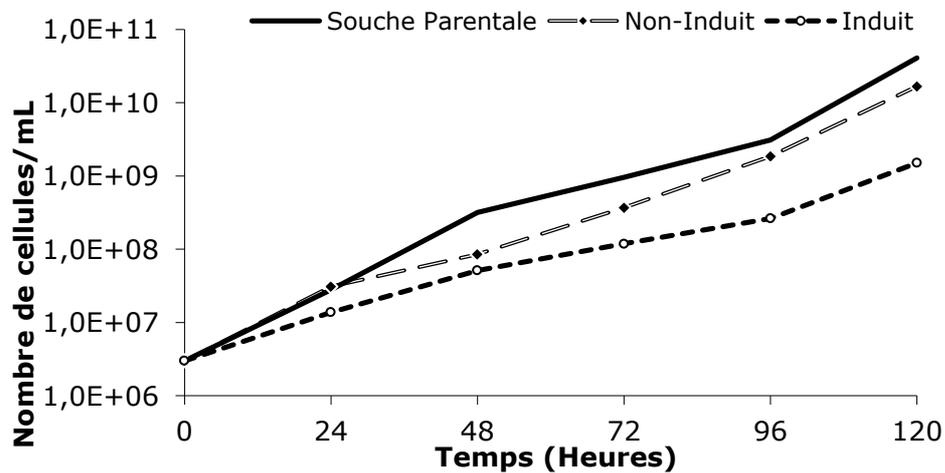
De plus, on observe une structure flagellaire extra-axonémale appelée PFR au sein de la poche flagellaire (Figure 65B). Or en condition wild-type, la PFR n'est jamais retrouvée dans la poche, cette structure n'apparaît qu'après la sortie du flagelle de la FP, cette zone de sortie étant définie par le FPC. Chez certaines cellules, on observe des flagelles détachés qui ne sont pas associés à une poche ou qui semblent émerger d'une poche dont la structure ne s'est pas maintenue (Figure 65C), ce qui pourrait être dû à une altération du collier qui n'assure plus sa fonction de maintien de la poche autour du flagelle <sup>[130]</sup>.

Sur certaines coupes cellulaires, on observe une zone dense aux électrons le long de la FP qui semble représenter le FPC dans une structure linéaire également observée en immunofluorescence dans laquelle on retrouve GFP-FPC4 et BILBO1 (Figure 66A-D). La surexpression de GFP-FPC4 chez *T. brucei* entraîne une déformation du FPC ainsi que celle de la structure où se localise la protéine BILBO1.

De façon intéressante, chez toutes les cellules surexprimant GFP-FPC4, on observe aussi une déformation de la structure dans laquelle se localise *TbMORN1* et *TbLRRP1* (Figure 60E-H et M-P). En effet ces deux protéines se retrouvent dans une structure linéaire qui suit celle formée par GFP-FPC4 et BILBO1.



**Figure 66** : Surexpression de GFP-FPC4 après 72 heures d'induction. (A-C) : Immunofluorescence sur des cytosquelettes de cellules, GFP-FPC4 (vert) et marquage de BILBO1 avec le monoclonal de souris anti-BILBO1 (rouge). Barre d'échelle : 5 $\mu$ m. (D) : Coupe de microscopie électronique d'une poche flagellaire d'une cellule ayant surexprimée GFP-FPC4 pendant 72 heures. La flèche désigne la structure linéaire renfermant GFP-FPC4 et BILBO1, la tête de flèche désigne les flagelles.



**Figure 67** : Courbe de croissance des cellules surexprimant FPC4 chez *T. brucei*. Dès 24 heures de surexpression de FPC4 : ralentissement de la croissance cellulaire.

La surexpression de GFP-FPC4 entraîne également une déformation la structure du bilobe, qui pourrait être due à l'interaction entre GFP-FPC4 et *TbMORN1*.

## 2. Surexpression de FPC4 sans étiquette

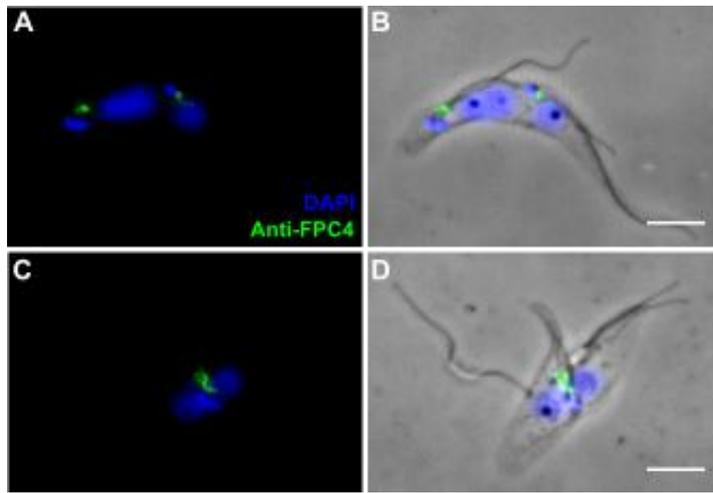
De façon similaire à la surexpression de GFP-FPC4, la surexpression de FPC4 chez *T. brucei* (forme procyclique) entraîne également une légère inhibition de la croissance cellulaire (Figure 67). Celle-ci est associée à une déformation ou une déstructuration de la structure où se localise BILBO1, ce qui suggère une altération de la structure même du FPC (Figure 68A-D).

Comme précédemment (cas de la surexpression de GFP-FPC4), ce phénotype semble associé à une inhibition de la ségrégation des kinétoplastes, suivie d'une inhibition de la cytokinèse. L'absence de l'étiquette GFP n'inhibe pas le phénotype de défaut de cytokinèse associé à la surexpression de FPC4, bien que l'effet observé soit plus rapide et spectaculaire (présence de filaments (Figure 65A-C)) lorsque l'on surexprime GFP-FPC4. Il est possible que la présence de l'étiquette GFP favorise une oligomérisation supplémentaire ou différente de la protéine FPC4, ce qui augmenterait la stabilité de la protéine et son accumulation au niveau du FPC.

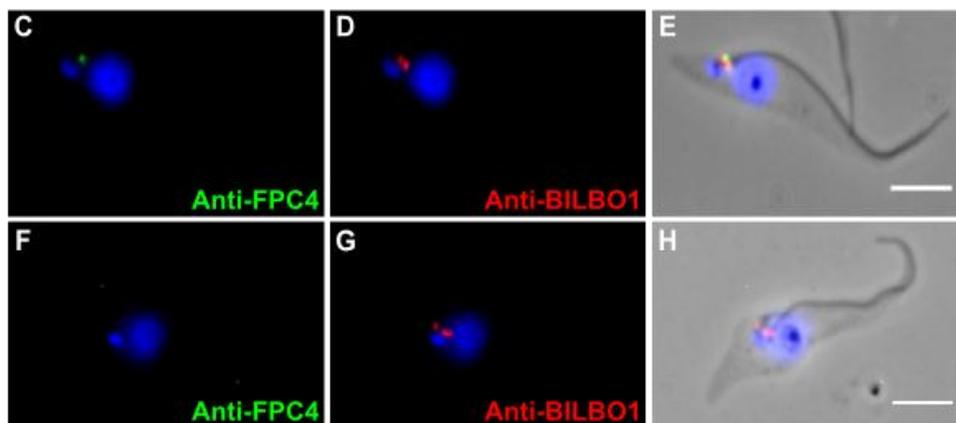
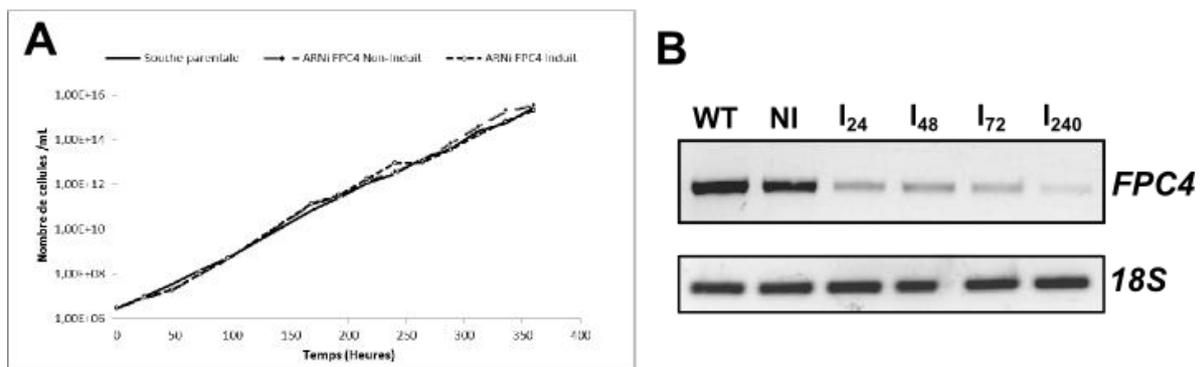
FPC4 semble être une protéine structurale connectée à plusieurs protéines du collier et du bilobe.

## C. ARN interférence de FPC4

L'ARN interférence de *FPC4* est induit par la production d'un ARN double-brin ciblant *FPC4*, chez la forme procyclique de *T. brucei*. Deux types de constructions ont été utilisées : l'une permettant la transcription de deux brins d'ARN, sens et anti-sens, d'une séquence cible de *FPC4* placée sous la dépendance de deux promoteurs T7 situés de part et d'autre de la séquence ; et l'autre permettant la transcription d'une structure tige-boucle d'ARN double brin ciblant FPC4 <sup>[165]</sup>. Des études précédentes ont montré que l'efficacité de l'ARN interférence induit par une structure tige-boucle d'ARN est plus importante <sup>[208]</sup>. Toutefois, dans les deux cas l'ARN interférence de FPC4 n'entraîne pas de modification de la croissance cellulaire du parasite. En effet, la croissance reste similaire à celle des cellules non-induites ou des cellules issues de la lignée parentale (Figure 69A).



**Figure 68 : Images d'immunofluorescence réalisées sur des cytosquelettes de *T. brucei* ayant surexprimées FPC4 sans étiquette pendant 72 heures.** La protéine FPC4 est marquée par l'anticorps polyclonal anti-FPC4. On observe une inhibition de la cytokinèse et la formation de cellules multinucléées comportant des flagelles détachés. Barre d'échelle= 5μm.



**Figure 69 : ARN interférence de FPC4 chez *T. brucei* forme procyclique.** (A) : Courbe de croissance d'une souche de *T. brucei* induite pour l'ARNi de FPC4. Il n'y a pas de différence de croissance entre les souches induite, non-induite et parentale. (B) : RT-PCR semi-quantitative révélant le taux d'expression des ARNm de FPC4 pendant l'induction de l'ARNi (jusqu'à 240 heures d'induction). On observe dès 24 heures d'induction la diminution des ARNm de FPC4. Le gène de référence utilisé est celui de la sous-unité 18S de l'ARNr. (C-H) : Immunofluorescence effectuée sur des cytosquelettes de *T. brucei*, utilisant le polyclonal de rat anti-FPC4 (vert) et le monoclonal de souris anti-BILBO1 (rouge). (C-E) : cellules non-induites ; (F-H) : cellules induites pendant 48 heures pour l'ARNi de FPC4. Barre d'échelle=5μm.

La diminution du taux de protéine FPC4 chez les lignées ARNi<sup>FPC4</sup> n'a pas pu être contrôlée par western-blot, car l'anticorps polyclonal anti-FPC4 ne permet pas de distinguer la protéine au sein d'un lysat cellulaire de parasites (Figure 58 et 70). En effet, un grand nombre de protéines sont reconnues par l'anticorps, y compris une ou des protéines migrant à 50 kDa. Néanmoins, après induction de l'ARNi de *FPC4*, on n'observe aucun changement dans le profil protéique reconnu par l'anticorps (Figure 70). En conséquence, afin de contrôler l'efficacité de l'ARN interférence, une RT-PCR semi-quantitative a été réalisée.

En immunofluorescence, à partir de 48 heures d'induction de l'ARNi, on observe une diminution de la fluorescence marquant FPC4 et dès 72 heures d'induction plus aucune fluorescence associée à FPC4 n'est visible au microscope (Figure 68F). On a observé dès 24 heures après induction, une diminution de 50% [ $\pm$  0.007] du taux d'ARN messagers (ARNm) de *FPC4* et après 10 jours d'induction (240 heures) on observe une diminution de plus de 70% [ $\pm$  0.014] des ARNm de *FPC4* (Figure 69B). Toutefois, même après 10 jours d'induction de l'ARNi de *FPC4*, les cellules observées en immunofluorescence ne présentent pas de phénotypes aberrants détectables en microscopie optique. Les structures de BILBO1 sont toujours présentes et capables de se diviser (Figure 69F-H). Cette observation est corroborée par le résultat de la RT-PCR des ARNm de *BILBO1* montrant une constance du taux de messagers de *BILBO1* au cours de l'induction de l'ARNi de *FPC4* (Figure 87B).

On peut observer également les structures en crochet de *TbMORN1* et *TbLRRP1* au sein des cellules induites. Il semble donc que suite à l'ARNi de *FPC4* chez la forme procyclique de *T. brucei*, aucune perturbation de la croissance cellulaire ou du cycle de division cellulaire du parasite n'apparaît. Ce phénomène pourrait être dû à une compensation de la diminution de FPC4 par une ou plusieurs autres protéines impliquées dans le complexe protéique des structures du FPC et du bilobe.

Chez la forme procyclique, FPC4 ne semble donc pas être essentielle à la survie et prolifération du parasite. L'ARNi de *FPC4* a également été induit chez la forme sanguine proliférative de *T. brucei*, toutefois son effet sur la croissance cellulaire reste encore à étudier. Les résultats d'ARNi<sup>FPC4</sup> que nous avons observés chez la forme procyclique rejoignent ceux obtenus par l'équipe du Dr. D. Horn lors du crible des ARNi de tous les gènes de *T. brucei* [48]. En effet, leurs travaux ne faisaient pas état d'une altération de la croissance cellulaire après induction de l'ARNi de *FPC4*, quel que soit la condition testée (chez les formes procycliques, les formes sanguines ou lors de la différenciation des sanguines en formes procycliques)

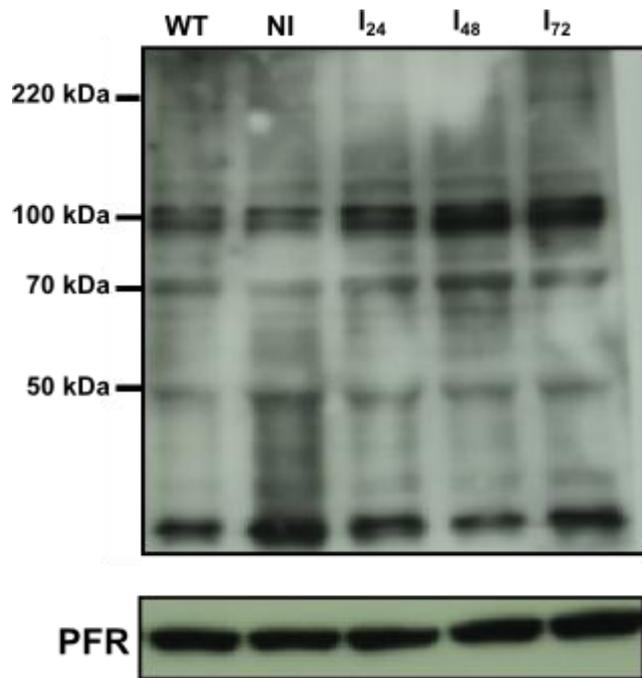


Figure 70 : WB réalisé sur des préparations de cytosquelettes de  $2,5 \cdot 10^7$  cellules (*T. brucei*) de souche parentale (WT) ainsi que celles induites pour l'ARNi de *FPC4*. Immuno-marquage effectué avec l'anticorps polyclonal de rat anti-FPC4 purifié contre une préparation de cytosquelettes de cellules induites pendant 72 heures pour l'ARNi de *FPC4* (d=1/3000).

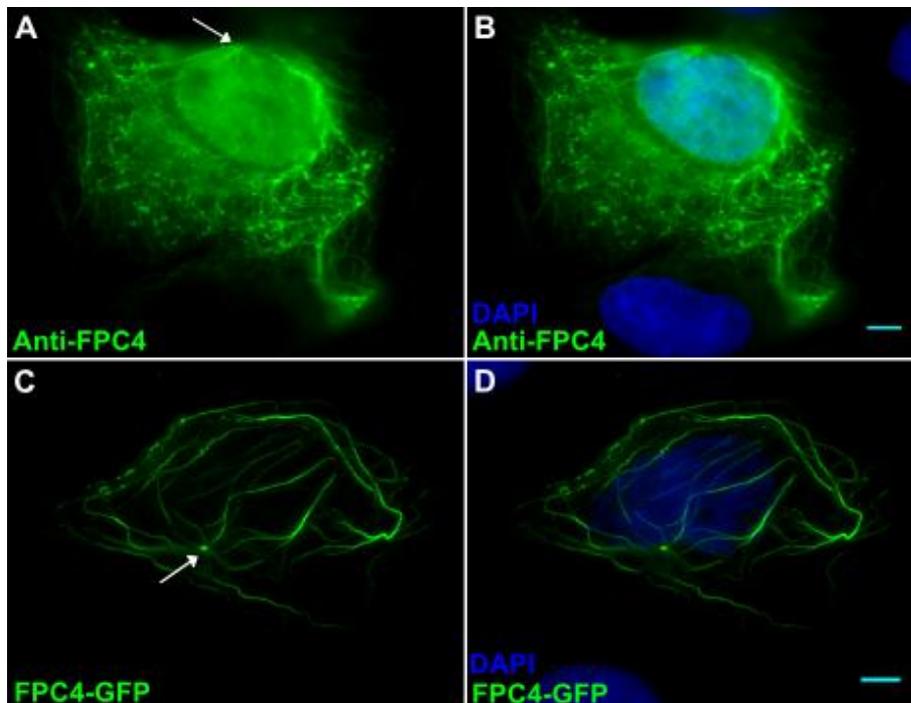


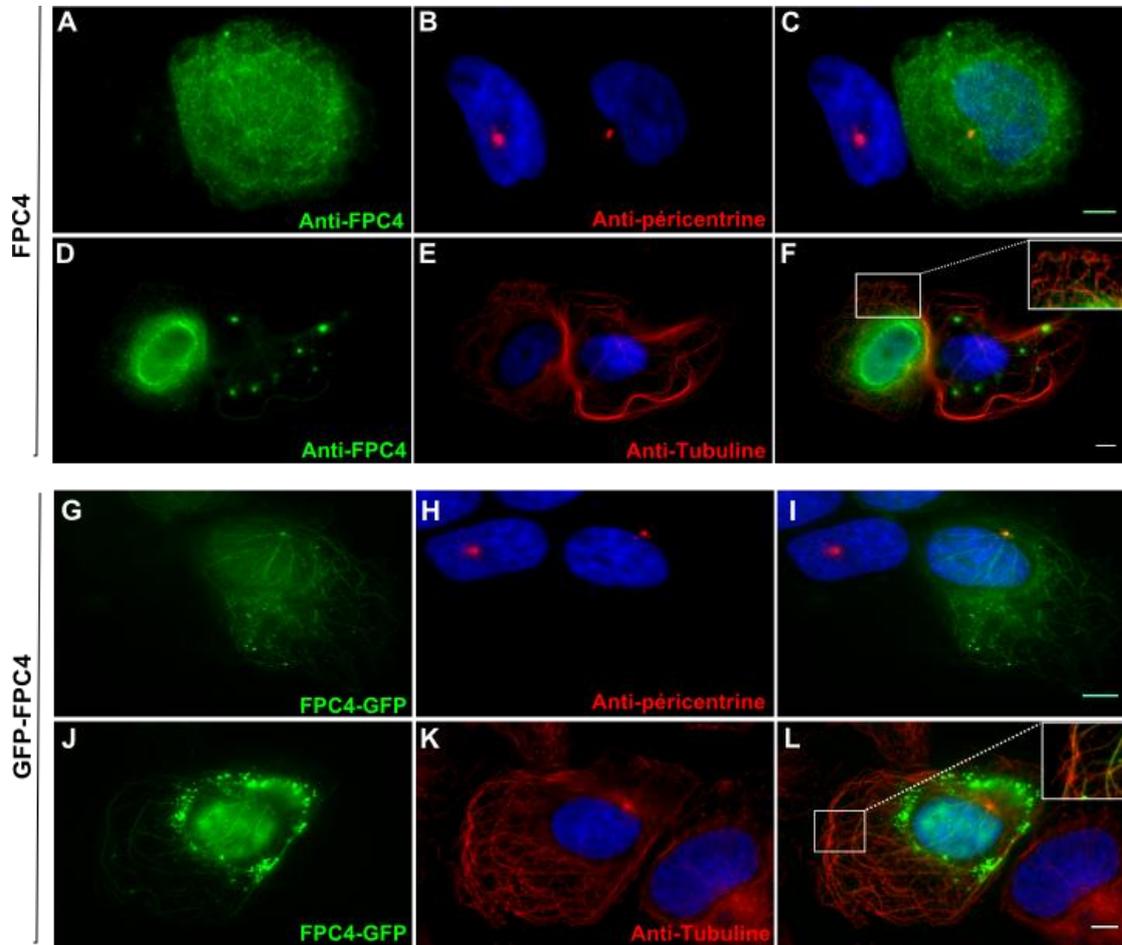
Figure 71 : Expression de FPC4 (A-B) et FPC4-GFP (C-D) (24 heures après transfection) chez les cellules U2-OS. Marquage de FPC4 avec un polyclonal de rat anti-FPC4 (vert), marquage de l'ADN par le DAPI (bleu). La flèche désigne un point de convergence ou d'émergence des filaments où se localise FPC4. Barre d'échelle: 5 $\mu$ m

## D. Expression de FPC4 en système hétérologue

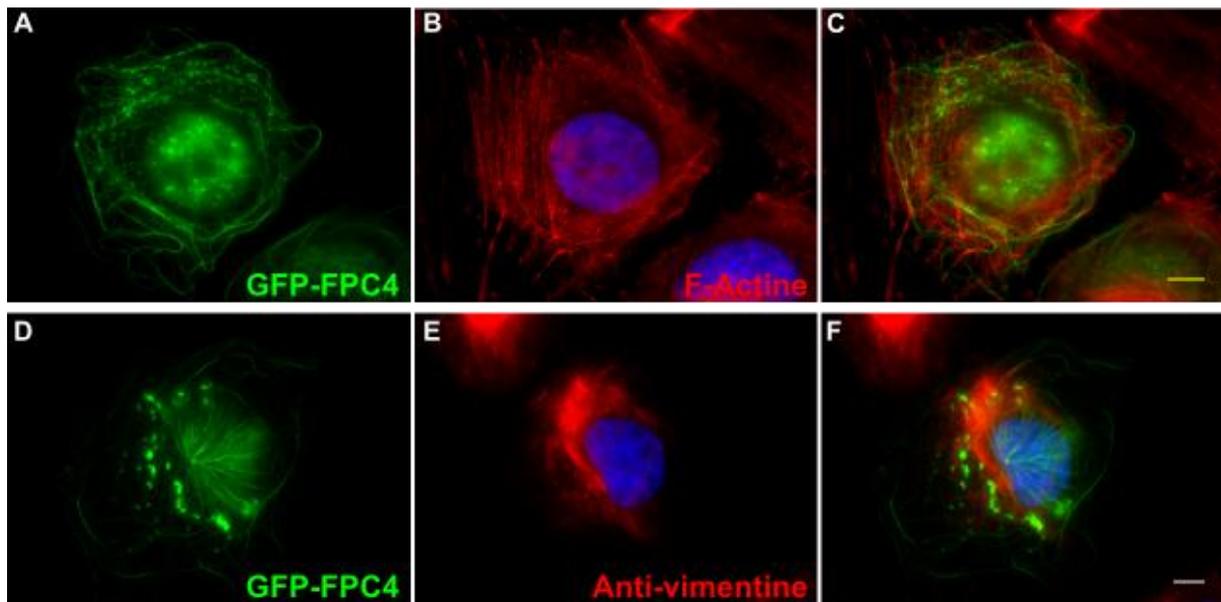
La protéine FPC4, comme BILBO1 est spécifique des *Kinetoplastidae*, de plus les résultats obtenus en double-hybride montrent une capacité potentielle d'oligomérisation. Aussi, afin de mettre en évidence les propriétés intrinsèques de FPC4, cette protéine a été exprimée dans un système hétérologue. FPC4 a été exprimée chez les cellules U-2 OS (lignée cellulaire d'ostéosarcome humain) <sup>[217, 218]</sup>. Comme BILBO1, cette protéine a été exprimée, fusionnée ou non en C-terminal à la GFP dans un système mammifère. FPC4 a été cloné dans un vecteur d'expression chez les cellules mammifères plaçant l'expression du gène d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur viral (promoteur CMV <sup>[154]</sup>). Après transfection le vecteur est présent de façon ectopique chez la cellule <sup>[153]</sup>.

Les cellules ont été observées 6 heures et 24 heures après transfection, suite à l'expression de FPC4 fusionnée ou non à la GFP. Dans les deux cas, on observe au sein des cellules transfectées la présence de structures linéaires qui semblent émerger ou converger vers une même zone cellulaire (Figure 71). Ce type de structure semble similaire à celle présentée par les microtubules (MTs) émergeant du centrosome chez les cellules mammifères <sup>[219]</sup>. Des co-marquages avec des anticorps anti-tubuline (marquage des MTs) et des anticorps anti-péricentrine <sup>[219, 220]</sup> (marquage du centrosome) ont été réalisés. On observe que FPC4 colocalise avec les MTs ainsi que le centrosome, ce qui laisse supposer que FPC4 est capable de suivre ou de s'associer aux MTs dès leur nucléation à partir d'un anneau de  $\gamma$ -tubuline, au centrosome <sup>[221]</sup>. Il est possible également que FPC4 puissent interagir avec une ou plusieurs protéines associées au MTs <sup>[222]</sup> (Figure 72). On peut noter également que le réseau et l'organisation des MTs ne semble pas être fortement perturbé par l'interaction directe ou indirecte avec FPC4. La protéine FPC4 ne semble pas entraîner de réorganisation du réseau de MTs, contrairement à ce qui a pu être observé suite l'expression dans les cellules d'un facteur de différenciation nommé TIG3, capable d'interagir avec la péricentrine et la  $\gamma$ -tubuline et de modifier l'agencement du réseau de microtubule <sup>[223]</sup>. Nous avons également contrôlé si FPC4 pouvait colocaliser avec d'autres réseaux du cytosquelette des cellules U-2 OS, notamment le réseau d'actine et de vimentine, et aucune colocalisation n'a pu être observée (Figure 73).

Les MTs sont organisés en plusieurs sous-populations de microtubules suivant les modifications post-traductionnelles qui y sont associées. Une de ces sous-populations de microtubules est acétylée. Par immunofluorescence, on a pu observer une colocalisation entre FPC4-GFP et cette sous-population (Figure 74D-F).



**Figure 72 : Co-marquage de péricentrine et tubuline avec FPC4 et FPC4-GFP (6 heures et 24 heures après transfection).** A-F : expression de FPC4 chez les U2-OS ; G-L : expression de FPC4-GFP chez les cellules U2-OS. (A-C et G-I) Marquage de la péricentrine et du centrosome avec un anticorps de lapin anti-péricentrine (rouge). FPC4 étiqueté ou non se localise au niveau du centrosome ; (D-F et J-L) Marquage de la tubuline par un monoclonal de souris anti-tubuline  $\alpha$  (rouge). FPC4 ou FPC4-GFP colocalise également avec les microtubules de la cellule. Barre d'échelle : 5 $\mu$ m.



**Figure 73 : Co-marquage de l'actine ou la vimentine avec la protéine de fusion FPC4-GFP exprimée chez les cellules U2-OS pendant 24 heures.** A-C : Marquage de l'actine *via* la phalloïdine conjuguée à l'Alexa 594 ; D-F : Marquage de la vimentine par l'anticorps anti-vimentine. Barre d'échelle : 5 $\mu$ m.

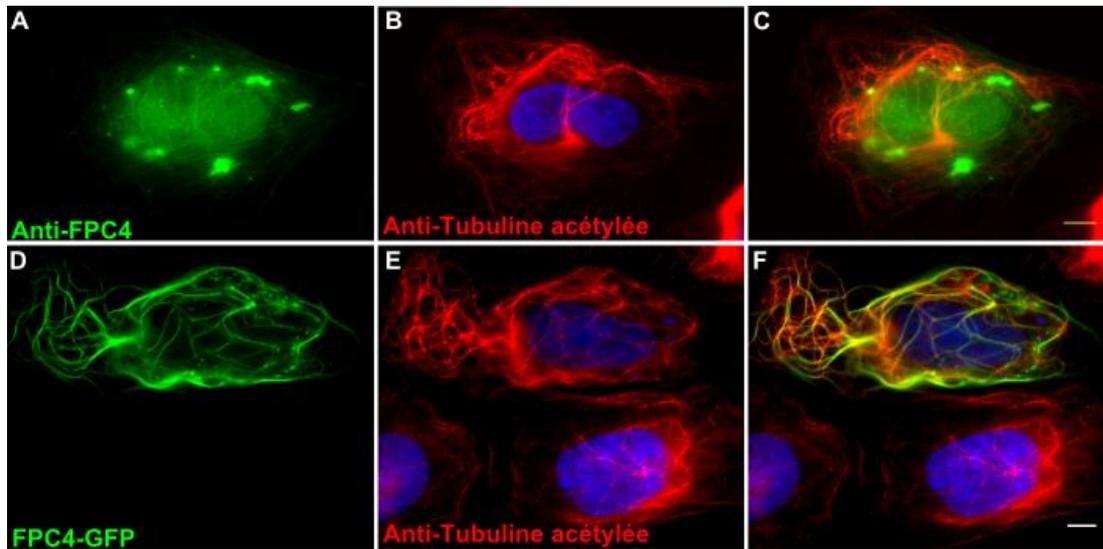
Cependant, sans l'étiquette GFP on n'observe plus de colocalisation entre les microtubules acétylés et le réseau de filaments FPC4. Les microtubules acétylés sont représentatifs des microtubules stables dans la cellule [224].

Dans l'hypothèse que FPC4 puisse interagir de façon directe avec les MTs, nous avons réalisé des expériences de déstabilisation et dépolymérisation des MTs *via* le froid et le nocodazole [225, 226]. Le nocodazole est une molécule capable de se fixer à la  $\beta$ -tubuline, empêchant ainsi son interaction avec l' $\alpha$ -tubuline. Cela favorise la dépolymérisation des microtubules. On observe qu'après traitement au froid ou au nocodazole, le réseau de microtubules des cellules exprimant FPC4-GFP reste présent et relativement stable (Figure 75D-F et J-L) alors que dans les cellules n'exprimant pas FPC4-GFP, le réseau de microtubules est dépolymérisé.

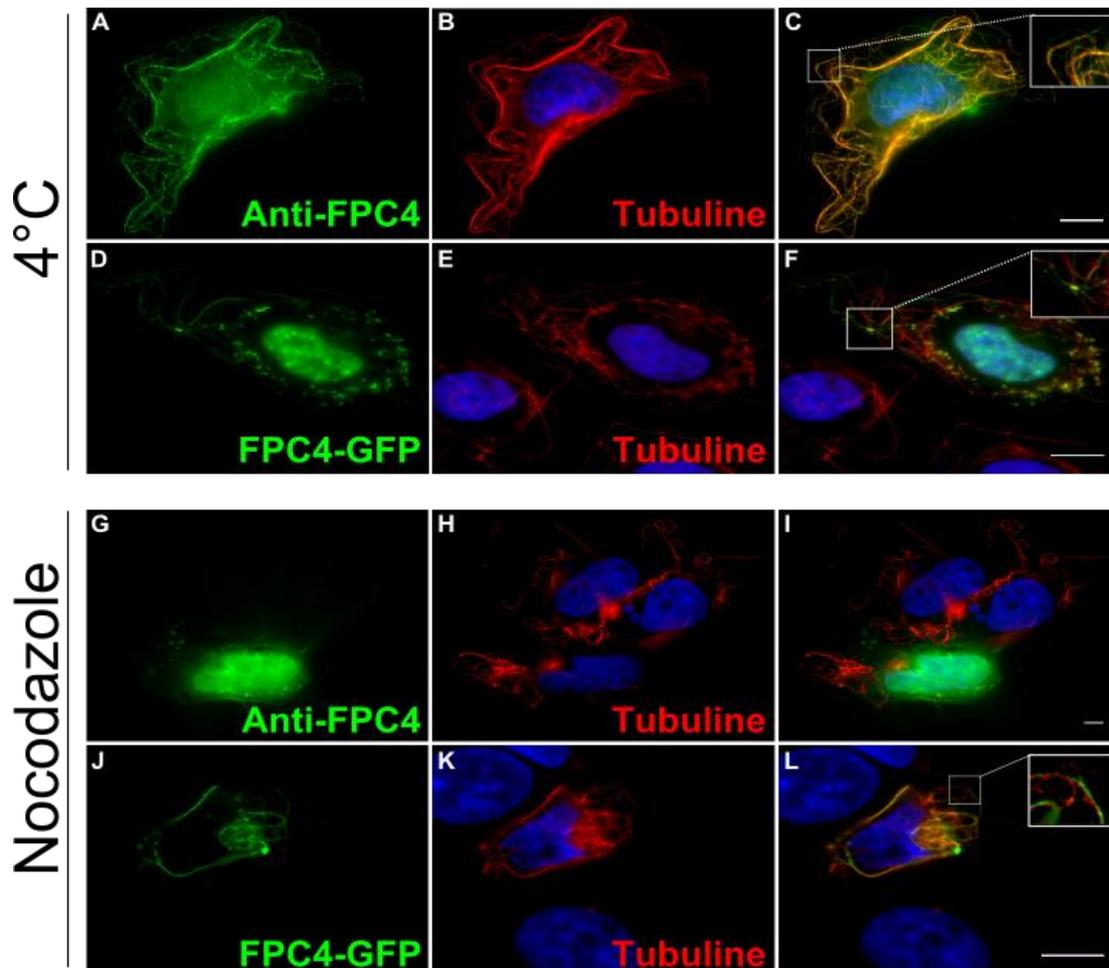
Toutefois, on observe que sans la GFP, le traitement au nocodazole entraîne la dépolymérisation des microtubules, même lorsque les cellules expriment FPC4. Il semble néanmoins que l'expression de cette protéine prévienne la dépolymérisation des microtubules à 4°C.

FPC4-GFP exprimée chez les cellules U-2 OS aurait un rôle similaire à celui de protéines stabilisatrices interagissant avec les MTs, appelées protéines STOP (Stable Tubule Only Polypeptide) ou MAP6 (Microtubule-Associated Protein 6) [227, 228]. Ces protéines sont impliquées dans la stabilisation des MTs au froid et au nocodazole, *via* des domaines répétés qui sont capables de se lier aux MTs. Un homologue MAP6 (*TbSAXO*) a récemment été identifié chez *T. brucei* [90], néanmoins aucune homologie de séquence n'a été identifiée entre cette protéine et FPC4. FPC4 ne comporte pas de domaine répétée ou de domaines similaires à ceux impliqués dans la stabilisation des MTs par les protéines MAP6.

Le froid et le nocodazole n'altérant pas l'organisation des filaments de FPC4-GFP, s'il existe une forte interaction entre la protéine et les MTs il est possible que cela garantisse la stabilité du réseau de MTs.



**Figure 74 :** Co-marquage de FPC4 (A-C) et FPC4-GFP (D-F) avec la tubuline acétylée, réalisé sur des cellules U-2 OS extraites ayant exprimées les protéines FPC4 pendant 24 heures. (A) L'anticorps polyclonal de rat anti-FPC4 marque la protéine FPC4 non-étiquetée (vert) ; (D) FPC4-GFP est visible en vert. La tubuline acétylée est marquée par un anticorps anti-Tubuline acétylée. Barre d'échelle=5µm.



**Figure 75 :** Immunofluorescence réalisée sur des cellules U-2 OS extraites, ayant exprimées FPC4 (A-C et G-I) ou FPC4-GFP (D-F et J-L) pendant 24 heures. Avant l'immuno-marquage, les cellules ont été soumises à des traitements dépolymérisant les microtubules (l'exposition au froid - 4°C ou au Nocodazole 20µM pendant 45 minutes). La protéine de fusion FPC4-GFP interagit avec les microtubules et empêche leur dépolymérisation au froid et au nocodazole ((D-F et J-L). Lorsque la protéine FPC4 est exprimée sans étiquette, elle permet de stabiliser les microtubules au froid (A-C), mais elle n'empêche pas leur dépolymérisation après traitement au nocodazole (G-I). Barre d'échelle=10µm.

## IV. Discussion

FPC4 est une nouvelle protéine identifiée au niveau du collier de la poche flagellaire chez *T. brucei*. Elle interagit avec le domaine N-terminal de BILBO1 *via* son domaine C-terminal. L'analyse de ce domaine ne révèle pas de région particulière. De plus, l'analyse de la séquence des différents homologues révèle un faible taux de conservation des acides aminés. Il serait donc intéressant de générer des mutants de ce domaine afin de mettre en évidence les acides aminés ou la région impliquée dans cette interaction.

Un autre rôle de FPC4 a été mis en lumière lors de ces travaux, notamment sur son interaction commune avec BILBO1 et *TbMORN1* (Figure 61). FPC4 pourrait être un composant du lien entre les protéines du FPC et celles du bilobe, bien que les résultats de l'ARNi<sup>FPC4</sup> ne suggèrent pas d'altération dans le positionnement ou la formation de la structure où se localise *TbMORN1*. En effet, la diminution de FPC4 n'entraîne pas d'altération lors de la duplication, ségrégation et localisation de *TbMORN1* ou BILBO1.

Afin d'identifier d'autres protéines en lien avec le FPC et le bilobe, il serait également intéressant de rechercher les partenaires de FPC4 chez *T. brucei*. Un crible double-hybride comparable à celui effectué pour BILBO1 pourrait être envisagé. Toutefois les résultats obtenus pourraient se révéler non concluant compte-tenu du fait que FPC4 utilisé en appât, soit lié au domaine BD de GAL4, interagit avec la majorité des protéines ayant été testées par double-hybride chez la levure. Un crible utilisant cette protéine en appât pourrait donc révéler de nombreux faux-positifs. Le caractère insoluble de cette protéine rend difficile l'utilisation de méthodes *in vitro* de recherche de partenaires, telle que la co-immunoprécipitation<sup>[229]</sup>. Une méthode comparable à celle utilisée par l'équipe de D. Smith pour rechercher chez *T. brucei* des partenaires de *TbDIP13* (protéine du cytosquelette)<sup>[230]</sup> pourrait être toutefois envisagée. En effet, l'utilisation d'une méthode d'analyse comparative de type iTRAQ pourrait permettre d'identifier des partenaires directs ou indirects de FPC4 et/ou d nouvelles protéines constituant le FPC. L'iTRAQ<sup>[231, 232]</sup> (isobaric tags for relative and absolute quantification) est une technique d'analyse permettant de comparer de façon relative les taux de protéines présentes dans deux échantillons. L'application de cette technique pourrait permettre de comparer la représentation des protéines exprimées chez les cellules sur-exprimant GFP-FPC4 par rapport aux cellules issues de la souche parentale. La surexpression de GFP-FPC4 entraînant une modification de la structure du FPC et du bilobe, il est possible qu'elle s'accompagne également d'une modification du taux des protéines constituant ces structures.

Selon le même schéma, il serait intéressant de comparer également la souche surexprimant la protéine non-étiquetée / souche parentale ou la souche surexprimant GFP-FPC4 / souche surexprimant FPC4 non-étiquetée. Ces différentes analyses permettraient de mettre en lumière les protéines dont l'expression est modulée suite à la surexpression de FPC4. Ces protéines pourraient constituer des partenaires potentiels de FPC4 ou être des constituants du FPC ou structures associées.

Les résultats obtenus en système mammifère montrent une possible interaction de FPC4 avec les microtubules. Cependant, chez *T. brucei*, même après surexpression de FPC4 ou GFP-FPC4, on n'a pas observé de colocalisation entre les MTs et la protéine. Dans les conditions wild-type, la protéine FPC4 est physiquement proche du quartet de microtubules, lorsque celui-ci contourne le FPC, mais elle est également localisée non loin du réseau sous-pelliculaire de MTs <sup>[105, 233]</sup>. Il est donc possible que la protéine soit capable d'interférer avec l'un ou l'autre de ces réseaux, toutefois aucune preuve chez le parasite n'étaye cette hypothèse.

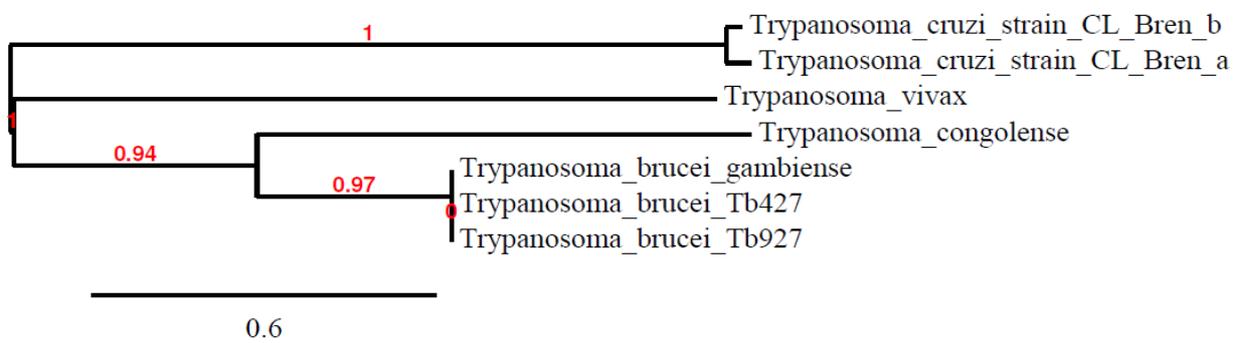


Figure 76 : Arbre phylogénétique des homologues de FPC6 présents chez les différentes espèces du genre *Trypanosoma*, obtenu via le logiciel Phylogeny.fr.

# FPC6 : partenaire de BILBO1

---

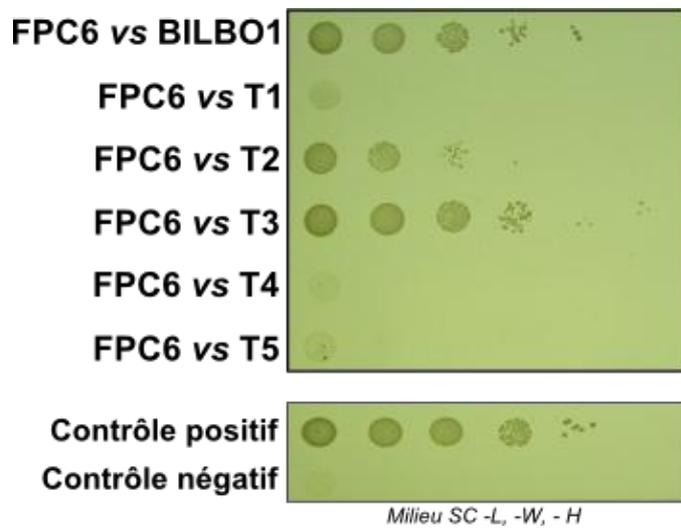
L'un des deux cribles double-hybride réalisés précédemment (par Hybrigenics) a permis de mettre en lumière en plus de FPC4, une nouvelle protéine que nous avons nommé FPC6. Cette protéine, comme la précédente (FPC4) n'avait pas été étudiée ou caractérisée. Au cours de ma thèse, j'ai réalisé les analyses préliminaires permettant de caractériser cette protéine, notamment déterminer sa localisation chez *T. brucei* et étudier sa fonction au sein de la cellule.

## I. Analyse *in-silico*

FPC6 est une protéine d'environ 100 kDa (933 acides aminés) dont les homologues sont uniquement retrouvés chez certains *Kinetoplastidae* (% d'identité avec *T. brucei* spp. ~100%, *T. congolense* 30%, *T. vivax* 12%, *T. cruzi* 15%) parmi les espèces pour lesquelles les génomes sont entièrement séquencés (Figure 76). On ne retrouve pas d'homologues de cette protéine chez les espèces de Leishmanies séquencées, ni chez *C. fasciculata* ou *Endotrypanum*. FPC6 semble être spécifique du genre *Trypanosoma*. Chez les homologues recensés, peu de régions sont conservées entre les différentes espèces, on observe de grandes divergences de séquence. L'environnement génétique dans lequel est retrouvé le gène codant pour FPC6 est conservé entre les espèces. Comme précédemment, la synténie de ce gène est conservée.

Les différents protéomes réalisés chez *T. brucei*, ne révèle pas la présence de FPC6 au sein du flagellome (contrairement à BILBO1)<sup>[86, 143]</sup>. Toutefois, le phosphoprotéome réalisé par Nett *et al.*, révèle 3 sites de phosphorylation au sein de la protéine<sup>[234]</sup>, dont deux semblent conservés entre les différentes espèces. Néanmoins, le phospho-protéome de *T. cruzi*<sup>[173]</sup> n'identifie pas de phosphorylation sur l'homologue de FPC6. Les travaux de transcriptomique effectués chez *T. brucei*<sup>[189, 183]</sup>, montrent que le taux d'ARNm de *FPC6* est plus élevé chez les formes sanguines et que lors du cycle de division il augmente légèrement en fin de phase G1.

La protéine FPC6 est classée comme « hypothétique », aucun domaine fonctionnel n'a été identifié chez cette protéine ou chez ses homologues *in silico*. Phyre2 ne permet pas de prédire la conformation tridimensionnelle de FPC6. De plus, il n'existe aucune homologie entre FPC6 et BILBO1, FPC4 ou une autre protéine de *T. brucei*.



**Figure 77 : Test d'interaction de FPC6 avec BILBO1, en double hybride chez la levure.** FPC6 interagit avec BILBO1. Les différents domaines de BILBO1 ont également été testés. Seuls les domaines T2 (N-terminal/EF-Hand) et T3 (EF-Hand/coiled-coil) de BILBO1 interagissent avec FPC6 sur milieu sélectif d'interaction SC -L, -W, -H. Le contrôle positif représente l'interaction entre la protéine p53 et l'antigène-T. Le contrôle négatif teste l'interaction entre la lamine et l'antigène-T.

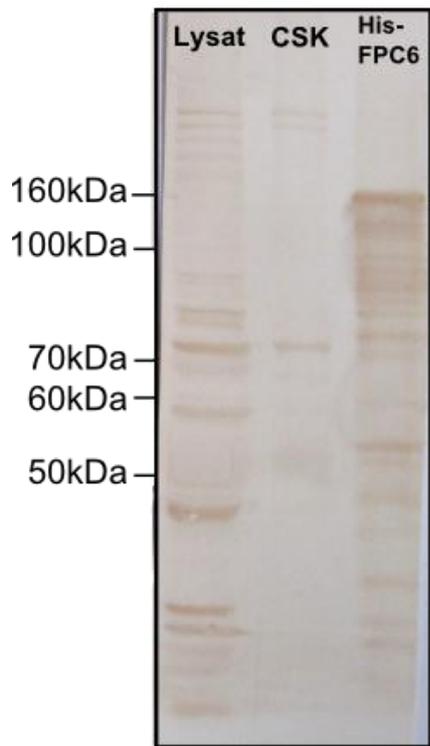
## II. Interactome

L'interaction entre FPC6 et BILBO1, observée à la suite du crible, a été confirmée par un nouveau test d'interaction en double-hybride chez la levure utilisant les formes entières des deux protéines précitées (Figure 77). L'interaction positive entre ces deux protéines a été observée sur tous les milieux d'interaction testés, du plus sensible (SC -Leu, -Tryp, -His) au plus stringent (SC -Leu, -Tryp, -His, -Ade, +AurA, +X  $\alpha$ Gal). Cette interaction est observée dans les deux cas de figure testés, c'est-à-dire que FPC6 soit fusionnée au domaine AD ou au domaine BD.

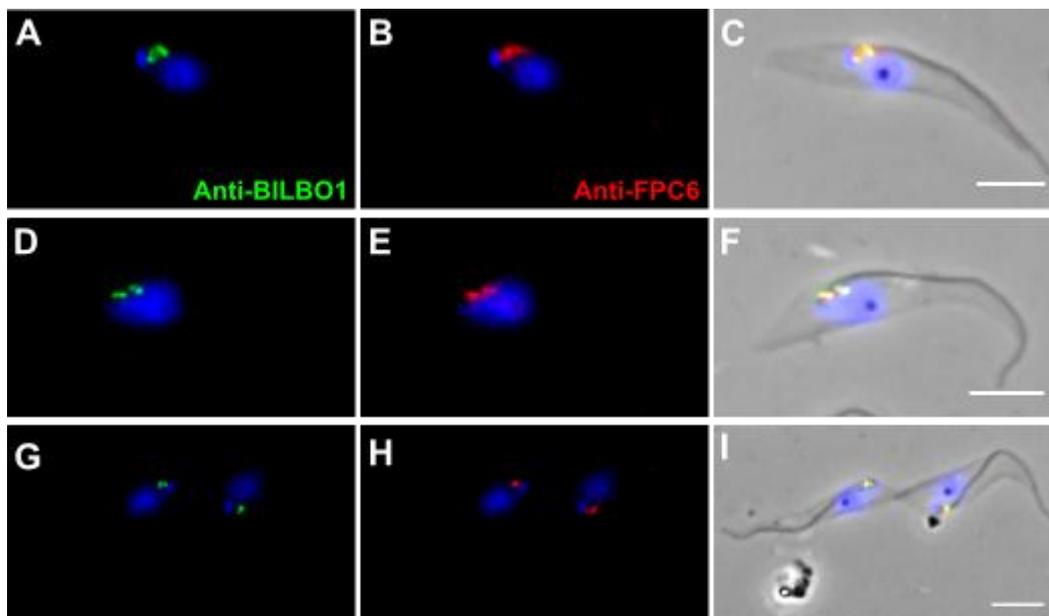
Le crible en double-hybride utilisant BILBO1 comme appât a permis d'identifier une séquence d'interaction avec BILBO1 se situant dans la partie C-terminale de la protéine FPC6 (aa. 660-780). Et comme précédemment, nous avons cherché à déterminer le domaine de BILBO1 qui interagit avec FPC6 en utilisant 5 fragments de BILBO1, notés T1 à T5 (cf chapitre BILBO1). Cette analyse a permis d'identifier deux fragments de BILBO1, notés T2 et T3, interagissant avec FPC6 lorsque cette protéine est présentée comme appât ou proie, sur certains des milieux d'interaction testés (Figure 77). De façon intéressante, on peut noter que ces deux fragments comportent les domaines EF-Hand de la protéine BILBO1. Ce résultat suggère l'implication de ces motifs dans l'interaction possible entre FPC6 et BILBO1. Afin de confirmer ou d'infirmer cet hypothèse, d'autres fragments de BILBO1 devraient être testés, notamment des fragments faisant intervenir des mutations au niveau des motifs EF-Hand, des formes tronquées de BILBO1 excluant ces motifs ou au contraire un fragment ne comportant que les domaines EF-Hand. Cette analyse permettrait de mieux définir l'interaction entre FPC6 et BILBO1.

L'interaction possible entre FPC6 et elle-même a également été testée, néanmoins aucune interaction positive n'a pu être observée dans ce système (Figure 77).

Ces résultats, identifiant FPC6 comme partenaire de BILBO1 suggèrent une localisation de FPC6 au niveau du FPC chez *T. brucei*.



**Figure 78 :** Western-blot réalisé avec l'anticorps polyclonal de poulet anti-FPC6. Trois profils de protéines ont été testés : le lysat de cellules ( $3 \cdot 10^6$  cellules) ; préparation de cytosquelettes issue de  $3 \cdot 10^6$  cellules ; 50 ng de la protéine His-FPC6 purifiée. L'astérisque désigne la protéine étiquetée purifiée. La protéine purifiée migre à un poids moléculaire plus élevé que celui attendu de 110 kDa.



**Figure 79 :** Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *T. brucei*, marqués par les anticorps anti-BILBO1 (monoclonal de souris) et anti-FPC6 (polyclonal de poulet). (A-C) représente une cellule de type 1K1N ; (D-F) représente une cellule de type 2K1N ; (G-I) représente des cellules en division après cytokinèse. Barre d'échelle :  $5 \mu\text{m}$ .

### III. Analyse fonctionnelle

#### A. FPC6 : protéine du FPC chez *T. brucei*

##### 1. Production d'un polyclonal anti-FPC6

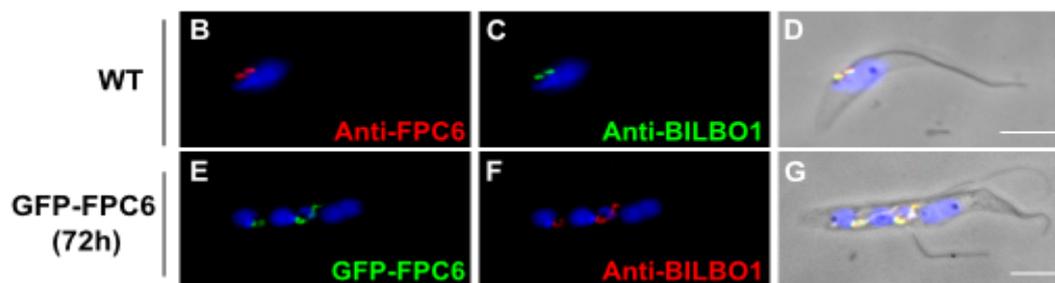
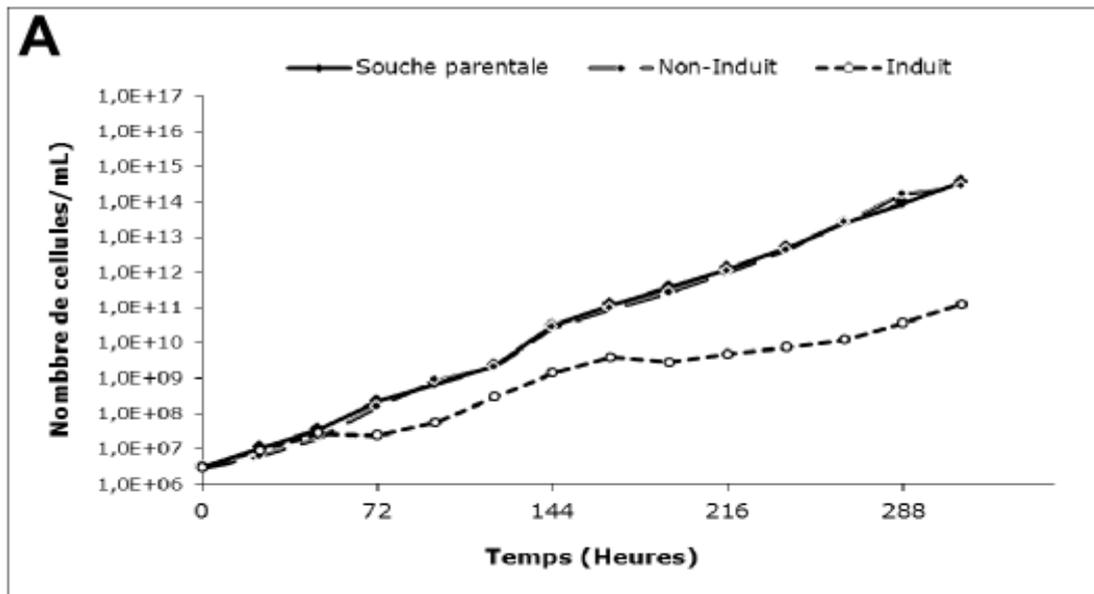
Selon le même protocole que pour FPC4, FPC6 a été exprimé chez la bactérie *E. coli*, fusionnée à une étiquette histidine (6 résidues His) placée en N-terminal de la protéine. La protéine a été purifiée par affinité sur colonne de nickel et reprise dans un tampon dénaturant. En effet chez la bactérie, la protéine est insoluble et retrouvée dans les corps d'inclusions, elle est ensuite solubilisée en présence de 8M Urée. La protéine purifiée a été utilisée pour immuniser des poulets et produire des anticorps polyclonaux anti-FPC6.

Cet anticorps, testé en Western-blot reconnaît la protéine purifiée, néanmoins dans un lysat cellulaire de *T. brucei*, un grand nombre de protéines est reconnu (Figure 78). Il est difficile de déterminer si FPC6 est une des protéines reconnues par l'anticorps. Une mise au point de cette expérience, par la variation des différents tampons de blocages et de lavages utilisés, pourrait permettre d'améliorer la spécificité du résultat observé.

La protéine His-FPC6 purifiée migre à une masse moléculaire plus élevée que celle prédite. En effet, la protéine migre à environ 160 kDa or elle était attendue à 110 kDa. On observe également une dégradation importante de la protéine dans cette préparation. Dans les préparations de cytosquelette de *T. brucei*, on distingue 3 bandes fortement marquées : deux d'entre-elles ont migré à une position équivalente à une masse moléculaire supérieure à 200 kDa et la troisième bande est présente à 70 kDa (Figure 78). En conséquence, la reconnaissance par Western-blot de FPC6 au niveau du cytosquelette du parasite n'a donc pas encore pu être confirmée. Il est possible que la protéine migre à une position inférieure ou supérieure à celle attendue. De plus, le phosphoprotéome réalisé sur les formes sanguines du parasite <sup>[234]</sup> laisse apparaître plusieurs possibilités de phosphorylation chez cette protéine, ce qui pourrait impliquer qu'au final, la masse moléculaire de la protéine observée soit supérieure celle prédite.

##### 2. Localisation de FPC6 chez *T. brucei*

L'anticorps polyclonal de poulet anti-FPC6 permet le marquage de FPC6 en immunofluorescence sur des cytosquelettes de *T. brucei*. Ce marquage permet d'établir la localisation de la protéine au collier de la poche flagellaire (FPC) où elle colocalise partiellement avec BILBO1 tout au long du cycle de division cellulaire du parasite sous forme procyclique (Figure 79).



**Figure 80 :** (A) Courbe de croissance de cellules induites pour la surexpression de la protéine de fusion GFP-FPC6 chez *T. brucei*. Après 72 heures d'induction, il y a une inhibition de la croissance cellulaire qui se traduit par l'apparition de cellules multinucléées (E-G). (B-G) Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *T. brucei* marquées avec les anticorps anti-FPC6 (anticorps polyclonal de poulet) et anti-BILBO1 (monoclonal de souris). (B-D) représente une cellule parentale ; (E-G) représente une cellule surexprimant depuis 72 heures la protéine de fusion GFP-FPC6. Barre d'échelle : 5µm.

La présence et la localisation de cette protéine n'a pas encore été confirmée par immunofluorescence chez les formes sanguines. Néanmoins, les travaux transcriptomique <sup>[189]</sup> et protéomique <sup>[234]</sup> réalisés chez les formes sanguines du parasite attestent de la présence de FPC6.

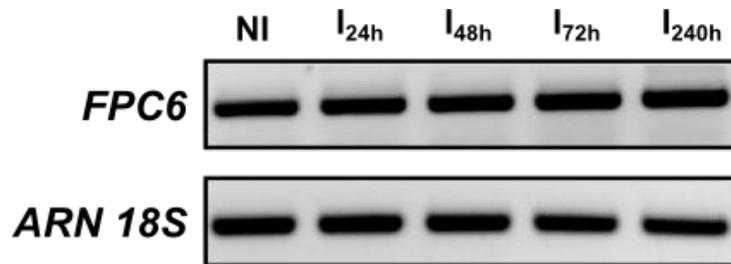
Suivant l'orientation de la cellule observée, FPC6 se retrouve localisée dans une structure en anneau ou dans deux points situés proche de la base du flagelle et de part et d'autre de celui-ci. Ces structures sont semblables à celles observées par immunofluorescence de BILBO1 (Figure 79D-F). FPC6 est donc localisée comme BILBO1 au sein du FPC chez *T. brucei*. Ce résultat, ajouté à celui montrant l'interaction entre FPC6 et BILBO1 permet d'avancer l'hypothèse selon laquelle FPC6 serait une protéine du FPC.

## **B. Surexpression de GFP-FPC6**

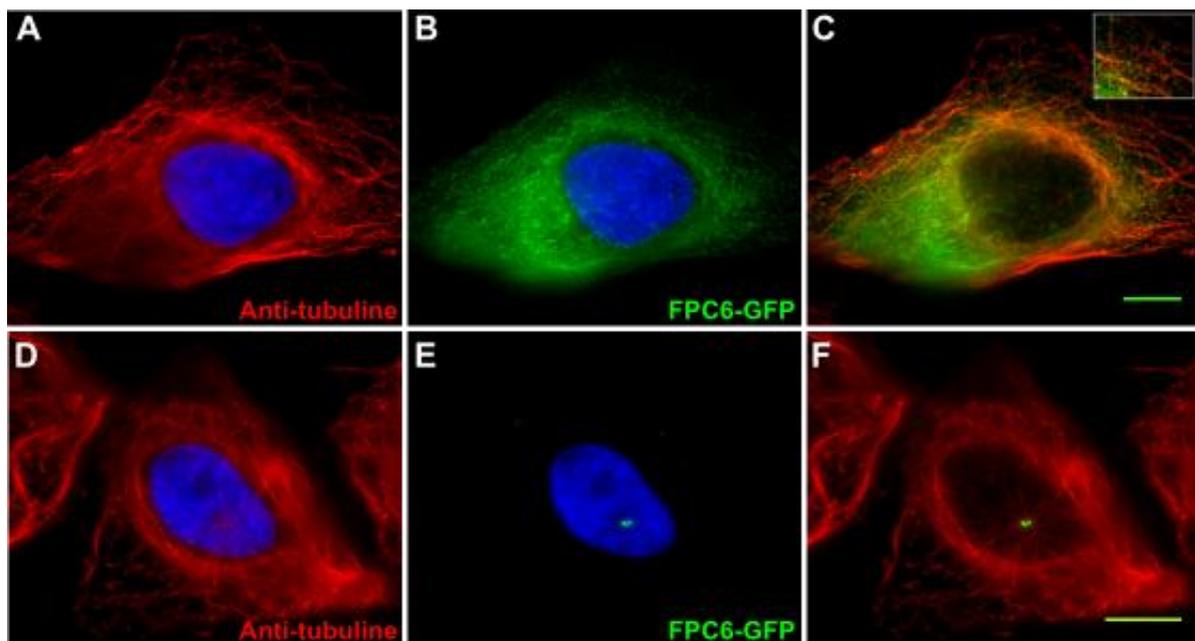
La protéine de fusion GFP-FPC6 a été surexprimée de façon inductible chez la forme procyclique de *T. brucei*. Lorsqu'elle est surexprimée pendant une courte période (jusqu'à 24 heures d'induction), GFP-FPC6 se retrouve localisée et exprimée dans une structure similaire à celle observée après immuno-marquage de FPC6 avec l'anticorps anti-FPC6.

Les travaux préliminaires effectués après une plus longue surexpression de GFP-FPC6, permettent d'observer un effet toxique sur la croissance cellulaire (Figure 80A). Dès 48 heures de surexpression, on observe l'apparition de phénotypes cellulaires aberrants, notamment la présence de cellules présentant des défauts de ségrégation des kinétoplastes, ainsi que la présence de cellules multinucléées (Figure 80E-G). Ce résultat traduit un défaut de cytokinèse probablement dû à une altération de la division des FPC et FP.

En effet, on observe après une longue surexpression la formation de structures linéaires (mais de taille beaucoup plus réduite que celle observée après surexpression de GFP-FPC4) proche de la base proximale du flagelle (Figure 80E). Ceci représenterait, comme dans le cas de la surexpression de GFP-FPC4, une déformation du FPC. En effet, la surexpression de GFP-FPC6 entraîne également la déformation de la structure où se localise BILBO1 (Figure 80E-G). Il semble donc que la surexpression de ces deux protéines (FPC4, FPC6) interagissant directement avec BILBO1 contrairement à FPC2, puisse induire une altération dans la formation du FPC entraînant ainsi une inhibition du cycle de division du parasite. En effet, comme GFP-FPC4, la surexpression de GFP-FPC6 est toxique pour le parasite.



**Figure 81 :** RT-PCR semi-quantitative des souches de *T. brucei* induite pour l'ARNi de FPC6. Après 10 jours d'induction (240 heures), il n'y a pas de diminution du taux d'ARNm de FPC6.



**Figure 82 :** Immunofluorescence réalisée sur des cellules U-2 OS dont les membranes ont été extraites par un détergent. FPC6-GFP a été exprimé pendant 24 heures et les cellules ont été marquées par l'anticorps de souris anti-tubuline  $\alpha$  (rouge) et FPC6-GFP (vert). Barre d'échelle : 5 $\mu$ m.

Toutefois, on observe après 96 heures de surexpression une reprise de la croissance cellulaire traduisant une réversion ou une adaptation de la cellule en réduisant le taux de protéine exprimée. Les effets de cette surexpression sur la structure des protéines du bilobe *TbMORN1* et *TbLRRP1* n'ont pas encore été déterminés.

### **C. ARNi de *FPC6***

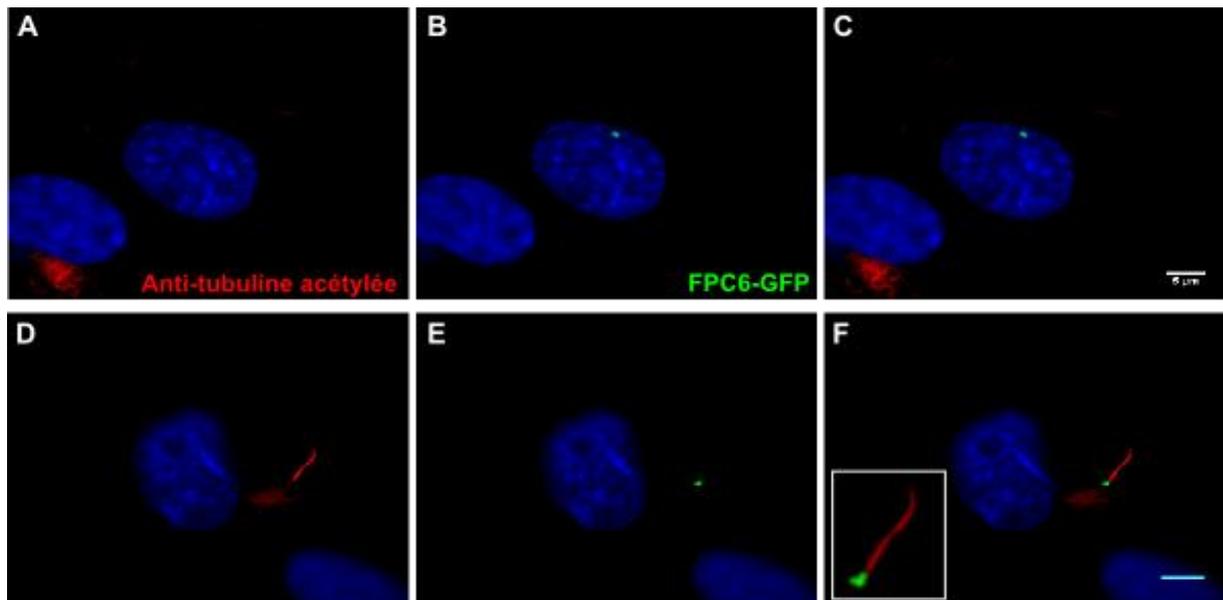
L'ARNi de *FPC6* est induit par la formation d'un ARN double brin portant une séquence de *FPC6*. Deux transfections ont été réalisées sur des formes procycliques de *T. brucei*. L'efficacité de l'ARNi a ensuite été contrôlée par immunofluorescence et RT-PCR. Chez les clones testés après la première transfection, on n'observe pas de diminution du taux d'ARNm de *FPC6*, et ce même après 240 heures d'induction (Figure 81). Ce résultat est en accord avec celui observé lors de l'immunofluorescence, où la présence de *FPC6* est toujours détectée après plus de 240 heures d'induction.

Il semble que chez les transfectants sélectionnés, on ne puisse pas induire de diminution de *FPC6*. Ceci pourrait suggérer un caractère essentiel de la protéine entraînant une adaptation du parasite pour contourner le système transfecté. Néanmoins, les récents travaux de génomique fonctionnelle de D. Horn <sup>[48]</sup> ont permis de générer des cellules viables où l'ARNi de *FPC6* a pu être induit. Chez cette lignée, un effet négatif a été observé sur la croissance du parasite. Toutefois, ces travaux ne permettent pas de déterminer la fonction de *FPC6* chez *T. brucei*.

### **D. Expression de *FPC6* dans un système hétérologue**

#### **1. Cellules U-2 OS**

La protéine de fusion *FPC6*-GFP (étiquette GFP en C-terminal de la protéine) a été exprimée dans une culture de cellules U-2 OS. Des phénotypes observés 6 heures ou 24 heures après transfection sont similaires. *FPC6*-GFP est localisée de façon hétérogène au niveau d'un réseau du cytosquelette des U-2 OS, ainsi qu'au niveau d'un point proche du noyau dans la cellule (Figure 82). Des immuno-marquages réalisés avec des anticorps anti-tubuline- $\alpha$  <sup>[235]</sup> et des anticorps anti-péricentrine <sup>[219]</sup> ont permis d'observer une colocalisation partielle entre le réseau de microtubules (Figure 82A-C) et le réseau dans lequel se localise *FPC6*-GFP, ainsi qu'une co-localisation avec le centrosome (Figure 81A-F). *FPC6* ne comporte aucune homologie avec une autre protéine identifiée au niveau du centrosome.



**Figure 83** : Immunofluorescence réalisée sur des cellules RPE-1 exprimant FPC6-GFP depuis 24 heures. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps anti-tubuline acétylée (rouge) et FPC6-GFP est visible en vert. La ciliogenèse a été induite par une mise en culture pendant 24 heures des cellules dans un milieu avec 0.5% de SVF. Chez une cellule sans cil, FPC6-GFP est localisée au centrosome (A-C). Chez une cellule ayant produit un cil (dont l'axonème est marqué avec l'anticorps anti-tubuline acétylée), FPC6-GFP est localisée au niveau des corps basaux et de la zone de transition (D-F). Barre d'échelle= 5  $\mu$ m.

GFP-FPC6 est parfois observée uniquement au centrosome, suggérant que cette protéine est capable dans ce système, de s'associer avec une ou plusieurs protéines du centrosome ainsi qu'avec des protéines du cytosquelette de la cellule.

Les deux types de localisations observées pour FPC6-GFP pourraient dépendre de la quantité de protéine produite dans la cellule. La production d'une lignée stable exprimant la protéine permettrait de conclure sur la localisation de FPC6 chez les U-2 OS.

## 2. Cellules RPE-1

FPC6-GFP a été exprimée chez des cellules RPE-1 (cellules épithéliales de la rétine humaine) pour lesquelles la ciliogenèse a été induite en présence de 0.5% de SVF pendant 24 heures.

Les résultats préliminaires obtenus montrent que chez les cellules RPE-1 sans cil primaire, FPC6-GFP se trouve localisée au centrosome (Figure 83A-C). Soit le même phénotype observé chez les U-2 OS (Figure 82D-F). Au contraire, chez les cellules ayant produit un cil primaire (l'axonème du cil est marqué par l'anticorps anti-tubuline acétylée), FPC6-GFP est localisée au niveau des corps basaux et de la zone de transition. Toutefois, ces résultats sont préliminaires et la localisation précise de la protéine, notamment au niveau de la zone de transition devra être confirmée par un co-marquage de cette structure.

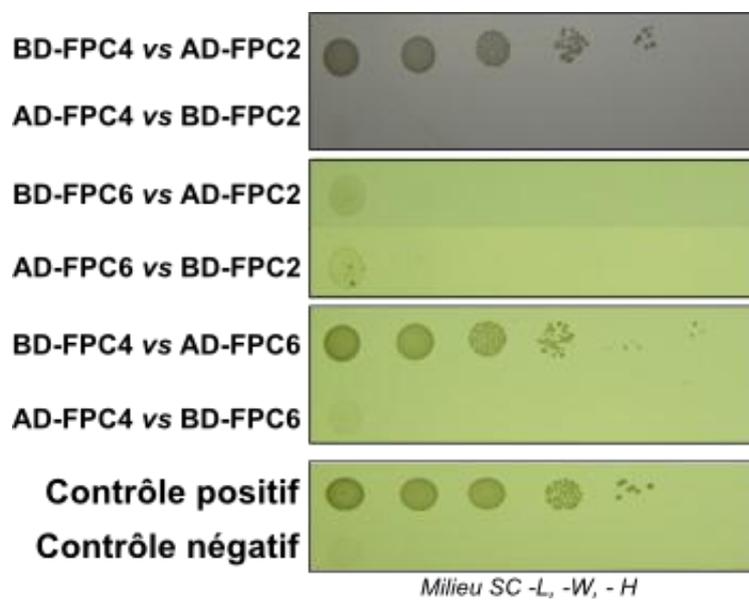
## IV. Discussion - Perspectives

Les données concernant FPC6 sont préliminaires et des analyses complémentaires permettant de définir les domaines d'interaction entre FPC6 et BILBO1 devront être réalisés. Jusqu'à aujourd'hui, nous n'avons pas pu obtenir de lignées où l'induction de l'ARNi de *FPC6* a entraîné une diminution du taux de FPC6.

Néanmoins, les travaux réalisés par l'équipe du Dr D. Horn <sup>[48]</sup> ont montré une différence de croissance entre les souches dites « wild-type » et celle induite pour l'ARNi de *FPC6*. Aussi, afin de mettre en lumière la fonction de la protéine, on pourrait générer une construction induisant l'ARNi de *FPC6* en ciblant une nouvelle région du gène. On pourrait également envisager de réaliser un KO du gène *FPC6*.

Les résultats obtenus en système hétérologue sont à compléter avec ceux qu'on obtiendrait après l'expression de FPC6 non-étiquetée. Toutefois, les premiers résultats laissent envisager une interaction potentielle de FPC6 avec des protéines du centrosome des cellules mammifères. L'expression de cette protéine chez des cellules émettant des cils primaires a montré que FPC6-GFP se localise au niveau des corps basaux, ainsi semble-t-il, qu'au niveau de la zone de transition. Des études complémentaires (co-marquages avec des marqueurs de la zone de transition en cellules mammifères) devront être menées afin de déterminer si FPC6-GFP est localisée au niveau du collier ciliaire <sup>[236]</sup> des cellules mammifères.

Les travaux de surexpression de GFP-FPC6 chez *T. brucei*, montrent une altération du FPC, suggérant un rôle de FPC6 dans la formation ou la stabilité de la structure du FPC.



**Figure 84 :** Test d'interaction en double-hybride chez la levure réalisé sur le milieu de sélection SC -L, -W, -H. FPC4 interagit avec FPC2 que dans le sens BD-FPC4 vs AD-FPC2. FPC6 n'interagit pas avec FPC2, mais interagit avec FPC4 dans le sens (BD-FPC4 vs AD-FPC6). Le contrôle positif représente l'interaction entre la protéine p53 et l'antigène-T. Le contrôle négatif teste l'interaction entre la lamine et l'antigène-T.

# Protéines du FPC : interactions

---

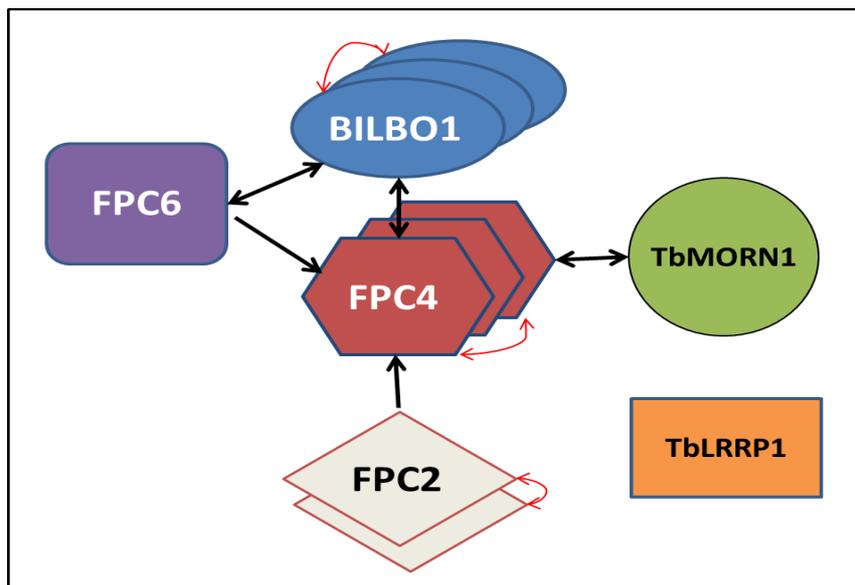
Au terme de ma thèse, on distingue 4 protéines identifiées au niveau du FPC, dont 3 nouvellement caractérisées : soit BILBO1 <sup>[130]</sup>, FPC2, FPC4 et FPC6. Nous avons voulu établir les différentes relations existantes entre ces protéines du FPC.

Dans le but d'identifier un motif d'adressage au FPC potentiellement présent chez toutes ces protéines, une analyse *in silico* des séquences des protéines identifiées au niveau du FPC a été réalisée. Cette analyse effectuée *via* le logiciel de recherche de motifs « MEME » <sup>[237]</sup>, ne permet pas d'identifier de motif commun entre les protéines, pouvant suggérer l'existence d'une séquence d'adressage commune. Toutefois, les études fonctionnelles réalisées chez le trypanosome ont permis de révéler l'implication des domaines EF Hand/coiled-coil de BILBO1 (Figure 34 p.111) ainsi qu'un large domaine N-terminal de BILBO2 (Figure 52 p.141) dans l'adressage et la localisation de ces deux protéines au niveau du FPC. De façon similaire, ce type d'analyse de localisation de formes tronquées de la protéine étudiée devra être réalisé pour FPC4 et FPC6, afin d'identifier les domaines responsables de leur adressage et localisation au niveau du FPC.

## I. Interactome au sein du FPC

Les interactions entre les différentes protéines de FPC ont également été testées par la méthode du double-hybride chez la levure. Selon cette méthode deux types d'interactions sont testés, en effet les protéines d'intérêts sont fusionnées soit au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4 (noté AD), soit au domaine de fixation à l'ADN de ce même facteur (noté BD).

- Dans ce système BILBO1 interagit uniquement avec elle-même, FPC4 et FPC6, cela dans les deux sens d'interaction testés (Figures 35 p.113, 50 p.139, 56 et 57 p.151 et 77 p.175).
- FPC2 interagit avec elle-même ainsi qu'avec FPC4, lorsque FPC4 est fusionnée au domaine BD et FPC2 est fusionnée au domaine AD (Figures 50 p. 139 et 84).
- FPC4 peut interagir avec elle-même (Figure 56 p.151).



**Figure 85 :** Interactome entre les différentes protéines identifiées au FPC ainsi que deux protéines du bilobe (*TbMORN1* et *TbLRRP1*). BILBO1 interagit dans les deux sens (en tant que proie ou appât) avec FPC4 et FPC6. FPC4 interagit dans les deux sens avec *TbMORN1* et dans un seul sens (BD-FPC4 vs AD-FPCn) avec FPC2 et FPC6. FPC2, FPC4 et BILBO1 sont capables d'interagir avec elles-mêmes. *TbLRRP1* n'interagit avec aucune des protéines identifiées au FPC.

- Enfin, FPC6 n'interagit pas avec elle-même, mais interagit avec BILBO1 (dans les deux sens d'interactions testés) (Figure 77 p.175) et également avec FPC4 dans un seul sens d'interaction (BD-FPC4 vs AD-FPC6) (Figure 84).

Les interactions possibles entre ces protéines et celles identifiées au niveau du bilobe (« structure » du cytosquelette de *T. brucei*, physiquement proche de BILBO1 et du FPC) <sup>[39]</sup> ont également été analysées. Suite à cette analyse, nous n'avons pu observer aucune interaction positive entre *TbLRRP1* <sup>[139]</sup> et elle-même ou avec une autre protéine testée. Des interactions positives ont été observées entre *TbMORN1* <sup>[138]</sup> et elle-même ainsi qu'entre *TbMORN1* et FPC4 (Figure 61 p.155).

A noter qu'aucune interaction positive n'a pu être observée entre *TbLRRP1* et *TbMORN1*, bien que ces protéines appartiennent au bilobe et qu'elles soient localisées dans une même structure en forme de crochet. Néanmoins, il reste possible qu'on ne retrouve aucune interaction positive avec *TbLRRP1* parce qu'elle ne parvient pas au noyau de la levure, site où se met en place l'interaction selon la méthode du double-hybride. En effet, aucune interaction positive n'a été observée entre *TbLRRP1* et les autres protéines étudiées. Bien qu'aucun domaine connu <sup>[160]</sup> favorisant la retenue de *TbLRRP1* dans le cytoplasme ou la membrane de la levure, n'ai été identifié chez cette protéine (domaine transmembranaire, domaine moteur...), la possibilité qu'elle soit retenue à l'extérieur du noyau demeure, ce qui pourrait inhiber la co-localisation des protéines étudiées.

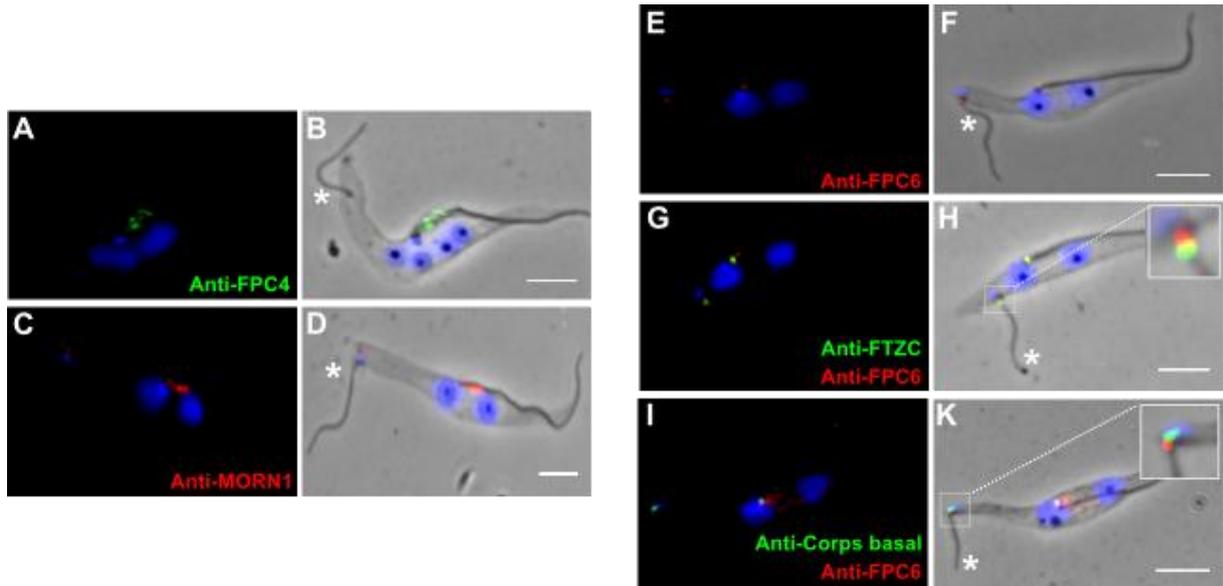
Tous ces résultats nous permettent de suggérer un premier interactome comprenant les protéines du FPC mais également celles du bilobe (Figure 85). Cet interactome met en lumière un lien physique entre les protéines du FPC et celles du bilobe, notamment par l'interaction entre FPC4 et *TbMORN1*.

## II. Analyse fonctionnelle

### A. ARNi des protéines du FPC chez *T. brucei*

#### 1. ARNi de *BILBO1*

Les résultats publiés en 2008, par Bonhivers *et al.* <sup>[130]</sup>, ont mis en évidence le caractère essentiel de *BILBO1* pour la formation du FPC et de la FP chez le parasite.



**Figure 86 :** Immunofluorescence sur des cytosquelettes de cellules induites pour l'ARNi de BILBO1 pendant 36 heures. Après 36 heures d'induction, des cellules présentant des phénotypes de flagelles détachées à leur extrémité postérieure apparaissent (signalés par un astérisque). Les cellules sont marquées par des anticorps anti-FPC4 (polyclonal de rat) (A-B), anti-*Tb*MORN1 (polyclonal de lapin) (C-D), anti-FPC6 (polyclonal de poulet) (E-H), anti-FTZC (monoclonal de lapin) (G-H) et anti-Corps basal (mAb15, produit au laboratoire). Barre d'échelle : 5µm.

La FP étant nécessaire à la survie de *T. brucei*, son absence est létale pour la cellule. Le phénotype létal associé à la diminution de BILBO1 apparaît au bout de 48 heures d'induction de l'ARNi. A des temps d'induction plus courts (36 heures), on observe des cellules présentant des défauts de cytokinèse. Le phénotype majoritaire est la présence de cellules comportant une élongation de l'extrémité postérieure d'où émerge un nouveau flagelle détaché, celui-ci n'est associé à aucune FP ou FPC (Figure 86A-H). Puisque la structure du FPC est affectée chez ces mutants, nous avons cherché à déterminer l'impact de diminution de BILBO1 sur les autres protéines de FPC étudiées.

#### **a) FPC2**

L'immuno-marquage de FPC2 chez *T. brucei*, n'étant pas visible en microscopie à fluorescence *via* les anticorps produits en laboratoire, le taux d'expression de cette protéine a été contrôlé par Western-Blot. Après induction de l'ARNi de BILBO1, on n'observe pas de diminution visible du taux d'expression de FPC2. Toutefois, il serait intéressant de déterminer la localisation de cette protéine lorsque BILBO1 n'est plus présente et qu'il y a une inhibition de la formation d'un nouveau FPC.

#### **b) FPC4**

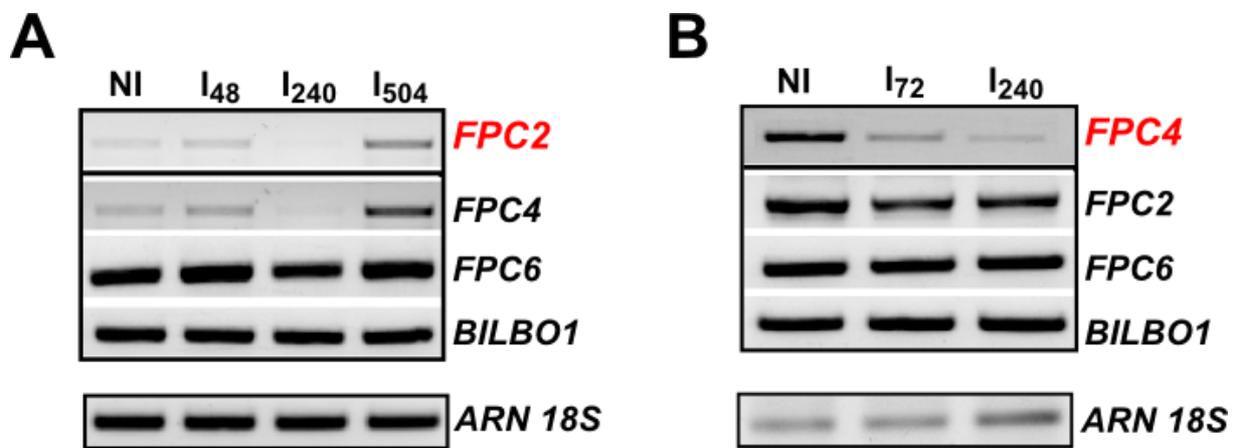
Le marquage de FPC4 (*via* l'anticorps polyclonal anti-FPC4) dans les cellules ARNi<sup>BILBO1</sup>, permet de confirmer la présence de FPC4 au sein des cellules exprimant une faible quantité de BILBO1. Dans une cellule engagée dans la division cellulaire, on observe que FPC4 est uniquement associé à l'ancien flagelle comme cela a été décrit pour BILBO1<sup>[130]</sup> (Figure 86A-B). En effet comme pour BILBO1, il n'y a pas de marquage de FPC4 visible à proximité ou en association avec le nouveau flagelle formé. Pour rappel, ce flagelle est détaché du corps cellulaire et n'est associé à aucune FP ou FPC. De façon intéressante on observe chez ces cellules la présence, bien que faible et non systématique, d'un marquage de *TbMORN1* associé au nouveau flagelle formé (Figure 86C-D). Ce résultat peut être mis en relation avec celui montrant la présence et la localisation aléatoire du Golgi associé au nouveau flagelle, chez les cellules induites pour l'ARNi de BILBO1<sup>[130]</sup>. En effet, il semble que comme le Golgi, *TbMORN1* qui a précédemment été décrit comme régulateur de la duplication et ségrégation du Golgi voit sa structure et sa localisation altérée suite à l'inhibition de la formation de la FP. Ce phénomène pourrait être dû au fait que *TbMORN1* soit capable d'interagir avec le FPC, lors de la division cellulaire, l'absence de celui-ci pourrait altérer le positionnement et la structure de la protéine.

### c) **FPC6**

De façon intéressante, on observe la présence de cette protéine associée à l'ancien et au nouveau flagelle. Ce résultat suggère que même en l'absence de FPC ou de FP, FPC6 reste associé au flagelle néoformé (Figure 86E-K). Cependant, sa localisation ne semble pas identique à celle observée chez les cellules non-induites. En effet, on observe chez les cellules ARNi<sup>BILBO1</sup>, que la localisation de FPC6 associée à la base du nouveau flagelle (Figure 86E-K). Afin de déterminer la localisation précise de la protéine chez ces cellules, un immunomarquage de la zone de transition <sup>[238]</sup> (anti-FTZC Flagellum Transition Zone Component) et des corps basaux (Mab15, anticorps produit au laboratoire marquant un antigène inconnu présent au niveau du corps basal de la cellule) a été réalisé (Figure 86G-K). Cette analyse permet de définir une zone de localisation de FPC6 située entre la zone de transition et les corps basaux, lorsque le flagelle néoformé n'est associé à aucun FPC. En condition normale, FPC6 est localisée au niveau du collier de la poche flagellaire (soit en aval de la zone de transition), toutefois lorsque cette structure n'est pas formée (cas de la souche ARNi<sup>BILBO1</sup>) FPC6 reste associée à la base proximale du flagelle détaché formé (Figure 86E-H). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : la possibilité que la voie d'adressage de cette protéine soit bloquée au niveau de la base du flagelle, l'absence de la FP pouvant inhiber le transport de plusieurs molécules <sup>[130]</sup>. Les coupes de microscopie électronique montrent une accumulation peu dense aux électrons entre le flagelle et le kinétoplaste, il est possible que FPC6 se localise à ce niveau (Figure 23 p.53). Dans cette zone, on peut noter également la présence d'IFTs <sup>[94]</sup> qui pourrait être impliqués dans le transport de molécules telles que FPC6. Une autre hypothèse serait d'envisager que la protéine soit retenue au niveau d'une autre structure située à la base du flagelle appelée « collaquette » <sup>[115]</sup>.

## 2. **ARNi de FPC2**

Par RT-PCR semi-quantitative réalisée sur une souche de trypanosomes induite pour produire l'ARNi de *FPC2*, nous avons quantifié de façon relative les ARNm de *FPC4*, *FPC6* ainsi que *BILBO1*. Cette analyse a permis de contrôler l'effet de la diminution de l'ARNm de *FPC2*, sur le taux d'expression de *FPC4*, *FPC6* et *BILBO1*. Différents temps d'induction ont été testés, soit après 48, 240 et 504 heures. Les résultats précédents, concernant *FPC2* montrent qu'après 48 heures d'induction le taux d'ARNm de *FPC2* ne varie pas, mais qu'après 240 heures d'induction on observe une diminution de près de 70% des messagers de *FPC2* (Figure 53 p.141). Il y a ensuite un retour à la normale du taux d'expression du gène après 504 heures d'induction.



**Figure 87 :** RT-PCR semi-quantitative réalisée sur des souches de cellules induites pour l'ARNi de *FPC2* (A) et pour l'ARNi de *FPC4* (B). Le taux de messagers de l'*ARN 18S* sert de gène de référence.

De façon surprenante, on observe un résultat similaire chez la souche ARNi de *FPC2* concernant le taux d'ARNm de *FPC4* (Figure 87A). En effet après 240 heures d'induction de l'ARNi de *FPC2*, il y a une diminution de plus de la moitié des messagers de *FPC4*. Toutefois, comme pour l'ARNm de *FPC2*, on observe une augmentation des ARNm de *FPC4* après 504 heures d'induction.

Contrairement aux ARNm de *FPC4*, le taux de messagers de *FPC6* et *BILBO1* ne semble pas varier au cours de l'induction de l'ARNi de *FPC2* (Figure 87A).

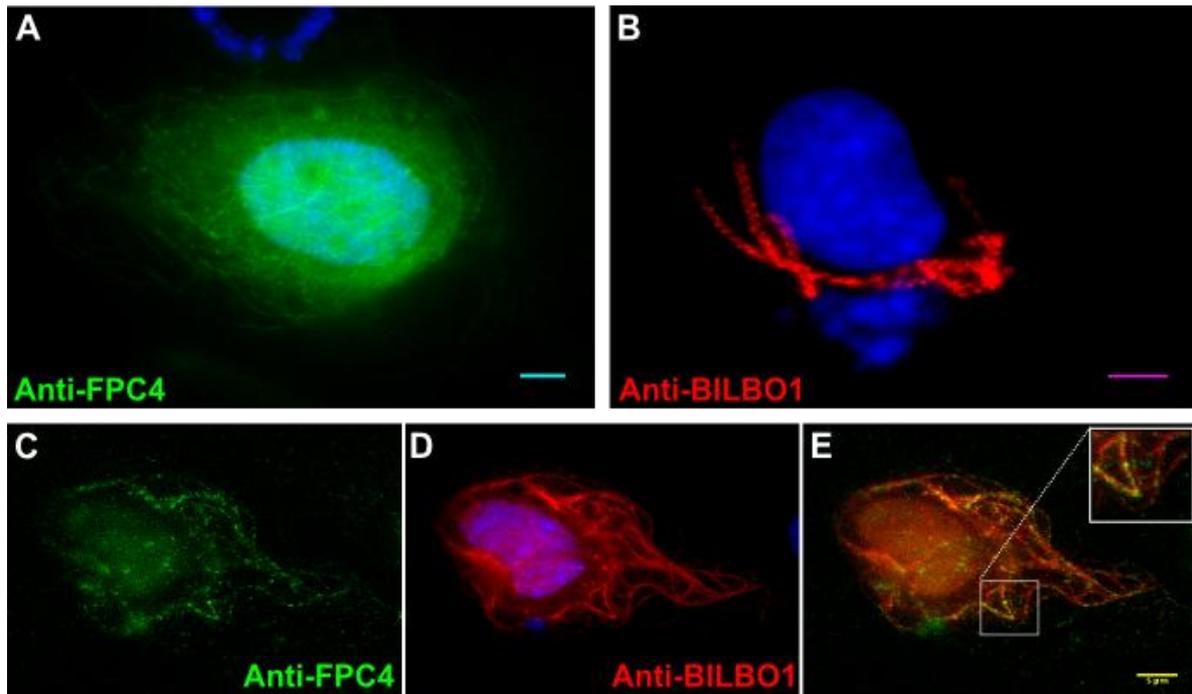
Ces résultats suggèrent un lien entre *FPC2* et *FPC4*, ce qui pourrait remettre en perspective le résultat de double-hybride obtenu entre ces deux protéines. En effet, seul un sens d'interaction (BD-*FPC4* vs AD-*FPC2*) s'était révélé positif (Figure 84), ce qui mettait en doute la possible interaction entre *FPC2* et *FPC4*. Néanmoins, il est possible qu'il existe une co-régulation transcriptionnelle entre *FPC2* et *FPC4*. Toutefois, comme dans le cas de l'ARNi de *FPC4*, la diminution du taux de messagers de *FPC4* n'est pas associée à une inhibition de la croissance cellulaire des cellules induites pour l'ARNi de *FPC2*.

### 3. ARNi de *FPC4*

Nous avons voulu observer la réciprocité du phénomène observé chez *FPC4* suite à l'ARNi de *FPC2*. Aussi, nous avons analysé le taux d'ARNm de *FPC2* chez une lignée de trypanosomes induite pour l'ARNi de *FPC4*. Une RT-PCR semi-quantitative a été réalisée sur cette lignée induite pour produire l'ARNi de *FPC4*.

Les résultats précédents ont montrés que dès 48 heures après induction de l'ARNi de *FPC4*, on observe une diminution du taux de messagers de *FPC4* (Figure 69 p.163), corrélée à une diminution de la protéine visible en immunofluorescence. Cette analyse a été également réalisée sur le taux de messagers de *FPC2* et on observe après les 72 heures d'induction de l'ARNi de *FPC4*, une légère diminution des ARNm de *FPC2* (Figure 87B). Toutefois, même après 240 heures d'induction le taux des ARNm de *FPC2* ne varie plus. Cette légère diminution du taux de messagers de *FPC2* est à mettre en corrélation avec celle observée après l'ARNi de *FPC2* sur le taux d'ARNm de *FPC4*.

De plus, comme pour l'ARNi de *FPC2*, chez les cellules ARNi<sup>*FPC4*</sup> on n'observe peu de variation des taux de messagers de *FPC6* et *BILBO1* (Figure 87B).



**Figure 88 :** Images d'immunofluorescence réalisées sur des cellules U-2 OS extraites. (A) cellule exprimant la protéine FPC4 ; FPC4 est marqué par l'anticorps anti-FPC4. (B) cellule exprimant BILBO1, marqué par l'anti-BILBO1. (C-E) cellule co-exprimant FPC4 et BILBO1. Les deux protéines sont colocalisées dans un réseau linéaire parcourant la cellule. Barre d'échelle= 5µm.

## **B. Co-expression en système hétérologue des protéines du FPC**

### **1. Co-expression de BILBO1 et FPC4**

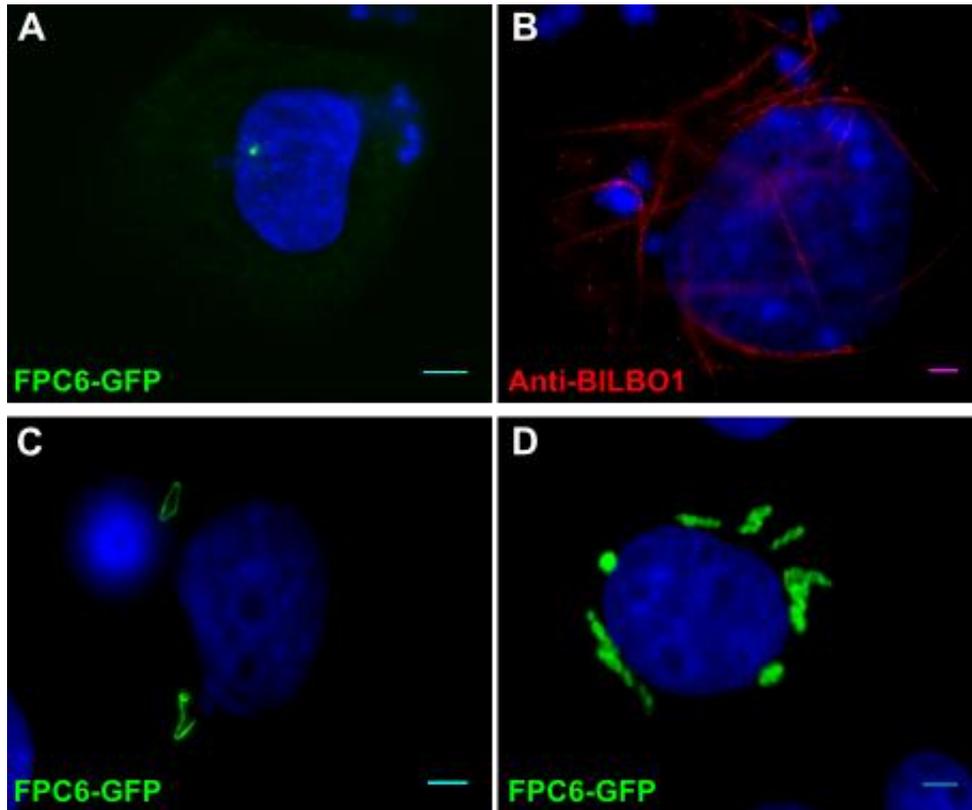
Afin d'analyser l'effet de la protéine FPC4 sur la structure formée par BILBO1, des co-transfections des deux gènes codant pour ces protéines ont été réalisées chez des cellules U-2 OS. Dans le système utilisé, chaque gène est présent dans un plasmide pcDNA3 et une transfection simultanée des deux plasmides est effectuée. Par ce biais, nous n'avons aucun contrôle sur la quantité relative des deux plasmides transfectées par cellule.

En cellule U-2 OS, BILBO1 est localisée majoritairement dans deux types de structure : une structure filamentaire ou tubulaire et une structure hélicoïdale (Figure 88B). Lorsqu'elle est étiquetée avec la GFP, BILBO1 est capable de former des anneaux d'un diamètre moyen de 500 nm. (Figure 37A et B p.115).

FPC4 étiquetée à la GFP ou non, est présente dans un réseau de filaments qui colocalise avec le réseau de microtubules (Figure 88A).

Lors que FPC4 et BILBO1 (dans les deux cas étiquetés ou non) sont exprimées ensemble, par immunofluorescence on observe une variation des structures dans lesquelles on retrouve ces deux protéines. En effet, les filaments du réseau dans lequel se localise FPC4 semblent plus épais et on n'observe plus de structures spécifiques de BILBO1 telles que les anneaux ou les hélices. Toutefois, on observe un réseau de filaments dans lequel semble colocaliser FPC4 et BILBO1 (Figure 88C-E).

Nous avons établi précédemment que FPC4 et BILBO1 interagissent l'une avec l'autre. Il semble donc que cette interaction soit conservée dans ce système hétérologue mammifère et qu'elle influe sur la conformation de la structure formée par BILBO1. Les travaux de double-hybride que nous avons réalisé précédemment montrent que BILBO1 interagit avec FPC4 *via* son domaine N-terminal. Il semble donc que l'interaction de ce domaine avec une autre protéine induit un changement dans la conformation des polymères dans lesquels se localisent BILBO1. Toutefois, le système d'expression utilisée pendant cette étude ne permet de contrôler les niveaux de protéines exprimées dans les cellules. Il est donc difficile de déterminer quelle protéine influe le plus sur l'autre à moins de pouvoir moduler les niveaux d'expressions des deux protéines. Un vecteur d'expression chez les cellules mammifères permettant l'expression simultanée de plusieurs protéines a récemment été acquis par le laboratoire, ceci devrait permettre d'affranchir du biais engendré par la différence de taux de transfection relative à chaque vecteurs (lors de la transfection simultanée de deux vecteurs).



**Figure 89 :** Images d'immunofluorescence réalisées sur des cellules U-2 OS extraites. (A) La cellule exprime FPC6-GFP qui se localise essentiellement au niveau du centrosome. (B) Cellule exprimant BILBO1 ; la protéine est marquée par l'anticorps anti-BILBO1. (C-D) Cellules co-exprimant FPC6-GFP et BILBO1. On observe des polymères hélicoïdaux et linéaires dont la conformation est proche de celle adoptée par BILBO1 et BILBO1-GFP. Barre d'échelle= 5μm.

## 2. Co-expression de BILBO1 et FPC6

Nous avons également étudié l'effet de l'interaction entre FPC6 et BILBO1 sur les polymères formés par cette dernière. Une co-transfection de plasmides comportant les gènes *BILBO1* et *FPC6-GFP* a été réalisée chez des cellules U-2 OS.

FPC6 fusionnée à la GFP, est observée dans un réseau de filaments qui colocalise partiellement avec le réseau de microtubules, on la retrouve également localisée au niveau du centrosome (Figure 89A). Les études en double-hybride et l'observation de la localisation des FPC6 en système hétérologue, suggèrent que contrairement à BILBO1, cette protéine n'est pas capable de former des polymères.

Lorsque les protéines BILBO1 et FPC6-GFP sont co-exprimées, on n'observe plus de réseau de filaments ou de localisation de FPC6-GFP au niveau du centrosome (Figure 89C et D). Après 24 heures de co-expression, on observe deux types de structures où se localisent FPC6-GFP : quelques fins filaments et structures de type annulaire (Figure 89C) ainsi que des structures plus denses qui restent connectées entre elles autour du noyau (Figure 89D). Contrairement au résultat observé lorsque FPC6-GFP est exprimée seule dans la cellule, en présence de BILBO1, la protéine de fusion FPC6-GFP est localisée dans des polymères. Ces données suggèrent que FPC6-GFP influe, *via* son interaction avec BILBO1, sur la structure des polymères formés par BILBO1. En effet, on observe dans ce cas des polymères de type tubulaire et annulaire. Cependant, ce résultat doit encore être confirmé par un marquage de BILBO1 chez ces cellules co-exprimant FPC6-GFP et BILBO1. Toutefois, les conformations observées sont très proche de celles des structures dans lesquelles se localisent BILBO1-GFP. FPC6-GFP pourrait dans ce cas, mimer ou simuler l'effet de la GFP sur BILBO1. Ce résultat préliminaire doit être confirmé par l'immunofluorescence de BILBO1, montrant la présence de BILBO1 chez ces cellules co-exprimant FPC6-GFP et BILBO1. De plus, il serait intéressant d'observer les résultats obtenus après la co-expression de BILBO1 et FPC6 sans étiquette.

## III. Discussion

Tous ces travaux ont permis d'identifier et de caractériser plusieurs protéines au niveau du FPC. Un interactome montrant les relations entre ces différentes protéines a pu être établi. Celui-ci révèle également le lien entre une protéine du bilobe, *TbMORN1* et une protéine du FPC nommée FPC4. C'est le premier lien physique identifié entre les protéines du FPC et celles du bilobe.

De plus, nous avons pu identifier une relation entre les régulations transcriptionnelles des gènes *FPC2* et *FPC4*. Toutefois la régulation des autres gènes identifiés (*FPC6* et *BILBO1*), exprimés au FPC ne semble pas être affectée par celle de *FPC2* ou *FPC4*.

Nous avons également pu observer que l'interaction entre BILBO1 et ses partenaires au sein du FPC (*FPC4* ou *FPC6*), a une influence sur la conformation des polymères formés par BILBO1 en système hétérologue mammifère (cellules U-2 OS). Ce qui tendrait à montrer que, bien que BILBO1 ait un rôle primordial dans la formation et la structure du FPC, la présence des autres protéines peut influencer de façon directe ou non, la stabilité et la structure du FPC.

De plus, les travaux préliminaires effectués sur la localisation de *FPC6* lors de l'induction de l'ARNi de *BILBO1* chez *T. brucei*, montre qu'elle est toujours associée au nouveau flagelle bien qu'il n'y plus de FP ou de FPC. Nous avons pu localiser la protéine entre le corps basal et la partie de la zone de transition reconnue par l'anti-FTZC (Figure 83 p.181). Ce qui localiserait *FPC6* au niveau du collaquette, au sein de la zone de transition ou proche de la base proximale du flagelle. Ce résultat est à mettre en corrélation avec celui obtenu dans les cellules RPE-1, où *FPC6*-GFP se localise au niveau des corps basaux et de la zone de transition du cil primaire produit (Figure 86).

De plus, à priori chez ces cellules ARNi<sup>*BILBO1*</sup>, l'IFT n'est pas inhibé car on observe l'élongation du nouveau flagelle (nouveau flagelle détaché chez ces cellules), bien que sa longueur soit légèrement plus courte que celle de l'ancien flagelle. Néanmoins, on peut imaginer que l'absence de FP pourrait impliquer l'absence d'un possible partenaire membranaire de *FPC6* pouvant jouer un rôle dans l'adressage correcte de la protéine. Il peut être envisagé d'utiliser des souches de trypanosomes mutées pour l'IFT-B (transport antérograde)<sup>[94]</sup>, cela dans le but de contrôler l'implication de ce transport dans la localisation de protéines du FPC. Des immuno-marquages des différentes protéines du FPC chez ces mutants permettraient de vérifier cette hypothèse.

# **DISCUSSION GENERALE**

*Trypanosoma brucei* est un parasite monoflagellé responsable de trypanosomiasés africaines humaines et animales. Ces parasitoses ont un grave impact sanitaire et économique dans les zones endémiques (Afrique sub-saharienne) [3]. La médication appliquée pour traiter ces infections est lourde et toxique, la génération d'un vaccin est rendue difficile par la présence de variants antigéniques à la surface du parasite [239, 240, 241]. Aussi, de nombreuses études cherchent à mettre en lumière de nouvelles cibles thérapeutiques chez *T. brucei*. Le séquençage complet du génome de ce parasite [46] a permis de cibler différents projets d'études sur des gènes intervenant dans les voies de biosynthèse lipidique, enzymatique et protéiques du parasite [240]. Toutes les données concernant ces cibles potentielles sont collectées et évaluées dans une base de données, « TDR Targets Database » (<http://tdrtargets.org/>), mise en place par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). De plus, les travaux réalisés sur le cytosquelette du parasite ont permis de montrer le rôle essentiel de certaines structures dans la survie et la prolifération du parasite [78, 130].

## I. FPC : cible thérapeutique potentielle

L'une des principales cibles est représentée par le flagelle et les structures qui y sont associées. En effet, de nombreux travaux [78, 86] ont mis en évidence le rôle essentiel du flagelle pour la survie du parasite chez l'hôte mammifère, notamment *via* la motilité qui intervient dans la division cellulaire, l'échappement au système immunitaire et les échanges moléculaires. Dans l'optique de mieux comprendre la biologie de *T. brucei* et de mettre à jour des cibles thérapeutiques potentielles, l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse travaille sur la biogénèse de son cytosquelette.

Ma thèse s'est articulée autour de l'étude et la caractérisation de nouvelles protéines identifiées au niveau du collier de la poche flagellaire (FPC). Cette structure du cytosquelette fait le lien entre la poche flagellaire (FP) et le flagelle [242]. La présence du FPC, a été montrée comme essentielle à la formation de la FP et donc à la survie du parasite [130]. En 2008, le premier constituant identifié au sein de cette structure [130], par l'équipe de Derrick Robinson, décrit une conformation annulaire ou similaire à celle d'un fer à cheval au cou de la FP (zone de sortie du flagelle). Cinq ans après la trilogie cinématographique *Le Seigneur des anneaux*, D. Robinson trouve également son « précieux » et nomme alors cette protéine BILBO1 en référence au premier détenteur de l'anneau tant désiré, « Bilbo le hobbit ». Cette référence prend tout son sens quand on sait que BILBO1 est essentielle à la formation du FPC et donc également à celle de la FP [130]. Cet anneau de BILBO1 est donc précieux pour le parasite.

Les travaux de génomiques fonctionnelles effectués sur *T. brucei* montrent que l'absence de BILBO1 se traduit par une inhibition de la biogénèse du FPC, de la FP et d'un arrêt de la division cellulaire. Cette protéine, dont les homologues sont présent chez *Leishmania* et *T. cruzi*, est spécifique des *Kinetoplastidae*. On ne retrouve aucun homologue chez les eucaryotes supérieurs. Son rôle essentiel et sa spécificité en font une cible thérapeutique potentielle pour lutter contre ces parasitoses. BILBO1 est d'ailleurs répertoriée dans la base de données « TDR Targets Database » comme cible thérapeutique potentielle.

Mon étude rentre dans le cadre d'un projet visant à mieux appréhender et comprendre la structure de BILBO1 et ses interactions éventuelles avec d'autres protéines du cytosquelette. Plusieurs protéines ont été identifiées comme partenaires potentiels de BILBO1. Ainsi de nouvelles protéines du FPC ont été identifiées.

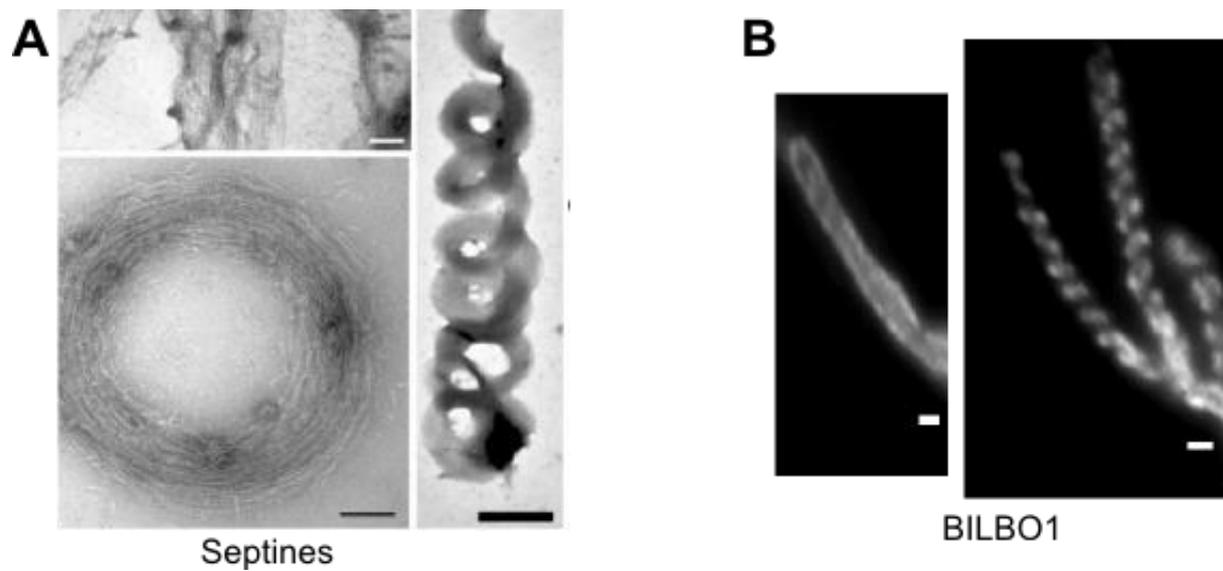
## II. BILBO1 : Rôle structural

### A. Propriété de polymérisation de BILBO1

Les premiers travaux sur BILBO1 ont montré le rôle déterminant du FPC sur la formation de la poche flagellaire. Le FPC permet non seulement d'établir une jonction entre la membrane de la FP et celle du flagelle, mais pourrait également jouer un rôle de filtre, permettant la diffusion ou la rétention de molécules dans la membrane plasmique et celle de la FP.

En effet, des études de protéomiques <sup>[112, 243]</sup> ont montrés une différence de composition protéique entre les membranes. Chez les mammifères, à la base des cils primaires une barrière de diffusion a été identifiée au niveau de la zone de transition du flagelle <sup>[244, 132]</sup>. Cette barrière met en jeu un anneau de septines (hétéro-oligomère de septines 2 et 7) de 500 nm de diamètre, au niveau du collier ciliaire <sup>[133]</sup>. Ce type de structure est également présent à base proximale du flagelle des spermatozoïdes mammifères, soit à l'annulus de ces cellules <sup>[245]</sup>.

Les septines sont capables de former des polymères annulaires et hélicoïdaux qui engagent le domaine GTP-binding et le domaine coiled-coil de ces protéines. Le collier ciliaire dont la structure se rapproche beaucoup plus de celle du collarete <sup>[115]</sup> que de celle du FPC, est présent à la membrane ciliaire, à la base proximale de la zone de transition <sup>[236]</sup>. Il est connecté aux microtubules du flagelle *via* des « Y-link ». Les protéines et molécules composant cette structure sont encore mal connues, certaines protéines de cette structure ont été identifiées, notamment Cep290 <sup>[82, 236, 246]</sup>.

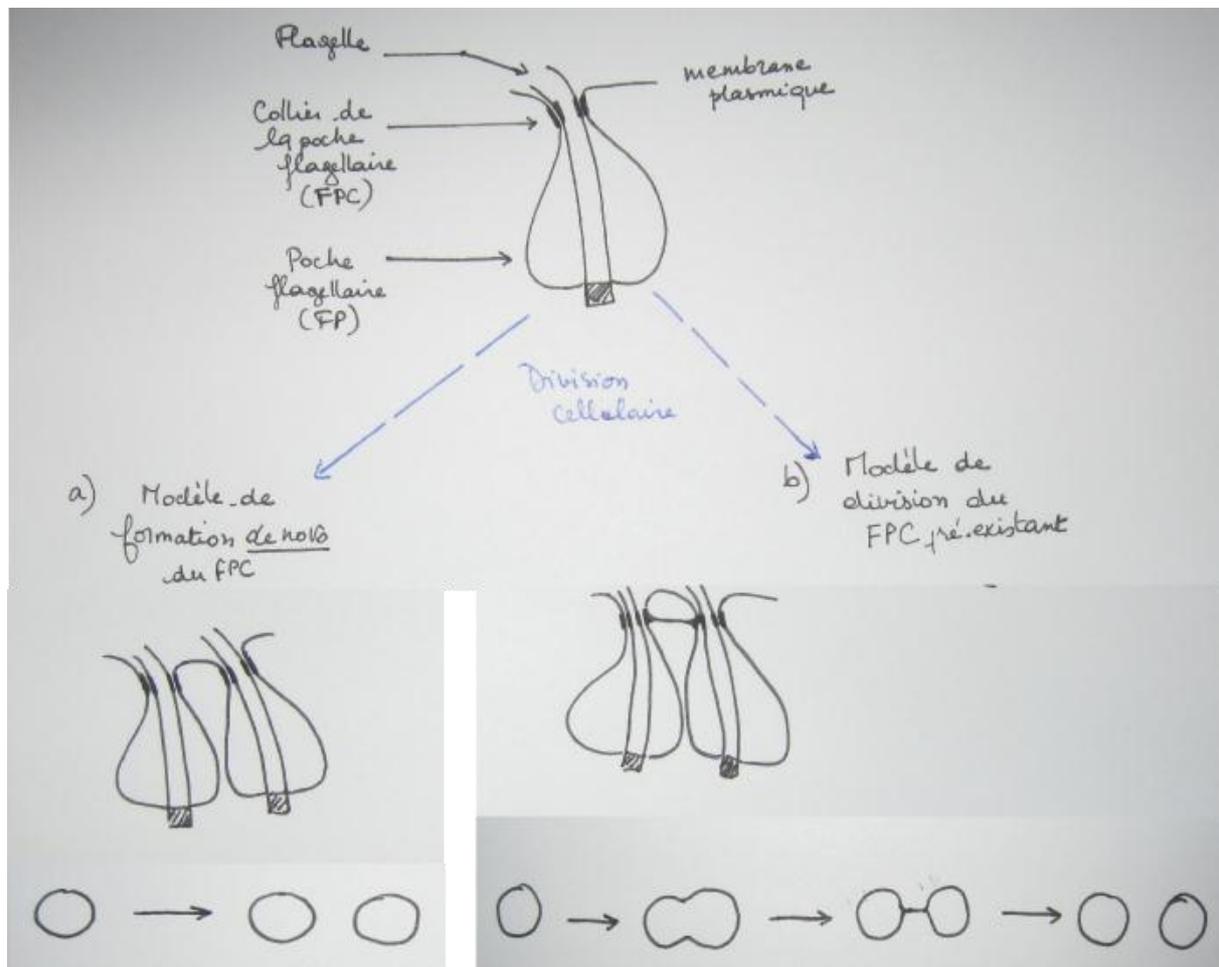


**Figure 90:** Structure des polymères formés par les septines 2, 6 et 7 (A) *in vitro*. Images observées au microscope électronique à transmission, après coloration négative des polymères formés (fuseaux, anneau, hélices) par les septines 2, 6 et 7, *in vitro*. Barre d'échelle fine 100 nm ; barre d'échelle épaisse 500 nm. Publiée par Kinoshita *et al.*, *Developmental Cell*, 2002. ; et des polymères formés par BILBO1 chez les U-2 OS (B). Images d'immunofluorescence réalisées sur des cellules U-2 OS exprimant BILBO1 (24 heures après transfection). BILBO1 est marqué par l'anticorps monoclonal de souris anti-BILBO1. BILBO1 forme des polymères linéaires et hélicoïdaux. Barre d'échelle= 1 μm.

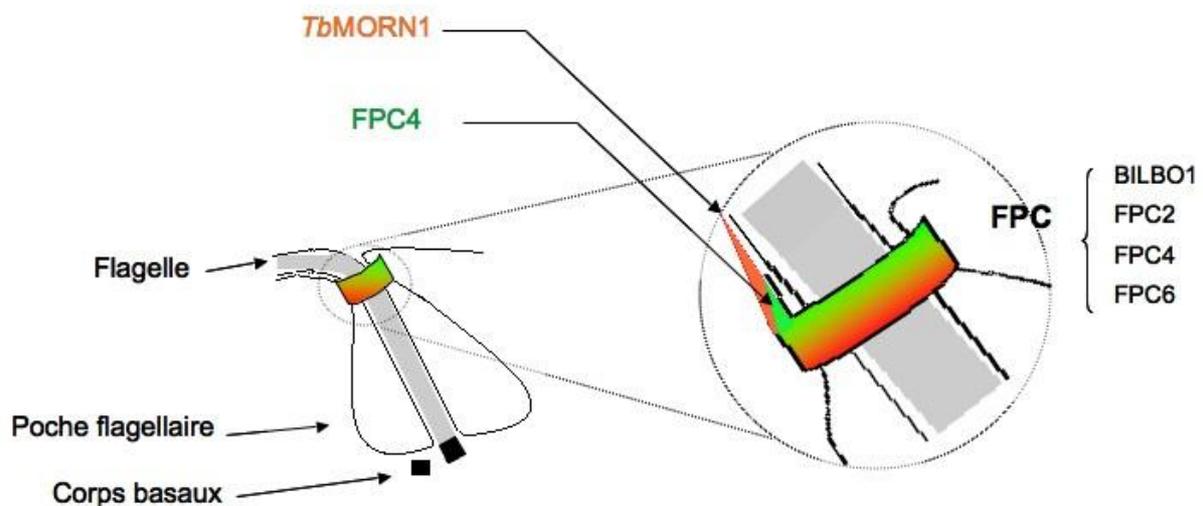
Une structure similaire à celle du collier ciliaire a été caractérisée la base des flagelles chez *Chlamydomonas*. La formation de cette structure est définie comme IFT indépendante, car l'absence d'IFT n'altère pas la formation de la zone de transition alors qu'elle inhibe l'élongation du flagelle <sup>[91, 247]</sup>. Il n'est pas exclu que le collaquette présent à la base du flagelle chez *T. brucei* puisse également constituer une barrière moléculaire de même type que le collier ciliaire. Néanmoins, très peu de données sont connues concernant le collaquette chez le parasite. De plus, l'analyse du génome du parasite ne révèle pas la présence de protéines homologues aux septines dans la cellule.

Ce résultat n'exclut cependant pas la possibilité de présence d'homologues fonctionnels capables comme les septines de s'auto-assembler en polymère de structure annulaire <sup>[133, 134]</sup>. Ce type de propriété semble similaire à celui observé chez BILBO1 (Figure 90). Nos travaux d'expressions en cellules mammifères ont montré la propriété d'auto-assemblage de BILBO1 en polymères linéaires et hélicoïdaux. L'analyse de cet auto-assemblage révèle une capacité d'interaction entre les domaines coiled-coil de la protéine. Nous avons également montré que les motifs EF-Hand de BILBO1 interviennent dans la conformation des polymères formés par la protéine. Ceux-ci sont également nécessaires à l'adressage de la protéine au FPC chez le parasite. De plus, on a pu observer lorsque fusionné à la GFP, une capacité de polymérisation en structure annulaire d'un diamètre similaire à celui observé pour la FPC chez le parasite. Cela suggère une propriété intrinsèque de polymérisation chez BILBO1 dont la conformation pourrait être modulée par les interactions que la protéine pourrait entretenir au sein du collier. En accord avec cette hypothèse, les travaux de co-expression de BILBO1 et FPC6-GFP (partenaire protéique) montre une modification de la structure des polymères formés par BILBO1 qui sous l'influence de FPC6-GFP adopte des structures annulaires et incurvées. Cela suggère une régulation possible de la conformation des polymères de BILBO1 par les interactions que la protéine entretient avec d'autres protéines au sein du FPC, notamment FPC6. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait réaliser la co-expression de BILBO1 et FPC6 sans étiquette, afin de s'affranchir de l'influence éventuelle de la GFP.

Tous ces résultats suggèrent que le caractère essentiel de BILBO1, pourrait être dû à sa capacité intrinsèque de polymérisation, garantissant ainsi la structure du collier.



**Figure 91: Schématisation des modèles de formation de nouveau FPC au cours du cycle de division cellulaire de *T. brucei*.** (a) Modèle de formation *de novo* du FPC : la formation du nouveau FPC est indépendante du FPC pré-existant au sein de la cellule. (b) Modèle de duplication-division du FPC : la formation du nouveau FPC résulte de la duplication et ségrégation du FPC pré-existant. Il y aurait un élargissement du FPC, suivie d'une division qui induirait le resserrement de la structure en configuration de « 8 ». On aurait ensuite la séparation des FPC.



**Figure 92 : Schématisation de la structure du FPC et des interactions qui y ont lieu.** BILBO1 interagit avec FPC4, FPC6 et elle-même. FPC4 interagit avec *TbMORN1* et établit un lien entre le FPC et le bilobe.

## B. Formation du FPC

Chez *T. brucei*, lors de la division cellulaire deux modèles permettent d'expliquer la formation d'un nouveau FPC. Un des modèles définit une formation *de novo* et l'autre modèle une formation issue d'une division de la structure préexistante (Figure 91). L'analyse des travaux de surexpression de BILBO1 et ses partenaires protéiques chez le parasite, suggèrent que la formation du nouveau FPC résulte de la division de l'ancien.

En effet, la surexpression de FPC2 met en lumière la présence d'une connexion entre deux FPC chez les cellules en cours de division de type 2K1N (Figure 91). Ce lien pourrait résulter de la division en cours du FPC. Nous avons également montré que la surexpression des protéines BILBO1, FPC4 et FPC6 inhibe la formation d'un nouveau FPC au sein de la cellule. Cette inhibition est accompagnée d'une déstructuration du FPC préexistant due à l'accumulation des protéines du FPC dans la structure. Ce résultat suggère que l'accumulation des protéines au sein du FPC prévient la division de la structure. On aurait pu imaginer que dans l'hypothèse où la formation du FPC suit le modèle *de novo*, la surexpression des protéines constituant cette structure pourrait induire la formation au sein de la cellule de plusieurs structures de type FPC.

Les résultats obtenus suggèrent donc que la formation du FPC suit un modèle de duplication et ségrégation du FPC préexistant. Cette hypothèse mise en relation avec celle défendue par Lacomble *et al.* <sup>[40]</sup>, sur la division de la FP pourrait impliquer que ces deux processus (division de la FP et du FPC) sont corrélés. Lacomble *et al.* ont montré que la duplication et ségrégation du corps basal et du kinétoplaste entraînait la division de la FP *via* le déplacement du nouveau corps basal. Toutefois, nous avons montré que cette division ne peut être complète que lorsqu'un FPC est formé à la zone de sortie du nouveau flagelle. En outre, les travaux sur BILBO1 (ARNi<sup>BILBO1</sup>) et les autres protéines du FPC (surexpression chez *T. brucei*, montrent l'implication de la formation du FPC dans celle de la FAZ associée au flagelle néoformé. Cela suggère une connexion, voire un lien physique entre la FAZ et le FPC. L'identification de tous les constituants du FPC, notamment *via* l'étude des partenaires de protéines déjà identifiés au FPC pourrait permettre de mettre à jour ce lien.

## III. Interactome au sein du FPC chez *T. brucei*

Le collier de la poche flagellaire a une structure similaire à celle des desmosomes <sup>[114]</sup>. En effet, en microscopie électronique à transmission, on observe une structure dense aux électrons qui rapproche les membranes plasmiques et flagellaires à la zone de sortie du flagelle.

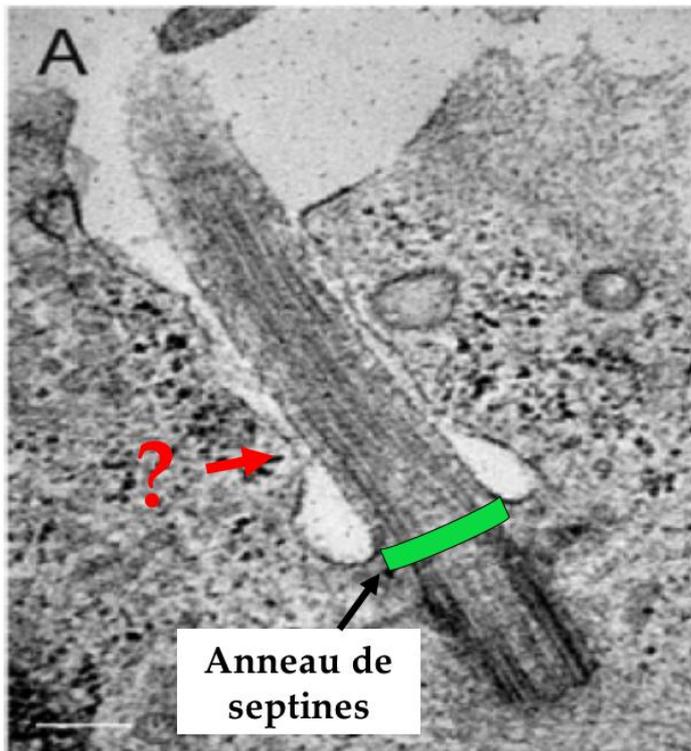
Pendant longtemps la FPC a d'ailleurs été désignée comme « zone d'adhérence » ou « desmosome-like »<sup>[110]</sup>. Les desmosomes sont des structures qui permettent d'établir des zones d'adhésions entre deux membranes. Ces structures font intervenir des filaments intermédiaires, généralement des filaments de kératine ou de vimentine qui sont connectés à des complexes protéiques ancrés aux membranes *via* les desmoplakines<sup>[248, 249]</sup>. Néanmoins, aucun homologue de kératine, constituant majeur des desmosomes n'a été identifié dans le génome de *T. brucei*.

Toutefois, on retrouve dans ce génome des homologues de protéines impliquées dans ce type de jonction chez les eucaryotes supérieurs, notamment les desmoplakines. Ces protéines n'ayant pas encore été caractérisées, il serait intéressant d'observer leur localisation dans la cellule. De nombreux constituants du collier sont encore inconnus, mais on peut supposer aisément que la jonction entre les différentes membranes devrait faire intervenir une ou plusieurs protéines membranaires et/ou transmembranaires.

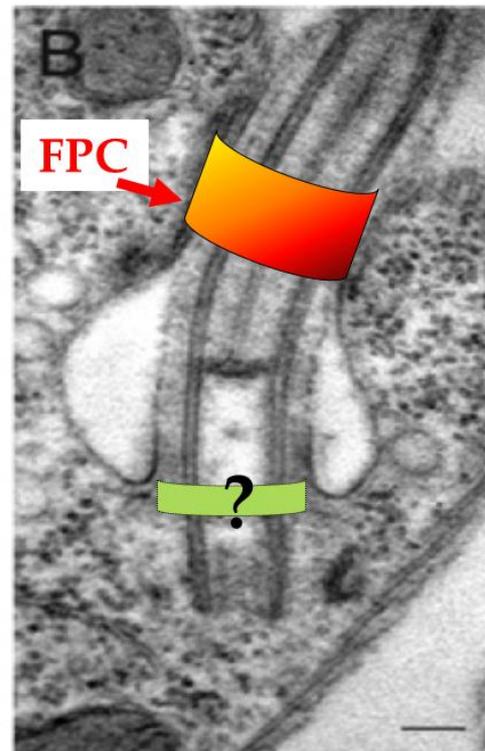
La recherche des partenaires protéiques de BILBO1 par crible en double-hybride chez la levure a permis d'identifier deux des protéines étudiées dans cette thèse, FPC4 et FPC6 (Figure 92). La troisième protéine étudiée FPC2, n'interagit pas avec BILBO1, elle est néanmoins localisée au niveau du FPC. L'analyse fonctionnelle de FPC2 réalisée ici ne permet pas de mettre en lumière la fonction de cette protéine au sein du collier. Toutefois, les données obtenues suggèrent un caractère essentiel de cette protéine pour la survie du parasite.

L'étude de FPC4 permet la mise en évidence et l'identification du premier lien physique entre le FPC et le bilobe. Les études menées par les équipes de C. He<sup>[139]</sup> et G. Warren<sup>[136, 138]</sup> avaient permis d'identifier deux protéines du bilobe *TbMORN1* et *TbLRRP1* dont la localisation au sein du parasite est très proche de celle du collier. En effet, une colocalisation partielle entre BILBO1 et ces protéines a été observée en microscopie confocale<sup>[138, 139]</sup>. Plus récemment, une étude en microscopie électronique<sup>[136]</sup> confirme cette colocalisation entre *TbMORN1*, *TbLRRP1* et BILBO1. Nous avons montré par double-hybride chez la levure, que FPC4 interagit avec *TbMORN1*. De plus, la surexpression de GFP-FPC4 entraîne une altération de la structure du FPC suivie par *TbMORN1* et *TbLRRP1*. FPC4 constitue le seul lien identifié entre le FPC et le bilobe. Ces résultats suggèrent que certaines protéines du bilobe telles que *TbMORN1* et *TbLRRP1*, précédemment caractérisées comme régulateur de la biogenèse du Golgi<sup>[138, 139]</sup>, puisse également participer à la structure du collier et permettre peut-être d'établir un lien entre celui-ci et la FAZ. En effet les derniers travaux réalisés sur *TbMORN1* suggèrent une connexion entre cette protéine et la FAZ, notamment *via* le quartet de microtubules<sup>[136]</sup> et le complexe FAZ/ER.

### Poche ciliaire (cellule humaine)



### Poche flagellaire (*T. brucei*)



**Figure 93 : Images de coupes ultra-fines observées au microscope électronique à transmission. (A) :** Coupe longitudinale d'une poche ciliaire chez une cellule épithéliale RPE1. L'anneau de septines représenté en vert, est une barrière de diffusion située à la base du cil. La flèche rouge désigne la zone de rapprochement de la membrane de la poche ciliaire avec celle du cil. **(B) :** Coupe longitudinale de la poche flagellaire de *T. brucei*. Le collier de la poche flagellaire (FPC) y est représenté en dégradé rouge-orange. A la base du flagelle, « l'anneau vert » désigne la présence d'une possible barrière de diffusion séparant la membrane flagellaire, de celle de la poche flagellaire. Modifié à partir de l'image publiée par Vincensini *et al.*, *Biology of the Cell*, 2011.

Chez la forme procyclique de *T. brucei*, le bilobe est en contact avec le Golgi et le domaine FAZ-ER de la FAZ. L'altération de l'expression des protéines identifiées au niveau du bilobe entraînant une inhibition de la duplication et ségrégation correcte du Golgi, un rôle dans la biogenèse du Golgi a été proposé pour ce complexe. FPC4 pourrait dans ce modèle, faire le lien entre le FPC, la FAZ et le Golgi.

Tous ces résultats attestent de la complexité de la structure du collier de la poche flagellaire chez le trypanosome. Ils mettent également en évidence l'étroite connexion de cette structure avec celle du bilobe et de la FAZ. Les protéines identifiées jusqu'à présent au sein de ce complexe, sont spécifiques des trypanosomatidés. Elles représentent donc des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, il pourrait être envisagé dans l'avenir de générer et de tester des molécules ou des peptides capables d'inhiber des interactions <sup>[250]</sup> essentielles au sein du FPC, notamment l'interaction de BILBO1 avec elle-même ou de BILBO1 avec ses partenaires.

#### **IV. Poche flagellaire : structure**

Chez *T. brucei*, la poche flagellaire est un micro-domaine membranaire, connecté à différentes structures du cytosquelette (le flagelle, le FPC) impliquées dans sa formation et son maintien <sup>[110, 115, 130]</sup>.

Bien qu'à priori de morphologie similaire (Figure 93), elle est à distinguer de la poche ciliaire (située à la base de certains flagelles, cils motiles ou immotiles chez les mammifères <sup>[117, 131]</sup>) par sa formation, son rôle et les structures du cytosquelette associées. Pourtant, les récentes études menées sur la poche ciliaire suggèrent un lien évolutif entre la structure de la poche flagellaire (*Kinetoplastidae*) et celle de la poche ciliaire (mammifères) <sup>[131, 244, 246]</sup>. Toutefois des différences sont notées entre ces deux structures, notamment concernant le rôle de l'actine dans la morphologie de la poche ciliaire. Au sein de cette structure, l'actine serait impliquée dans le rapprochement de la membrane de la poche ciliaire et de celle du cil <sup>[131, 256]</sup>. En revanche chez *T. brucei*, aucune étude n'a pu établir de rôle de l'actine dans la structure du FPC.

De plus, la présence de 3 micro-domaines membranaires associés à la FP, suggèrent la présence d'au moins deux barrières de diffusion différentes associées à cette structure. En effet, on distingue la membrane flagellaire, la membrane de la FP et la membrane plasmique.

Dans l'éventualité que le FPC constitue une barrière de diffusion entre la membrane plasmique et celle de la FP, on peut envisager qu'à l'instar du cil primaire, une autre barrière localisée à la base du flagelle puisse permettre de distinguer la membrane flagellaire de celle de la FP. L'une des hypothèses envisagées est que le collarete pourrait constituer cette barrière de diffusion <sup>[115]</sup>. L'étude et l'identification des protéines impliquées dans cette structure pourraient permettre de mieux comprendre la structure et la formation de la poche flagellaire.

Nous avons déjà établi qu'aucun homologue génétique de septine n'était présent au sein du génome de *T. brucei*. Cependant, ce constat n'exclut pas qu'une structure similaire à celle formée par les septines à la base des cils primaires, soit présente à la base du flagelle chez le parasite.

Ces faits montrent, qu'en dépit de la similarité morphologique et fonctionnelle (rôle dans l'endocytose) qui existe entre la poche ciliaire et la poche flagellaire, des différences structurelles existent entre ces organites. Notamment, concernant l'existence et la structure des barrières de diffusion au sein de ces structures.

## **V. Perspectives générales**

La caractérisation des nouvelles protéines identifiées au FPC devra être poursuivie, notamment pour déterminer les domaines impliqués dans l'interaction avec BILBO1 (cas de FPC6) et dans les interactions qu'elles peuvent entretenir avec elles-mêmes (cas de FPC2 et FPC4). L'étude en double-hybride de l'interaction entre différentes troncations de ces protéines permettra d'identifier les domaines impliqués dans les interactions précitées.

La caractérisation de FPC4, ainsi que celle de FPC6 pourra être complétée par l'identification du domaine nécessaire et suffisant à l'adressage de ces protéines au FPC, chez *T. brucei*. Pour cela, des troncations des protéines (celles qui auront été utilisées lors de l'étude en double-hybride décrite ci-dessus) seront surexprimées chez le parasite afin d'en déterminer la localisation.

De nombreuses questions demeurent sur la conformation de la structure du FPC. Les travaux menés sur BILBO1 <sup>[130]</sup>, premier marqueur du FPC suggère une conformation en anneau ou en fer-à-cheval. La caractérisation de la conformation des structures où se localisent FPC2, 4 et 6 chez le parasite pourrait permettre de mieux comprendre la structure du FPC.

De nouvelles techniques d'imagerie de haute résolution <sup>[251, 252]</sup> pourrait permettre de caractériser ces structures dont le diamètre est proche de 500 nm. Une récente étude, utilisant de façon combiner deux techniques de « nano-microscopie » (PALM et STORM <sup>[253]</sup>), a permis de caractériser la localisation précise de Cep123 au sein du centrosome, chez l'Homme <sup>[254]</sup>. On pourrait envisager d'utiliser ce type de techniques pour caractériser la localisation des protéines du FPC les unes par rapport aux autres et ainsi déterminer l'agencement de ces protéines au sein de la structure. Cette analyse pourrait notamment, permettre de localiser de façon plus précise les protéines situées vers l'intérieur du FPC, soit celles susceptibles d'établir des interactions directes ou indirectes avec la membrane de la poche flagellaire et/ou celle du flagelle.

Enfin, selon le même principe que celui utilisé lors de l'identification de nouvelles protéines du FPC, on peut envisager de rechercher les partenaires de toutes ces protéines, dans le but de caractériser la structure complète du FPC.

Jusqu'à présent, aucun partenaire de FPC2 n'a été identifié, cela bien que les résultats obtenus suite à son ARN interférence suggèrent un lien avec FPC4. Le rôle de cette protéine n'est pas encore connu, néanmoins elle pourrait jouer un rôle essentiel dans la survie du parasite. Il serait donc intéressant d'identifier les partenaires de cette protéine afin de mieux comprendre son rôle au sein du FPC.

La mise en évidence de l'interactome complet du FPC et de l'implication de ces interactions dans la formation de la structure, permettrait de cibler des interactions essentielles. La génération de peptides ou molécules capable de bloquer ces interactions <sup>[255]</sup> pourrait conduire à la production de traitement capable de cibler spécifiquement les trypanosomes et d'inhiber leur prolifération.

# Bibliographie

1. Payne L, Fitchett JR: **Bringing neglected tropical diseases into the spotlight.** *Trends Parasitol* 2010, **26**:421-423.
2. Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH: **Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases.** *Lancet* 2009, **373**:1570-1575.
3. Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R: **Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases.** *J Clin Invest* 2008, **118**:1301-1310.
4. Stevens JR: **Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes.** *Parasite* 2008, **15**:226-232.
5. Simpson AG, Stevens JR, Lukes J: **The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates.** *Trends Parasitol* 2006, **22**:168-174.
6. de Souza W, Attias M, Rodrigues JC: **Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida).** *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41**:2069-2080.
7. Gull K: **Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies.** *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**:365-370.
8. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M: **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** *PLoS One* 2012, **7**:e35671
9. den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J: **Leishmaniasis impact and treatment access.** *Clin Microbiol Infect* 2011, **17**:1471-1477.
10. Antinori S, Schifanella L, Corbellino M: **Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, **31**:109-118.
11. Singh N, Kumar M, Singh RK: **Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets.** *Asian Pac J Trop Med* 2012, **5**:485-497.
12. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA: **Chagas disease.** *Lancet* 2010, **375**:1388-1402.
13. Gurtler RE, Cecere MC, Rubel DN, Schweigmann NJ: **Determinants of the domiciliary density of *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease.** *Med Vet Entomol* 1992, **6**:75-83.
14. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB: **Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease.** *Cell Microbiol* 2012, **14**:634-643.
15. Lee BY, Bacon KM, Wateska AR, Bottazzi ME, Dumonteil E, Hotez PJ: **Modeling the economic value of a Chagas' disease therapeutic vaccine.** *Hum Vaccin Immunother* 2012, **8**.
16. Ilemobade AA: **Tsetse and trypanosomosis in Africa: the challenges, the opportunities.** *Onderstepoort J Vet Res* 2009, **76**:35-40.
17. Namangala B: **How the African trypanosomes evade host immune killing.** *Parasite Immunol* 2011, **33**:430-437.
18. Wheeler RJ: **The trypanolytic factor-mechanism, impacts and applications.** *Trends Parasitol* 2010, **26**:457-464.
19. Malvy D, Chappuis F: **Sleeping sickness.** *Clin Microbiol Infect* 2011, **17**:986-995.

20. De Greef C, Hamers R: **The serum resistance-associated (SRA) gene of *Trypanosoma brucei rhodesiense* encodes a variant surface glycoprotein-like protein.** *Mol Biochem Parasitol* 1994, **68**:277-284.
21. Bullard W, Kieft R, Capewell P, Veitch NJ, Macleod A, Hajduk SL: **Haptoglobin-hemoglobin receptor independent killing of African trypanosomes by human serum and trypanosome lytic factors.** *Virulence* 2012, **3**:72-76.
22. Kieft R, Capewell P, Turner CM, Veitch NJ, MacLeod A, Hajduk S: **Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* (group 1) resistance to human trypanosome lytic factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:16137-16141.
23. Ferguson MA: **The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research.** *J Cell Sci* 1999, **112 ( Pt 17)**:2799-2809.
24. Gadelha C, Holden JM, Allison HC, Field MC: **Specializations in a successful parasite: what makes the bloodstream-form African trypanosome so deadly?** *Mol Biochem Parasitol* 2011, **179**:51-58.
25. Jacobs RT, Nare B, Phillips MA: **State of the art in African trypanosome drug discovery.** *Curr Top Med Chem* 2011, **11**:1255-1274.
26. Pollastri MP, Campbell RK: **Target repurposing for neglected diseases.** *Future Med Chem* 2011, **3**:1307-1315.
27. Blum JA, Neumayr AL, Hatz CF: **Human African trypanosomiasis in endemic populations and travellers.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, **31**:905-913.
28. McGeary RP, Bennett AJ, Tran QB, Cosgrove KL, Ross BP: **Suramin: clinical uses and structure-activity relationships.** *Mini Rev Med Chem* 2008, **8**:1384-1394.
29. Fenn K, Matthews KR: **The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:539-546.
30. McKean PG: **Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*.** *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**:600-607.
31. Hammarton TC, Monnerat S, Mottram JC: **Cytokinesis in trypanosomatids.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:520-527.
32. Hammarton TC: **Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*.** *Mol Biochem Parasitol* 2007, **153**:1-8.
33. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS: **Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress.** *Environ Health Perspect* 1999, **107 Suppl 1**:5-24.
34. Selvapandiyan A, Kumar P, Salisbury JL, Wang CC, Nakhasi HL: **Role of Centrins 2 and 3 in Organelle Segregation and Cytokinesis in *Trypanosoma brucei*.** *PLoS One* 2012, **7**:e45288.
35. Pradel LC, Bonhivers M, Landrein N, Robinson DR: **NIMA-related kinase TbNRKC is involved in basal body separation in *Trypanosoma brucei*.** *J Cell Sci* 2006, **119**:1852-1863.
36. Hammarton TC, Kramer S, Tetley L, Boshart M, Mottram JC: ***Trypanosoma brucei* Polo-like kinase is essential for basal body duplication, kDNA segregation and cytokinesis.** *Mol Microbiol* 2007, **65**:1229-1248.
37. de Graffenried CL, Ho HH, Warren G: **Polo-like kinase is required for Golgi and bilobe biogenesis in *Trypanosoma brucei*.** *J Cell Biol* 2008, **181**:431-438.
38. Ikeda KN, de Graffenried CL: **Polo-like kinase is necessary for flagellum inheritance in *Trypanosoma brucei*.** *J Cell Sci* 2012, **125**:3173-3184.

39. He CY, Pypaert M, Warren G: **Golgi duplication in Trypanosoma brucei requires Centrin2.** *Science* 2005, **310**:1196-1198.
40. Lacomble S, Vaughan S, Gadelha C, Morphew MK, Shaw MK, McIntosh JR, Gull K: **Basal body movements orchestrate membrane organelle division and cell morphogenesis in Trypanosoma brucei.** *J Cell Sci* 2010, **123**:2884-2891.
41. Briggs LJ, McKean PG, Baines A, Moreira-Leite F, Davidge J, Vaughan S, Gull K: **The flagella connector of Trypanosoma brucei: an unusual mobile transmembrane junction.** *J Cell Sci* 2004, **117**:1641-1651.
42. Davidge JA, Chambers E, Dickinson HA, Towers K, Ginger ML, McKean PG, Gull K: **Trypanosome IFT mutants provide insight into the motor location for mobility of the flagella connector and flagellar membrane formation.** *J Cell Sci* 2006, **119**:3935-3943.
43. Ersfeld K: **Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in Trypanosoma brucei.** *Res Microbiol* 2011, **162**:626-636.
44. Li Z, Umeyama T, Wang CC: **The Aurora Kinase in Trypanosoma brucei plays distinctive roles in metaphase-anaphase transition and cytokinetic initiation.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000575.
45. Daniels JP, Gull K, Wickstead B: **Cell biology of the trypanosome genome.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2010, **74**:552-569.
46. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, et al: **The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei.** *Science* 2005, **309**:416-422.
47. De Gaudenzi JG, Noe G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A: **Gene expression regulation in trypanosomatids.** *Essays Biochem* 2011, **51**:31-46.
48. Alsford S, Turner DJ, Obado SO, Sanchez-Flores A, Glover L, Berriman M, Hertz-Fowler C, Horn D: **High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome.** *Genome Res* 2011, **21**:915-924.
49. Haile S, Papadopoulou B: **Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:569-577.
50. Clayton CE: **Life without transcriptional control? From fly to man and back again.** *Embo J* 2002, **21**:1881-1888.
51. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, et al: **Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa.** *Science* 2005, **309**:404-409.
52. Aphasizhev R, Aphasizheva I: **Mitochondrial RNA processing in trypanosomes.** *Res Microbiol* 2011, **162**:655-663.
53. Aphasizhev R, Aphasizheva I: **Uridine insertion/deletion editing in trypanosomes: a playground for RNA-guided information transfer.** *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011, **2**:669-685.
54. Clayton CE: **Genetic manipulation of kinetoplastida.** *Parasitol Today* 1999, **15**:372-378.
55. Roditi I, Furger A, Ruepp S, Schurch N, Butikofer P: **Unravelling the procyclin coat of Trypanosoma brucei.** *Mol Biochem Parasitol* 1998, **91**:117-130.
56. Ferguson MA: **The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research.** *J Cell Sci* 1999, **112 ( Pt 17)**:2799-2809.
57. Cross GA: **Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes.** *Annu Rev Immunol* 1990, **8**:83-110.

58. Rudenko G: **African trypanosomes: the genome and adaptations for immune evasion.** *Essays Biochem* 2011, **51**:47-62.
59. Engstler M, Thilo L, Weise F, Grunfelder CG, Schwarz H, Boshart M, Overath P: **Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in Trypanosoma brucei.** *J Cell Sci* 2004, **117**:1105-1115.
60. Weirather JL, Wilson ME, Donelson JE: **Mapping of VSG similarities in Trypanosoma brucei.** *Mol Biochem Parasitol* 2012, **181**:141-152.
61. Taylor JE, Rudenko G: **Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe?** *Trends Genet* 2006, **22**:614-620.
62. Mayer U, Jurgens G: **Microtubule cytoskeleton: a track record.** *Curr Opin Plant Biol* 2002, **5**:494-501.
63. Berepiki A, Lichius A, Read ND: **Actin organization and dynamics in filamentous fungi.** *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**:876-887.
64. Goldman RD, Cleland MM, Murthy SN, Mahammad S, Kuczarski ER: **Inroads into the structure and function of intermediate filament networks.** *J Struct Biol* 2012, **177**:14-23.
65. Kohl L, Gull K: **Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton.** *Mol Biochem Parasitol* 1998, **93**:1-9.
66. Gull K: **The cytoskeleton of trypanosomatid parasites.** *Annu Rev Microbiol* 1999, **53**:629-655.
67. Janke C, Bulinski JC: **Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**:773-786.
68. Lloyd C, Hussey P: **Microtubule-associated proteins in plants--why we need a MAP.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:40-47.
69. Wade RH: **On and around microtubules: an overview.** *Mol Biotechnol* 2009, **43**:177-191.
70. Detmer E, Hemphill A, Muller N, Seebeck T: **The Trypanosoma brucei autoantigen I/6 is an internally repetitive cytoskeletal protein.** *Eur J Cell Biol* 1997, **72**:378-384.
71. Baines A, Gull K: **WCB is a C2 domain protein defining the plasma membrane - sub-pellicular microtubule corset of kinetoplastid parasites.** *Protist* 2008, **159**:115-125.
72. Affolter M, Hemphill A, Roditi I, Muller N, Seebeck T: **The repetitive microtubule-associated proteins MARP-1 and MARP-2 of Trypanosoma brucei.** *J Struct Biol* 1994, **112**:241-251.
73. Rindisbacher L, Hemphill A, Seebeck T: **A repetitive protein from Trypanosoma brucei which caps the microtubules at the posterior end of the cytoskeleton.** *Mol Biochem Parasitol* 1993, **58**:83-96.
74. Vedrenne C, Giroud C, Robinson DR, Besteiro S, Bosc C, Bringaud F, Baltz T: **Two related subpellicular cytoskeleton-associated proteins in Trypanosoma brucei stabilize microtubules.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**:1058-1070.
75. Kohl L, Bastin P: **The flagellum of trypanosomes.** *Int Rev Cytol* 2005, **244**:227-285.
76. Koyfman AY, Schmid MF, Gheiratmand L, Fu CJ, Khant HA, Huang D, He CY, Chiu W: **Structure of Trypanosoma brucei flagellum accounts for its bihelical motion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:11105-11108.
77. Hill KL: **Parasites in motion: flagellum-driven cell motility in African trypanosomes.** *Curr Opin Microbiol* 2010, **13**:459-465.
78. Ralston KS, Hill KL: **The flagellum of Trypanosoma brucei: new tricks from an old dog.** *Int J Parasitol* 2008, **38**:869-884.

79. Pearson CG, Winey M: **Basal body assembly in ciliates: the power of numbers.** *Traffic* 2009, **10**:461-471.
80. Kobayashi T, Dynlacht BD: **Regulating the transition from centriole to basal body.** *J Cell Biol* 2011, **193**:435-444.
81. McKean PG, Baines A, Vaughan S, Gull K: **Gamma-tubulin functions in the nucleation of a discrete subset of microtubules in the eukaryotic flagellum.** *Curr Biol* 2003, **13**:598-602.
82. Reiter JF, Blacque OE, Leroux MR: **The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization.** *EMBO Rep* 2012, **13**:608-618.
83. Zhao Z, Lindsay ME, Roy Chowdhury A, Robinson DR, Englund PT: **p166, a link between the trypanosome mitochondrial DNA and flagellum, mediates genome segregation.** *Embo J* 2008, **27**:143-154.
84. Robinson DR, Gull K: **Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle.** *Nature* 1991, **352**:731-733.
85. Bonhivers M, Landrein N, Decossas M, Robinson DR: **A monoclonal antibody marker for the exclusion-zone filaments of Trypanosoma brucei.** *Parasit Vectors* 2008, **1**:21.
86. Ralston KS, Kabututu ZP, Melehani JH, Oberholzer M, Hill KL: **The Trypanosoma brucei flagellum: moving parasites in new directions.** *Annu Rev Microbiol* 2009, **63**:335-362.
87. Downing KH, Sui H: **Structural insights into microtubule doublet interactions in axonemes.** *Curr Opin Struct Biol* 2007, **17**:253-259.
88. Lindemann CB, Lesich KA: **Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible.** *J Cell Sci* 2010, **123**:519-528.
89. Ralston KS, Kisalu NK, Hill KL: **Structure-function analysis of dynein light chain 1 identifies viable motility mutants in bloodstream-form Trypanosoma brucei.** *Eukaryot Cell* 2011, **10**:884-894.
90. Dacheux D, Landrein N, Thonnus M, Gilbert G, Sahin A, Wodrich H, Robinson DR, Bonhivers M: **A MAP6-related protein is present in protozoa and is involved in flagellum motility.** *PLoS One* 2012, **7**:e31344.
91. Taschner M, Bhogaraju S, Lorentzen E: **Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis.** *Differentiation* 2012, **83**:S12-22.
92. Scholey JM: **Intraflagellar transport.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003, **19**:423-443.
93. Buisson J, Chenouard N, Lagache T, Blisnick T, Olivo-Marin JC, Bastin P: **Intraflagellar transport proteins cycle between the flagellum and its base.** *J Cell Sci.* 2012
94. Absalon S, Blisnick T, Kohl L, Toutirais G, Dore G, Julkowska D, Tavenet A, Bastin P: **Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**:929-944.
95. Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL: **A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:5519-5523.
96. Han YG, Kwok BH, Kernan MJ: **Intraflagellar transport is required in Drosophila to differentiate sensory cilia but not sperm.** *Curr Biol* 2003, **13**:1679-1686.
97. Hughes LC, Ralston KS, Hill KL, Zhou ZH: **Three-dimensional structure of the Trypanosome flagellum suggests that the paraflagellar rod functions as a biomechanical spring.** *PLoS One* 2012, **7**:e25700.

98. Lacomble S, Portman N, Gull K: **A protein-protein interaction map of the *Trypanosoma brucei* paraflagellar rod.** *PLoS One* 2009, **4**:e7685.
99. Portman N, Gull K: **The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function.** *Int J Parasitol* 2010, **40**:135-148.
100. Hoog JL, Bouchet-Marquis C, McIntosh JR, Hoenger A, Gull K: **Cryo-electron tomography and 3-D analysis of the intact flagellum in *Trypanosoma brucei*.** *J Struct Biol* 2012, **178**:189-198.
101. Maga JA, Sherwin T, Francis S, Gull K, LeBowitz JH: **Genetic dissection of the *Leishmania* paraflagellar rod, a unique flagellar cytoskeleton structure.** *J Cell Sci* 1999, **112 ( Pt 16)**:2753-2763.
102. Demonchy R, Blisnick T, Deprez C, Toutirais G, Loussert C, Marande W, Grellier P, Bastin P, Kohl L: **Kinesin 9 family members perform separate functions in the trypanosome flagellum.** *J Cell Biol* 2009, **187**:615-622.
103. Vaughan S, Kohl L, Ngai I, Wheeler RJ, Gull K: **A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in *Trypanosoma brucei*.** *Protist* 2008, **159**:127-136.
104. LaCount DJ, Barrett B, Donelson JE: ***Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis.** *J Biol Chem* 2002, **277**:17580-17588.
105. Gallo JM, Precigout E: **Tubulin expression in trypanosomes.** *Biol Cell* 1988, **64**:137-143.
106. Lacomble S, Vaughan S, Deghelt M, Moreira-Leite FF, Gull K: **A *Trypanosoma brucei* protein required for maintenance of the flagellum attachment zone and flagellar pocket ER domains.** *Protist* 2012, **163**:602-615.
107. Mason JM, Arndt KM: **Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications.** *ChemBiochem* 2004, **5**:170-176.
108. Rizo J, Sudhof TC: **C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain.** *J Biol Chem* 1998, **273**:15879-15882.
109. Zhou Q, Liu B, Sun Y, He CY: **A coiled-coil- and C2-domain-containing protein is required for FAZ assembly and cell morphology in *Trypanosoma brucei*.** *J Cell Sci* 2011, **124**:3848-3858.
110. Field MC, Carrington M: **The trypanosome flagellar pocket.** *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**:775-786.
111. Maric D, Epting CL, Engman DM: **Composition and sensory function of the trypanosome flagellar membrane.** *Curr Opin Microbiol* 2010, **13**:466-472.
112. Oberholzer M, Langousis G, Nguyen HT, Saada EA, Shimogawa MM, Jonsson ZO, Nguyen SM, Wohlschlegel JA, Hill KL: **Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*.** *Mol Cell Proteomics* 2011, **10**:M111 010538.
113. Baker N, Glover L, Munday JC, Aguinaga Andres D, Barrett MP, de Koning HP, Horn D: **Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:10996-11001.
114. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP: **The desmosome.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, **1**:a002543.
115. Lacomble S, Vaughan S, Gadelha C, Morphew MK, Shaw MK, McIntosh JR, Gull K: **Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography.** *J Cell Sci* 2009, **122**:1081-1090.
116. Bangs JD: **Replication of the ERES:Golgi junction in bloodstream-form African trypanosomes.** *Mol Microbiol* 2011, **82**:1433-1443.

117. Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, Meunier A, Serres C, Silbermann F, Emmerson C, Romeo K, Bourdoncle P, Schmitt A, et al: **The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia.** *J Cell Sci* 2010, **123**:1785-1795.
118. de Souza W, Sant'Anna C, Cunha-e-Silva NL: **Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa.** *Prog Histochem Cytochem* 2009, **44**:67-124.
119. Engstler M, Pfohl T, Herminghaus S, Boshart M, Wiegertjes G, Heddergott N, Overath P: **Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes.** *Cell* 2007, **131**:505-515.
120. Allen, C.L., D. Goulding, and M.C. Field, **Clathrin-mediated endocytosis is essential in Trypanosoma brucei.** *Embo J*, 2003. **22**(19): p. 4991-5002.
121. Garcia-Salcedo JA, Perez-Morga D, Gijon P, Dilbeck V, Pays E, Nolan DP: **A differential role for actin during the life cycle of Trypanosoma brucei.** *Embo J* 2004, **23**:780-789.
122. Ramanan V, Agrawal NJ, Liu J, Engles S, Toy R, Radhakrishnan R: **Systems biology and physical biology of clathrin-mediated endocytosis.** *Integr Biol (Camb)* 2011, **3**:803-815.
123. Young A: **Structural insights into the clathrin coat.** *Semin Cell Dev Biol* 2007, **18**:448-458.
124. Gabernet-Castello C, Dacks JB, Field MC: **The single ENTH-domain protein of trypanosomes; endocytic functions and evolutionary relationship with epsin.** *Traffic* 2009, **10**:894-911.
125. Mizuno-Yamasaki E, Rivera-Molina F, Novick P: **GTPase networks in membrane traffic.** *Annu Rev Biochem* 2012, **81**:637-659.
126. Jean S, Kiger AA: **Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**:463-470.
127. Dhir V, Goulding D, Field MC: **TbRAB1 and TbRAB2 mediate trafficking through the early secretory pathway of Trypanosoma brucei.** *Mol Biochem Parasitol* 2004, **137**:253-265.
128. Field MC, Carrington M: **Intracellular membrane transport systems in Trypanosoma brucei.** *Traffic* 2004, **5**:905-913.
129. Geiger A, Hirtz C, Becue T, Bellard E, Centeno D, Gargani D, Rossignol M, Cuny G, Peltier JB: **Exocytosis and protein secretion in Trypanosoma.** *BMC Microbiol* 2010, **10**:20.
130. Bonhivers M, Nowacki S, Landrein N, Robinson DR: **Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated.** *PLoS Biol* 2008, **6**:e105.
131. Ghossoub R, Molla-Herman A, Bastin P, Benmerah A: **The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia.** *Biol Cell* 2011, **103**:131-144.
132. Hu Q, Milenkovic L, Jin H, Scott MP, Nachury MV, Spiliotis ET, Nelson WJ: **A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution.** *Science* 2010, **329**:436-439.
133. Mostowy S, Cossart P: **Septins: the fourth component of the cytoskeleton.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**:183-194.
134. Beise N, Trimble W: **Septins at a glance.** *J Cell Sci* 2011, **124**:4141-4146.
135. Barral Y: **Cell biology. Septins at the nexus.** *Science* 2010, **329**:1289-1290.
136. Esson HJ, Morriswood B, Yavuz S, Vidilaseris K, Dong G, Warren G: **Morphology of the trypanosome bilobe, a novel cytoskeletal structure.** *Eukaryot Cell* 2012, **11**:761-772.

137. Wang M, Gheiratmand L, He CY: **An interplay between Centrin2 and Centrin4 on the bi-lobed structure in Trypanosoma brucei.** *Mol Microbiol* 2012, **83**:1153-1161.
138. Morriswood B, He CY, Sealey-Cardona M, Yelinek J, Pypaert M, Warren G: **The bilobe structure of Trypanosoma brucei contains a MORN-repeat protein.** *Mol Biochem Parasitol* 2009, **167**:95-103.
139. Zhou Q, Gheiratmand L, Chen Y, Lim TK, Zhang J, Li S, Xia N, Liu B, Lin Q, He CY: **A comparative proteomic analysis reveals a new bi-lobe protein required for bi-lobe duplication and cell division in Trypanosoma brucei.** *PLoS One* 2010, **5**:e9660.
140. Ikeda KN, de Graffenried CL: **Polo-like kinase is necessary for flagellum inheritance in Trypanosoma brucei.** *J Cell Sci* 2012, **125**:3173-3184.
141. de Graffenried CL, Ho HH, Warren G: **Polo-like kinase is required for Golgi and bilobe biogenesis in Trypanosoma brucei.** *J Cell Biol* 2008, **181**:431-438.
142. Gubbels MJ, Vaishnava S, Boot N, Dubremetz JF, Striepen B: **A MORN-repeat protein is a dynamic component of the Toxoplasma gondii cell division apparatus.** *J Cell Sci* 2006, **119**:2236-2245.
143. Broadhead R, Dawe HR, Farr H, Griffiths S, Hart SR, Portman N, Shaw MK, Ginger ML, Gaskell SJ, McKean PG, Gull K: **Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome.** *Nature* 2006, **440**:224-227.
144. Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA: **A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei.** *Mol Biochem Parasitol* 1999, **99**:89-101.
145. Hirumi H, Hirumi K, Doyle JJ, Cross GA: **In vitro cloning of animal-infective bloodstream forms of Trypanosoma brucei.** *Parasitology* 1980, **80**:371-382.
146. Peacock L, Bailey M, Gibson W: **Tetracycline induction of gene expression in Trypanosoma brucei within the tsetse fly vector.** *Mol Biochem Parasitol* 2005, **140**:247-249.
147. van Deursen FJ, Shahi SK, Turner CM, Hartmann C, Guerra-Giraldez C, Matthews KR, Clayton CE: **Characterisation of the growth and differentiation in vivo and in vitro-of bloodstream-form Trypanosoma brucei strain TREU 927.** *Mol Biochem Parasitol* 2001, **112**:163-171.
148. Niforou KM, Anagnostopoulos AK, Vougas K, Kittas C, Gorgoulis VG, Tsangaris GT: **The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line.** *Cancer Genomics Proteomics* 2008, **5**:63-78.
149. Park JK, Kim BH, Han YS, Park IK: **The effect of telomerase expression on the escape from M2 crisis in virus-transformed human retinal pigment epithelial cells.** *Exp Mol Med* 2002, **34**:107-113.
150. James P, Halladay J, Craig EA: **Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast.** *Genetics* 1996, **144**:1425-1436.
151. Jeong H, Barbe V, Lee CH, Vallenet D, Yu DS, Choi SH, Couloux A, Lee SW, Yoon SH, Cattolico L, et al: **Genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3).** *J Mol Biol* 2009, **394**:644-652.
152. Wickstead B, Ersfeld K, Gull K: **Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of Trypanosoma brucei.** *Mol Biochem Parasitol* 2002, **125**:211-216.
153. Guo L, Liu T, Yang J: **[Expression of eukaryotic expression plasmid pcDNA3/pacA and pcDNA3/pacP in mammalian cells].** *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2000, **18**:412-415.

154. Andersen CR, Nielsen LS, Baer A, Tolstrup AB, Weilguny D: **Efficient expression from one CMV enhancer controlling two core promoters.** *Mol Biotechnol* 2011, **48**:128-137.
155. Geng L, Xin W, Huang DW, Feng G: **A universal cloning vector using vaccinia topoisomerase I.** *Mol Biotechnol* 2006, **33**:23-28.
156. de Folter S, Immink RG: **Yeast protein-protein interaction assays and screens.** *Methods Mol Biol* 2011, **754**:145-165.
157. DeMarini DJ, Carlin EM, Livi GP: **Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 2001, **18**:723-728.
158. Pearson DL, Reimonenq RD, Pollard KM: **Expression and purification of recombinant mouse fibrillarlin.** *Protein Expr Purif* 1999, **17**:49-56.
159. Brun R, Schonenberger: **Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication.** *Acta Trop* 1979, **36**:289-292.
160. Bruckner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U: **Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology.** *Int J Mol Sci* 2009, **10**:2763-2788.
161. Suter B, Kittanakom S, Stagljar I: **Two-hybrid technologies in proteomics research.** *Curr Opin Biotechnol* 2008, **19**:316-323.
162. Bringaud F, Baltz D, Baltz T: **Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:7963-7968.
163. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391**:806-811.
164. Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E: **Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:14687-14692.
165. Clayton CE: **Genetic manipulation of kinetoplastida.** *Parasitol Today* 1999, **15**:372-378.
166. Kohl L, Sherwin T, Gull K: **Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle.** *J Eukaryot Microbiol* 1999, **46**:105-109.
167. Brenndorfer M, Boshart M: **Selection of reference genes for mRNA quantification in *Trypanosoma brucei*.** *Mol Biochem Parasitol* 2010, **172**:52-55.
168. Kretsinger RH, Nockolds CE: **Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description.** *J Biol Chem* 1973, **248**:3313-3326.
169. Zhou Y, Yang W, Kirberger M, Lee HW, Ayalasomayajula G, Yang JJ: **Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins.** *Proteins* 2006, **65**:643-655.
170. Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ: **Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs.** *Biochem J* 2007, **405**:199-221.
171. Lupas AN, Gruber M: **The structure of alpha-helical coiled coils.** *Adv Protein Chem* 2005, **70**:37-78.
172. Grigoryan G, Keating AE: **Structural specificity in coiled-coil interactions.** *Curr Opin Struct Biol* 2008, **18**:477-483.
173. Marchini FK, de Godoy LM, Rampazzo RC, Pavoni DP, Probst CM, Gnad F, Mann M, Krieger MA: **Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome.** *PLoS One* 2011, **6**:e25381.

174. Kelley LA, Sternberg MJ: **Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.** *Nat Protoc* 2009, **4**:363-371.
175. Wolf E, Kim PS, Berger B: **MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils.** *Protein Sci* 1997, **6**:1179-1189.
176. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: **Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.** *J Cell Comp Physiol* 1962, **59**:223-239.
177. Deisenroth C, Itahana Y, Tollini L, Jin A, Zhang Y: **p53-Inducible DHRS3 is an endoplasmic reticulum protein associated with lipid droplet accumulation.** *J Biol Chem* 2011, **286**:28343-28356.
178. Xiong LW, Kleerekoper QK, Wang X, Putkey JA: **Intra- and interdomain effects due to mutation of calcium-binding sites in calmodulin.** *J Biol Chem* 2010, **285**:8094-8103.
179. Shkryl VM, Maxwell JT, Domeier TL, Blatter LA: **Refractoriness of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release determines Ca<sup>2+</sup> alternans in atrial myocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012, **302**:H2310-2320.
180. Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW: **Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics.** *Biophys J* 1976, **16**:1055-1069.
181. Wu Y, Deford J, Benjamin R, Lee MG, Ruben L: **The gene family of EF-hand calcium-binding proteins from the flagellum of Trypanosoma brucei.** *Biochem J* 1994, **304 ( Pt 3)**:833-841.
182. Tyler KM, Fridberg A, Toriello KM, Olson CL, Cieslak JA, Hazlett TL, Engman DM: **Flagellar membrane localization via association with lipid rafts.** *J Cell Sci* 2009, **122**:859-866.
183. Archer SK, Inchaustegui D, Queiroz R, Clayton C: **The cell cycle regulated transcriptome of Trypanosoma brucei.** *PLoS One* 2011, **6**:e18425.
184. Kinoshita M, Field CM, Coughlin ML, Straight AF, Mitchison TJ: **Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins.** *Dev Cell* 2002, **3**:791-802.
185. Weirich CS, Erzberger JP, Barral Y: **The septin family of GTPases: architecture and dynamics.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:478-489.
186. Cao L, Yu W, Wu Y, Yu L: **The evolution, complex structures and function of septin proteins.** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**:3309-3323.
187. Emmer BT, Souther C, Toriello KM, Olson CL, Epting CL, Engman DM: **Identification of a palmitoyl acyltransferase required for protein sorting to the flagellar membrane.** *J Cell Sci* 2009, **122**:867-874.
188. Brewis IA, Brennan P: **Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins.** *Adv Protein Chem Struct Biol* 2010, **80**:1-44.
189. Jensen BC, Sivam D, Kifer CT, Myler PJ, Parsons M: **Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of Trypanosoma brucei.** *BMC Genomics* 2009, **10**:482.
190. Clayton C, Adams M, Almeida R, Baltz T, Barrett M, Bastien P, Belli S, Beverley S, Biteau N, Blackwell J, et al: **Genetic nomenclature for Trypanosoma and Leishmania.** *Mol Biochem Parasitol* 1998, **97**:221-224.
191. Clayton C: **Why do we need standard genetic nomenclature for parasite genes and gene products?** *Acta Trop* 2000, **75**:119-122.
192. Gadelha C, LeBowitz JH, Manning J, Seebeck T, Gull K: **Relationships between the major kinetoplastid paraflagellar rod proteins: a consolidating nomenclature.** *Mol Biochem Parasitol* 2004, **136**:113-115.
193. Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, Depledge DP, Fischer S, Gajria B, Gao X, et al: **TriTrypDB: a functional**

- genomic resource for the Trypanosomatidae.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:D457-462.
194. Teixeira SM, de Paiva RM, Kangussu-Marcolino MM, Darocha WD: **Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases.** *Genet Mol Biol* 2012, **35**:1-17.
  195. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, et al: **Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa.** *Science* 2005, **309**:404-409.
  196. Delorenzi M, Speed T: **An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions.** *Bioinformatics* 2002, **18**:617-625.
  197. Gruber M, Soding J, Lupas AN: **Comparative analysis of coiled-coil prediction methods.** *J Struct Biol* 2006, **155**:140-145.
  198. Cuff JA, Clamp ME, Siddiqui AS, Finlay M, Barton GJ: **JPred: a consensus secondary structure prediction server.** *Bioinformatics* 1998, **14**:892-893.
  199. Schultz JE: **Structural and biochemical aspects of tandem GAF domains.** *Handb Exp Pharmacol* 2009:93-109.
  200. Heikaus CC, Pandit J, Klevit RE: **Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights.** *Structure* 2009, **17**:1551-1557.
  201. Teixeira SM, daRocha WD: **Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae.** *Genet Mol Res* 2003, **2**:148-158.
  202. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R: **Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.** *Plant Cell* 1990, **2**:279-289.
  203. Kolev NG, Tschudi C, Ullu E: **RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges.** *Eukaryot Cell* 2011, **10**:1156-1163.
  204. Lacalle RA, Pulido D, Vara J, Zalacain M, Jimenez A: **Molecular analysis of the pac gene encoding a puromycin N-acetyl transferase from Streptomyces alboniger.** *Gene* 1989, **79**:375-380.
  205. Kimura M, Sekido S, Isogai Y, Yamaguchi I: **Expression, purification, and characterization of blasticidin S deaminase (BSD) from Aspergillus terreus: the role of catalytic zinc in enzyme structure.** *J Biochem* 2000, **127**:955-963.
  206. Brooks DR, McCulloch R, Coombs GH, Mottram JC: **Stable transformation of trypanosomatids through targeted chromosomal integration of the selectable marker gene encoding blasticidin S deaminase.** *FEMS Microbiol Lett* 2000, **186**:287-291.
  207. Long S, Changmai P, Tsaousis AD, Skalicky T, Verner Z, Wen YZ, Roger AJ, Lukes J: **Stage-specific requirement for Isa1 and Isa2 proteins in the mitochondrion of Trypanosoma brucei and heterologous rescue by human and Blastocystis orthologues.** *Mol Microbiol* 2011, **81**:1403-1418.
  208. Motyka SA, Englund PT: **RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids.** *Curr Opin Microbiol* 2004, **7**:362-368.
  209. Ajioka J, Swindle J: **The calmodulin-ubiquitin (CUB) genes of Trypanosoma cruzi are essential for parasite viability.** *Mol Biochem Parasitol* 1996, **78**:217-225.
  210. Guan H, Kiss-Toth E: **Advanced technologies for studies on protein interactomes.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2008, **110**:1-24.
  211. Cordwell SJ: **Sequential extraction of proteins by chemical reagents.** *Methods Mol Biol* 2008, **424**:139-146.

212. Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS, Samuelson JC: **Engineering Escherichia coli BL21(DE3) derivative strains to minimize E. coli protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:4634-4646.
213. Gultekin H, Heermann KH: **The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix.** *Anal Biochem* 1988, **172**:320-329.
214. Goulah CC, Pelletier M, Read LK: **Arginine methylation regulates mitochondrial gene expression in Trypanosoma brucei through multiple effector proteins.** *Rna* 2006, **12**:1545-1555.
215. Chen Y, Hung CH, Burderer T, Lee GS: **Development of RNA interference revertants in Trypanosoma brucei cell lines generated with a double stranded RNA expression construct driven by two opposing promoters.** *Mol Biochem Parasitol* 2003, **126**:275-279.
216. Hu H, Hu L, Yu Z, Chasse AE, Chu F, Li Z: **An orphan kinesin in trypanosomes cooperates with a kinetoplastid-specific kinesin to maintain cell morphology through regulating subpellicular microtubules.** *J Cell Sci* 2012.
217. Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, Mehrotra M, Woodard M, Hansen M, Herschman H, Pilbeam C: **Overexpression of COX-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis.** *Cancer Res* 2006, **66**:6657-6664.
218. Ye Z, Peng H, Fang Y, Feng J, Yang DS: **The construction of the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1/azurin and the increased apoptosis of U2OS cells transfected with it.** *Cell Mol Biol Lett* 2007.
219. Ou Y, Rattner JB: **The centrosome in higher organisms: structure, composition, and duplication.** *Int Rev Cytol* 2004, **238**:119-182.
220. Delaval B, Doxsey SJ: **Pericentrin in cellular function and disease.** *J Cell Biol* 2010, **188**:181-190.
221. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA: **Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**:709-721.
222. Walczak CE, Shaw SL: **A MAP for bundling microtubules.** *Cell* 2010, **142**:364-367.
223. Scharadin TM, Jiang H, Martin S, Eckert RL: **TIG3 Interaction at the Centrosome Alters Microtubule Distribution and Centrosome Function.** *J Cell Sci* 2012.
224. Akisaka T, Yoshida H, Takigawa T: **Differential distribution of posttranslationally modified microtubules in osteoclasts.** *J Histochem Cytochem* 2011, **59**:630-638.
225. Xiao H, Verdier-Pinard P, Fernandez-Fuentes N, Burd B, Angeletti R, Fiser A, Horwitz SB, Orr GA: **Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:10166-10173.
226. Modriansky M, Dvorak Z: **Microtubule disruptors and their interaction with biotransformation enzymes.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005, **149**:213-215.
227. Bosc C, Andrieux A, Job D: **STOP proteins.** *Biochemistry* 2003, **42**:12125-12132.
228. Denarier E, Fourest-Lieuvin A, Bosc C, Pirolet F, Chapel A, Margolis RL, Job D: **Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:6055-6060.
229. Markham K, Bai Y, Schmitt-Ulms G: **Co-immunoprecipitations revisited: an update on experimental concepts and their implementation for sensitive**

- interactome investigations of endogenous proteins.** *Anal Bioanal Chem* 2007, **389**:461-473.
230. Price HP, Hodgkinson MR, Curwen RS, MacLean LM, Brannigan JA, Carrington M, Smith BA, Ashford DA, Stark M, Smith DF: **The orthologue of Sjogren's syndrome nuclear autoantigen 1 (SSNA1) in Trypanosoma brucei is an immunogenic self-assembling molecule.** *PLoS One* 2012, **7**:e31842.
  231. Zieske LR: **A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies.** *J Exp Bot* 2006, **57**:1501-1508.
  232. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B: **Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research.** *Proteomics* 2007, **7**:340-350.
  233. Hemphill A, Lawson D, Seebeck T: **The cytoskeletal architecture of Trypanosoma brucei.** *J Parasitol* 1991, **77**:603-612.
  234. Nett IR, Martin DM, Miranda-Saavedra D, Lamont D, Barber JD, Mehlert A, Ferguson MA: **The phosphoproteome of bloodstream form Trypanosoma brucei, causative agent of African sleeping sickness.** *Mol Cell Proteomics* 2009, **8**:1527-1538.
  235. Luduena RF, Shooter EM, Wilson L: **Structure of the tubulin dimer.** *J Biol Chem* 1977, **252**:7006-7014.
  236. Czarnecki PG, Shah JV: **The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine.** *Trends Cell Biol* 2012, **22**:201-210.
  237. Haslam NJ, Shields DC: **Profile-based short linear protein motif discovery.** *BMC Bioinformatics* 2012, **13**:104.
  238. Bringaud F, Robinson DR, Barradeau S, Biteau N, Baltz D, Baltz T: **Characterization and disruption of a new Trypanosoma brucei repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition.** *Mol Biochem Parasitol* 2000, **111**:283-297.
  239. Simarro PP, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Franco JR, Jannin JG: **The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward.** *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**:e1007.
  240. La Greca F, Magez S: **Vaccination against trypanosomiasis: can it be done or is the trypanosome truly the ultimate immune destroyer and escape artist?** *Hum Vaccin* 2011, **7**:1225-1233.
  241. Magez S, Caljon G, Tran T, Stijlemans B, Radwanska M: **Current status of vaccination against African trypanosomiasis.** *Parasitology* 2010, **137**:2017-2027.
  242. Landfear SM, Ignatushchenko M: **The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids.** *Mol Biochem Parasitol* 2001, **115**:1-17.
  243. Bridges DJ, Pitt AR, Hanrahan O, Brennan K, Voorheis HP, Herzyk P, de Koning HP, Burchmore RJ: **Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form Trypanosoma brucei.** *Proteomics* 2008, **8**:83-99.
  244. Hu Q, Nelson WJ: **Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment.** *Cytoskeleton (Hoboken)* 2011, **68**:313-324.
  245. Kwitny S, Klaus AV, Hunnicutt GR: **The annulus of the mouse sperm tail is required to establish a membrane diffusion barrier that is engaged during the late steps of spermiogenesis.** *Biol Reprod* 2010, **82**:669-678.
  246. Carvalho-Santos Z, Azimzadeh J, Pereira-Leal JB, Bettencourt-Dias M: **Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella.** *J Cell Biol* 2011, **194**:165-175.

247. Pedersen LB, Christensen ST: **Regulating intraflagellar transport.** *Nat Cell Biol* 2012, **14**:904-906.
248. Garrod D, Chidgey M: **Desmosome structure, composition and function.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1778**:572-587.
249. Giepmans BN, van Ijzendoorn SC: **Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1788**:820-831.
250. Wagner EK, Albaugh BN, Denu JM: **High-throughput strategy to identify inhibitors of histone-binding domains.** *Methods Enzymol* 2012, **512**:161-185.
251. Coltharp C, Xiao J: **Superresolution microscopy for microbiology.** *Cell Microbiol.* 2012.
252. Leung BO, Chou KC: **Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology.** *Appl Spectrosc* 2011, **65**:967-980.
253. Henriques R, Mhlanga MM: **PALM and STORM: what hides beyond the Rayleigh limit?** *Biotechnol J* 2009, **4**:846-857.
254. Sillibourne JE, Specht CG, Izeddin I, Hurbain I, Tran P, Triller A, Darzacq X, Dahan M, Bornens M: **Assessing the localization of centrosomal proteins by PALM/STORM nanoscopy.** *Cytoskeleton (Hoboken)* 2011, **68**:619-627.
255. Pierrot C, Freville A, Olivier C, Souplet V, Khalife J: **Inhibition of protein-protein interactions in Plasmodium falciparum: future drug targets.** *Curr Pharm Des* 2012, **18**:3522-3530.
256. Benmerah A: **The ciliary pocket.** *Curr Opin Cell Biol.* 2012.
257. Saarikangas J, Barral Y: **The emerging functions of septins in metazoans.** *EMBO Rep* 2011, **12**:1118-1126.
258. Thomashow LS, Milhausen M, Rutter WJ, Agabian N: **Tubulin genes are tandemly linked and clustered in the genome of trypanosoma brucei.** *Cell* 1983, **32**:35-43.
259. Seebeck T, Whittaker PA, Imboden MA, Hardman N, Braun R: **Tubulin genes of Trypanosoma brucei: a tightly clustered family of alternating genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**:4634-4638.

# **ANNEXES**

# Annexe 1

## Novel polymer and annuli forming properties of the cytoskeleton protein *TbBILBO1*

**Authors;** Célia Florimond<sup>1,2</sup>, Edward. H. Byard<sup>4</sup>, Nicolas Landrein<sup>1,2</sup>, Annelise Sahin<sup>1,2</sup>, Denis Dacheux<sup>1,2,3</sup>, Mélanie Bonhivers<sup>1,2,§</sup>, and Derrick. R. Robinson<sup>1,2,§</sup>.

### **Affiliations;**

1. University Bordeaux, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR-CNRS 5234, F-33000 Bordeaux, France.
2. CNRS, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR-CNRS 5234, F-33000 Bordeaux, France.
3. Institut Polytechnique de Bordeaux, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR-CNRS 5234, F-33000 Bordeaux, France.
4. Department of Biology, University of Winnipeg, Winnipeg, MB R3B 2E9, Canada.

§ Shared last author.

## Abstract

*Trypanosoma brucei* is a protist parasite of central and southern Africa. Related species are cosmopolitan in global distribution and are responsible for a large number of zoonotic diseases. One of the most important single copy organelles of these parasites is the flagellar pocket (FP). The FP is formed by the invagination of the plasma membrane and is the unique site of endo- and exocytosis, but importantly, it is essential for parasite survival and pathogenicity. The FP consists of several distinct structural sub-domains, the least explored being the Flagellar Pocket Collar (FPC), which is located at the neck of the FP. With the exception of the basal bodies, the cytoplasmic portion of the flagellum is largely enveloped by the FP, and the distal exit site of the flagellum is constricted into a horseshoe/annular shaped cytoskeleton structure that forms the FPC. To date the only known component of the FPC is the cytoskeletal protein BILBO1, but surprisingly the mechanisms underlying FPC biogenesis have not been elucidated. However, FP and FPC biogenesis have been demonstrated to be dependant on the expression of BILBO1. BILBO1 consists of a short N-terminus, a non-canonical calcium-binding domain and a canonical calcium-binding domain, followed by a large coiled-coil domain. Despite the important role of this protein the *in silico* description of its domains provide little insight into how the characteristic annulus or horseshoe of the FPC is formed.

Here we demonstrate that the C-terminus of *T. brucei* BILBO1 is necessary and sufficient to target and integrate into the FPC, and that the terminal 206 amino acids of BILBO1 are necessary and sufficient for physical BILBO1-BILBO1 interaction *in vivo* and in a heterogeneous mammalian system. We provide evidence that the FPC forms a diffusion barrier *in vivo*, and show that remarkably expression of full-length GFP tagged BILBO1 in mammalian cells induces the polymerization of the protein into higher order annular and helical polymers with FPC-like dimensions. Additionally, BILBO1 expression without a GFP tag induces linear and sometimes helical polymers. Mutation of key amino acids in the non-canonical calcium-binding domain (EF hand 1) prevented ring or helical polymer formation regardless of the presence or absence of the

GFP-tag. Whereas mutation of key amino acids in the canonical calcium-binding domain (EF hand 2) induced the almost exclusive formation of helical polymers.

These truncation and mutation data suggest that 1. BILBO1 has intrinsic annulus and helix forming properties. 2, Calcium binding is not required for polymer formation. 3. Calcium is important for the type of polymer formed. We propose the hypothesis that the intrinsic annulus and/or helical forming properties of BILBO1 direct the formation of the FPC and results in encirclement of the flagellum. This creates the underpinning cytoskeleton framework from which the FP is constructed.

## Introduction[1]

Recent studies have shown that a variety of primary cilia have, at their exit point of the cell, an invagination of the plasma membrane called the ciliary pocket. Beside the septin ring, no cilia pocket collar proteins have been identified. Consequently our current understanding of the biogenesis of this structure is limited [2]

*Trypanosoma brucei* is an important African parasitic protozoan, The G1 stage of the cell has a single flagellum that exits the cell at the flagellar pocket (FP), and proceeds along the length of the cell. The FP is an organelle-like structure that is located in the posterior of the cell. It functions as the exclusive site for endo- and exocytosis, and is an essential component of membrane trafficking and recycling. Therefore the FP is essential for parasite virulence [1]. Because *T. brucei* must survive within the gut and salivary glands of the tsetse fly and the bloodstream of the mammalian host, the cytoplasmic/intracellular location of the FP is most likely an evolutionary design to sequester important receptors away from detection by the hosts' innate immune system [3]. Recent studies on the *T. brucei* FP and associated cytoskeleton suggest that new FP biogenesis is precisely timed to coordinate with flagellum duplication and segregation [3,4]. It is not known however, how the FPC forms the characteristic annular-horseshoe conformation, or how the FPC tracks around the newly formed flagellum. Furthermore, recent studies show that a variety of primary cilia have, at their exit point of the cell, structural features similar to those of the trypanosome FP. Notably, apart from septins no cilia pocket collar proteins have been identified, which restricts our current understanding of ciliary pocket biogenesis [5,6].

BILBO1 is a trypanosoma flagellum-bound coiled-coil protein with two EF-hand calcium-binding domains (ref plos biol). Knockdown of *BILBO1* transcripts by RNAi inhibits the biogenesis of important cytoskeleton structures, induces severe perturbation of the endomembrane system, induces cell cycle arrest, and is ultimately lethal [3]. Electron microscopy studies illustrate that the FPC is a horse-shoe/annular structure of approximately 500-700 nm in diameter [7,8]. The FPC is

physically attached to the flagellum and circumvents it, but it is unknown how it is attached, nor how the FPC always forms its characteristic shape. In analyzing the trypanosome FPC in detail, the first question we asked was; - How is pocket and FPC shape maintained around the flagellum? Due to the important function of BILBO1 we decided to investigate its role in forming the annular/horse-shoe shape of the FPC. We expressed full-length GFP tagged BILBO1 in mammalian cells and noticed that it produced annular structures with similar dimensions to the FPC of *T. brucei*, whereas GFP alone did not. Expression of untagged BILBO1 in mammalian cells produces spheres, linear and sometimes helical polymers. This would suggest that although intrinsic polymer forming properties are present in BILBO1 the annuli forming properties require additional unknown factors that may also be required in *T. brucei* to construct the FPC. Septins are the only known axonemal proteins that form annuli and these are formed at the base of primary cilia [2,9]. In this report we demonstrate the intrinsic polymer, helix and annulus forming properties of BILBO1 and discuss the role of this protein in forming the structural base for FP biogenesis.

## Results

The primary and secondary structures of BILBO1 do not predict a function and the protein does not appear to have any obvious membrane-targeting domains, it does however possess two predicted EF-Hand calcium-binding motifs (aa 185–213 and aa 221–249) suggesting possible roles in BILBO1 regulation. It also has a large C-terminus coiled-coil domain (aa 263–566), which suggests roles in protein–protein interactions (Figure 1).

To investigate further the function of BILBO1 we used three approaches: 1) identify the domain(s) involved in protein targeting, by expressing BILBO1 as full-length or truncated forms in trypanosomes, 2) identify the domains involved in protein-protein interaction by yeast-two hybrid analysis with full-length BILBO1 and truncated forms, 3) analyze the roles of the different domains in protein-protein interaction and regulation by expressing full-length protein, full-length protein with mutated EF-Hand calcium-binding motifs and truncated protein in mammalian cells.

### ***BILBO1 has polymerization properties in trypanosomes***

Our previous work shows that ectopic expression of full-length GFP-BILBO1 tagged protein in trypanosomes resulted in targeting to, and assembly of, GFP-BILBO1 into the FPC structure [8]. Longer expression of this construct (48H) produced cells that presented BILBO1 RNAi-like phenotypes, whereby cells arrested with the accumulation of insoluble GFP-BILBO1 on, or near, the FPC. Long induction produced cells with detached flagella, which were also relocated to an aberrantly elongated posterior portion of the cell (Figure S1). To investigate the roles of the putative domains identified in BILBO1 we created truncated (T) forms of the protein and expressed them in procyclic cells, using the same ectopic expression system described in Bonhivers 2008. The first truncation (T1) was deletion of amino acids 1-170 of the protein, fused to eGFP (on the C' or N' termini). In all *T. brucei* experiments the GFP tag produced identical results whether it is fused to the N- or the C-terminus of the truncations.

When GFP-T1 (1-170) or GFP-T2 (aa1-250), constructs were over-expressed in procyclic cells, we observed a generic cytoplasmic labeling in whole cells but no signal was present in detergent extracted cytoskeletons (Figure 2 C-F). This indicates that neither of these domains is sufficient to target or bind to the FPC. In contrast, presence of the coiled-coil domain (GFP-T3, see figure 1) allowed targeting and incorporation of the chimeric protein to the FPC. Moreover, we also observed that longer expression (xx hours) of GFP-T3 resulted in the formation of linear polymers that originated from the FPC (Figure 2 G-H). These results suggested that in its native environment BILBO1 has polymer-forming properties and that the coiled-coil domain is required for polymerization and FPC targeting.

### ***BILBO1 self-interaction requires the coiled-coil domain***

To identify the if certain BILBO1 domain(s) are involved in the possible self-interaction observed within the polymers described above, we tested the interaction properties of several BILBO1 truncations with the full-length BILBO1 by yeast-two hybrid assays. These assays showed that the full-length BILBO1 interacts with itself (Figure 3) as well as with all the truncations bearing the coiled-coil domain even in absence of the two-EF-and motifs (T3 and T4), suggesting that the calcium-binding domains are not involved in interaction *per se*. The absence of interaction between full-length BILBO1 and T1 and T2 truncations suggests also that the N-terminal domain is not required for polymer formation and demonstrate at the molecular level that the coiled-coil domain is required for BILBO1-BILBO1 interaction (Figure 3). We were able to observe an interaction with shorter truncations of the coiled-coil domain with the full-length protein with the minimum size protein in a construct that consisted of amino acids 381-587 (data not shown).

### ***BILBO1 forms annular / horse-shoe structures in a heterologous system (U-2 OS)***

To explore the possibility that the primary function of BILBO1 is to form an annular polymer at the FPC, we transiently expressed untagged BILBO1 full-length protein in the mammalian cell line

U-2 OS. Immuno-labeling of BILBO1 showed that expression of the full-length protein for 24H resulted in the formation of a variety of polymers including long, tapered, and helical (Figure 4) and (Figure 6). Long expression time (i.e. 48 H post-transfection) was toxic and prevented cells undergoing cytokinesis, possibly due to the inability to disassemble the polymers formed by BILBO1 (data not shown). Confirmation of our hypothesis that BILBO1 can form polymers and higher order annuli *in vivo* was, in part, validated when spheres, and helical structures with diameter of ~800 nm were observed (Figure 4 and 6). This suggests that expression of BILBO1 in a heterogeneous system does not impede its intrinsic spiral or annulus-like forming properties.

### *BILBO1-GFP*

Expression of BILBO1-GFP in U-2 OS cells induced spheres, corkscrews and helical structures, but most interestingly annular polymers (Figure 4, 5 and 6). On average, the annuli are ~800 nm in diameter, the spheres 1  $\mu\text{m}$  and the corkscrews spiral with a pitch spacing of about 1  $\mu\text{m}$ . These structures, together with those formed by un-tagged BILBO1, have similar diametric dimensions to the FPC (~500-700 nm depending on cell cycle stage). With increasing time after transfection these polymers appeared as small filaments, then as larger polymers of various shapes. Cells left in culture for 24 hours after transfection were clearly stressed (data not shown). Long expression time (i.e. 48H post-transfection) was toxic and prevented cells from undergoing cytokinesis, possibly due to the inability to disassemble the polymers formed by BILBO1 or BILBO1-GFP (data not shown).

The slight discrepancy in the structures observed between the tagged and un-tagged forms of BILBO1 suggests that the GFP tag might have a stabilizing role in annuli formation due to possible polymerization of GFP [10], but from these data we conclude that BILBO1 has the intrinsic facility to polymerize into organized annular and helical polymers in the absence of other parasite-specific proteins.

### *In U-2 OS cells BILBO1 polymerizes in structures independent of the cytoskeleton*

To investigate whether the BILBO1 polymers were associated with pre-existing or newly formed cytoskeleton structures, cells expressing BILBO1-GFP were labeled for F-Actin (Texas red-conjugated phalloidin), intermediate filaments (anti-vimentin), and microtubules (anti-alpha tubulin). BILBO1 annuli/polymers co-localize neither with tubulin, actin nor intermediate filaments (Figure 5, A-I). Also major intracellular structures such as the endoplasmic reticulum (anti-calnexin) or the Golgi apparatus (anti-giantin) did not co-localize with BILBO1 polymers (Figure 5 J-O). We conclude that the polymers formed by BILBO1 or BILBO1-GFP do not associate with mammalian cytoskeleton, ER or Golgi proteins, but rather emphasizes the self-polymerization properties of BILBO1.

### ***BILBO1 polymerization: which domain(s) are essential?***

In BILBO1 primary sequence the serine 163 is present in the N<sup>o</sup> terminal domain and is located before the two EF-Hand motifs, and *in vivo* is phosphorylated in bloodstream forms of *T. cruzi* and in PCF *T. brucei* [11], and our unpublished data, and could suggest that phosphorylation (or a dephosphorylation) could induce a BILBO1 conformational change leading to polymer shape changes. However, mutation of the BILBO1 (or BILBO1-GFP) serine 163 to alanine and to aspartate, to mimic the un-phosphorylated or phosphorylated states respectively, did not influence the polymers formed in U-2 OS cells (data not shown), suggesting that the phosphorylation of the serine is not regulating the conformation of BILBO1 and thus polymer type.

### *The N-terminal domain regulates polymerization of the coiled-coil domain.*

To investigate the domain(s) that allow(s) BILBO1 to form annuli, we expressed GFP-tagged and un-tagged truncated forms of the protein in U-2 OS cells. These truncations are described in Figure 1 and 6. Truncations T1, T2 and T5 (GFP-tagged or un-tagged) did not produce polymers and were distributed throughout the cytoplasm. These proteins could be extracted by mild detergent treatment (described in Figure 6 for un-tagged truncations). These data confirm the results obtained when the same truncations were expressed in the parasite, and demonstrate that T1 and T2 are

soluble. Cells expressing T3-GFP produced small, spindle shaped polymerized structures (long and short), but no annuli or helices were observed (Figure 6F). Expression of T4 produced, long spindle shaped, polymers, which appeared as bundles, but also appeared in some instances to be connected end to end. Again no annuli or spherical structures were observed with this construct. As previously indicated by the yeast two-hybrid experiments, the coiled-coil domain is required for polymerization. However, the truncation data described here indicate that the N<sup>7</sup>-terminal domain is not required for polymerization, and the EF-hand motifs play a crucial role in the shape of the polymer formed.

#### *The EF-Hands are not required for BILBO1 polymerization*

*In silico* Analysis of the two BILBO1 EF-Hand motifs, indicate that motif 1 is non-canonical (12-residue loop (aa 194-205, containing a lysine at position y), but motif 2 is canonical (12-residue loop, aa 230-241) [12,13]. As EF-Hand motifs can play major roles in protein conformation and protein-protein interaction [14], we tested their roles in BILBO1 polymer formation by independently expressing mutated forms of BILBO1 EF-Hand 1 and 2 in U-2 OS cells (Figure 7). Indeed mutation of EF-Hand 1 (mEF-H1, D<sub>194</sub>, N<sub>198</sub>, D<sub>202</sub>, and D<sub>205</sub> mutated into A) had a severe effect on polymerization by abolishing the formation of long and helical polymers and leading to small aggregate formation (Figure 7 A, B), similar to those obtained when both EF-Hand 1 and 2 motifs were mutated (Figure 7E, F). Surprisingly, mutation of the canonical EF-Hand 2 motif (mEF-H1, D<sub>230</sub>, N<sub>232</sub>, and E<sub>241</sub> mutated into A), lead to a very homogenous phenotype where only helices (spiral and corkscrew-like) plus rings/horseshoe structures could be observed (Figure 7C, D). This phenotype was observed regardless of whether BILBO1 was GFP tagged or not, indicating that GFP importantly, does not influence polymer formation. From all mutations and truncations tested, only mEF-Hand 2 construct lead to the formation of almost exclusively annulus/horseshoe-based structures, and suggests a fine regulation of BILBO1 conformation *in vivo*. This result can tentatively, explain the requirement for regulation of FPC dynamics during the cell cycle.

### ***The FPC, a diffusion barrier***

Due to its location and role it is conceivable that BILBO1 participates to a membrane protein diffusion barrier in a manner similar to the septins. Septins have been observed in the base of primary of cilia, the sperm annulus, and in the mother-bud neck of budding yeast where they form a diffusion barrier that controls membrane protein diffusion [9,15,16]. In order to test whether the FPC can function as a selective diffusion barrier, we searched for specific flagellum membrane markers. The putative signalling protein calflagin is such a protein. It belongs to a family of cryptic trypanosome specific, EF-hand, calcium-binding proteins, that are limited to the flagellum membrane where they are associated with lipid rafts [17,18]. Calflagins must pass through the FPC or the FP, in order to be selectively targeted to the flagellum. Because inhibition of BILBO1 expression abolishes the formation of a new FPC and FP but not the new flagellum, we subsequently used the inducible BILBO1<sup>RNAi</sup> cell line described previously (Bonhivers et al 2008) to prevent new FPC/FP formation and test the localization of calflagin. Immuno-fluorescence (IF) on BILBO1<sup>RNAi</sup> non-induced cells showed calflagin label on both the mother (old) and daughter (new) flagella in dividing cells (Figure 8A-B). Importantly, both flagella were positive, in induced BILBO1<sup>RNAi</sup> cells when the new flagellum did not segregate from the old flagellum but exited the cell from the same FP (Figure 8C-D). In contrast, in the case of BILBO1<sup>RNAi</sup> induced cells that had separated their new flagella, and thus did not have a new FPC/FP, the old maternal flagellum was positive for calflagin, but the new flagellum was negative, indicating that the absence of the FP and/or FPC prevented correct sorting or selective filtering of calflagin to the new flagellum.

It is unlikely that the major protein of the FPC forms annular polymers coincidentally. Considering the physical nature and role of the FPC and the properties of BILBO1 it is more conceivable that annulus formation is a requirement of BILBO1 *in vivo*. Consequentially, we conclude that the *in vivo* function of BILBO1 is to form a substratum in the shape of a collar and that this encircles the new flagellum as it exits the FP. This provides a cytoskeleton base from which the new FP can be constructed. However in addition to this the FPC is not a simple structural support and also plays an essential role as a diffusion barrier.

From these data, we conclude that full-length BILBO1 in a heterologous U-2OS cell expression system forms annulus-based structures that have the general dimensions of the flagellar pocket collar. No other deletion construct of BILBO1 was capable of generating annuli although importantly T3 and T4 are capable of producing polymers (Figure 4F and G). We also conclude that the coiled-coil domain is required to make polymers and that both the N-terminus and the coiled-coil domains are required to make spheres or annuli.

## Discussion

The FPC encircles a distinct post transition zone region at the base of the axoneme and brings the FP, pellicular and flagellum membranes into close proximity. The FP thus forms a tight junction-like interface. We hypothesize that the FPC is in fact a triage-based structure and not uniquely a structural one. The structural function of the FPC is however vital for cell survival.

Based on previous observations we argued that the formation of the FPC annulus is due to the ordered polymerization of one or more structural proteins. Our yeast two-hybrid studies indicate that BILBO1 interacts with itself *via* a minimal region that consists of the terminal 206 amino acids of the coiled-coil domain (Summarized in Figure S1). When over-expressed in *T. brucei* a truncated version of BILBO1 (T3), that included the EF-Hand plus coiled-coil domain, induced linear polymers in the cell. These polymers appear to originate from the FPC. This would suggest that these domains are sufficient for targeting and for the formation of polymers. *In vivo* over-expression of full-length BILBO1-GFP in *T. brucei* produced large spheres that enveloped the FPC preventing FP and FPC function and division and induced RNAi-like phenotypes. The toxicity of GFP-tagged full-length BILBO1 however, limited the potential to explore the intrinsic functional aspects of the protein. This information provides important clues in understanding the process of building the FPC, as does the over-expression of GFP-tagged full-length BILBO1, even though the latter proved toxic. Since GFP expression in trypanosomes is not toxic and BILBO1 over-

expression is not toxic (not shown), one of the most plausible reasons for GFP-tagged BILBO1 lethality, in trypanosomes, is the induction of dominant negative effects. BILBO1 polymer formation was therefore tested and demonstrated in a heterologous mammalian cell system where no other endogenous FPC proteins are present. The spectacular induction of annuli formation in this system occurred when the protein is GFP tagged, but importantly it also formed coiled and, very striking, helical polymers in the presence or absence of the GFP tag, indicating that BILBO1 has inherent polymer and helical forming properties.

GFP has been used to tag numerous cytoskeleton proteins and although it may produce artifacts we found no evidence of it forming polymers or annuli. Subsequently it has been widely used as a protein tag [10,19,20]. The universal usage of GFP as a tag suggests that GFP alone has no polymer forming properties and indeed remained soluble and cytoplasmic when expressed in U-2OS cells. It is therefore unlikely that GFP formed the annuli, coils and helical polymers that were observed in our experiments. On the other hand it is possible and likely that it stabilizes these structures when tagged to BILBO1, perhaps due to its potential to dimerize [10].

Expression of truncated domains of BILBO1, with or without the GFP tag in U-2OS cells gave very similar results, but the most striking difference was the annuli formed when full-length BILBO-GFP was expressed. Spheres, linear polymers and helices, but not annuli were formed when untagged BILBO1 was expressed. Truncations T1 and T2 were soluble whether GFP tagged or not, regardless of whether they were expressed in trypanosomes or U-2OS cells. T3 and T4 were capable of only forming linear polymers whether GFP tagged or not and were always insoluble. From these results we conclude that the coiled-coil domain of BILBO1 can spontaneously form high order structures and these are linear in the absence of the N' terminus domains.

Since the FPC is an annulus / horseshoe, and maybe a heteropolymer, we suggest that *in vivo* BILBO1 could form the FPC structure when associated with other FPC proteins. To date we have identified seven BILBO1 binding proteins not including BILBO1 itself (data not shown) and it is highly probable that some of these are structural. Thus it is feasible that one or more of these may promote *in vivo* BILBO1 annuli formation. However, calcium binding appears to play important roles in BILBO1 function, and particularly in polymer formation and type. The results observed from the mutation and expression of EH-Hand motif 1 (mEFH1), EF-Hand motif 2 (mEFH2) or both motifs (mEFH1+2) in mammalian cells suggest that (a) BILBO1 indeed binds calcium, and (b) aggregates rather than polymers are formed because mEFH1 cannot bind calcium. Conversely, the mutation mEFH2 does not prevent polymer formation, but instead induces, almost exclusively, helical polymers. Mutation of both EF-Hands prevented all polymer formation. The results observed from mEFH1 mutation studies imply that mEFH1 is important for controlling polymer formation or initiation even though neither EF-Hand can form polymers themselves. In addition EH-Hand motif 2 appears to be important for the type of helical polymer formed, and if not bound to calcium it induces only helical polymer formation. If these data are correct it would imply that there must be some interplay between these two domains in order to control polymer and possibly FPC shape and form *in vivo*. One extreme but interesting hypothetical interpretation of this would be that interplay is important during the parasite cell cycle, whereby an annular FPC is required for the single FPC and flagellum of G1 cells, whilst an elliptical FPC is required during emergence of the new flagellum from the FP during S/G2 phase.

Primary, motile cilia and differentiating spermatids have a ciliary pocket (CP) [21,22,23,24]. The CP is a depression or invagination of the plasma membrane and has been shown to be physically associated with clathrin coated, endocytotic vesicles [21,22]. The CP shares a conspicuously similar structure to the FP, even though BILBO1 is unique to the kinetoplastids, but surprisingly it is not known if the equivalent of the FPC - the CP collar (CPC), actually exists. Therefore it is unknown if the CP indeed requires a BILBO1-like protein or if the CP is constructed differently to the FP.

Some clues about primary cilia and CP biogenesis have however come from studies on septin. To date members of the septin family are the only axonemal cytoskeletal proteins that have been described to self assemble into annuli *in vivo* and *in vitro* [2,25,26,27]. Interestingly human septins 2, has also been reported to form an annulus around the base of primary cilia, and is part of a diffusion barrier that retains the receptor-signaling pathways in the primary cilium [28]. SiRNA knock down of Septin 2 resulted in loss of ciliary membrane protein localization and Sonic hedgehog signal transduction, but most interestingly it resulted in inhibition of ciliogenesis [9]. CP formation was not investigated in detail in the report, as it was not the main focus of the study. Nevertheless the inhibition of cilia biogenesis is an important clue in demonstrating that loss of Septin 2 induces constraints in CP cytoskeleton formation.

We show that after BILBO1 RNAi knockdown the flagellum specific protein calflagin was not trafficked to the new flagellum, which suggests that either the FP or the FPC are important in targeting to and/or retention of calflagin within the flagellum. Our unpublished results indicate that at least seven non-BILBO1 related proteins are associated with the FPC, which implies that the FPC has more than a simple architectural function. We suggest that the FPC is a diffusion barrier. We hypothesize that once membrane proteins dock with the FP they are modified on, or in, the FPC, they then pass through the FPC onto the flagellum surface. The FPC then functions as a one-way diffusion barrier that does not allow or strongly restrict functional membrane proteins to diffuse onto the cell surface or back into the FP. We hypothesize that BILBO1 assumes the multiple roles of septins in trypanosomes and conceptually the FPC functions as a flagellar diffusion barrier.

Mutations that cause modifications in the diffusion barrier or primary cilia cytoskeleton maybe important aspects of human disease because defective primary cilia induce numerous ciliopathies

including polycystic kidney disease and a variety of other illnesses [28,29,30,31,32]. Thus a thorough understanding of how the FP and CP are formed would provide important insights into parasite biology and cilia disorders.

The properties of BILBO1 have facilitated our understanding of how the FP is constructed and identification and characterization of additional FPC proteins will be an important step in characterizing how the FPC and possibly the CP is organized and maintained. Our findings provide valuable points in identifying how the FPC is formed. We anticipate that this data will be useful in the identification of additional FPC and annulus forming proteins that may be important for flagellar and cilia related organelles such as the primary cilia pocket (CP) [22].

## Materials and Methods

### *Cell lines, cell culture and cell transfection*

U-2 OS cells (human bone osteosarcoma epithelial cells, ATCC® Number: HTB-96 (ref is Heldin CH, et al. (1986) Nature 319: 511-514) were grown in D-MEM Glutamax (Gibco) supplemented with final concentrations of 10% fetal calf serum (Invitrogen), 100 units.mL<sup>-1</sup> of Penicillin (Invitrogen), and 100 µg.mL<sup>-1</sup> of Streptomycin (Invitrogen) at 37°C plus 5% CO<sub>2</sub>. Exponentially growing U-2 OS cells were lipotransfected with 0.5-2 µg DNA using Lipofectamine 2000 in OPTIMEM (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and processed for IF 6 to 24 h post-transfection.

The *BILBO1* ORF and truncations were amplified by PCR from *T. brucei* TREU927/4 GUTat10.1 genomic DNA (Hall N, et al. (2003) Nucleic Acids Res 31: 4864-4873)

The work described in this study uses the parental procyclic form (PCF) *T. brucei* 427 29-13 cell-line, co-expressing the T7 RNA polymerase and a tetracycline repressor, named in this study as wild-type (WT) [Wirtz, 1999 #277]. *T. brucei* 427 29-13 cells were transfected with NotI linearized plasmids as in [Pradel, 2006 #218] and cloned. Over-expression of recombinant proteins or *BILBO1* RNAi was induced with 1 µg.mL<sup>-1</sup> tetracycline.

### *Vectors*

#### *Mammalian expression vectors*

The *BILBO1* ORF and truncations were cloned into the pcDNA3 or pcDNA3.1 CT-GFP TOPO mammalian (Invitrogen). Mutations of the EF-Hand motif 1 (D194A (GAT/GcT); N198A (AAC/gcC); D202A (GAC/GcC); D205A (GAC/GcC)), the EF-Hand motif 2 (D230A (GAC/GcC); N232A (AAC/gcC); E241A (GAA/GcA)), and the serine 163 mutations (S163D

(TCG/gat) and S163A (TCG/gCG) were done by site-directed mutagenesis following the instructions from the Agilent QuickChange Site-directed Mutagenesis kit.

#### *Trypanosome expression vector*

The pLew100GFPx has been modified in the laboratory from pLew100xGFP (Dacheux et al 2012). BILBO1 and truncations 1, 2 and 3 were cloned into pLew100GFPx between the *XhoI-XbaI* sites.

#### *Yeast Two-Hybrid vectors*

Open reading frames were amplified by PCR from *T. brucei* PCF genomic DNA and cloned in the prey (pGADT7-AD, Clontech) and bait (pGBKT7, Clontech) vectors between the *EcoRI-BamHI* sites. The sequences of the primers used in this work are provided in supplementary data table S1. All DNA sequences were checked by DNA sequencing.

### ***Fluorescence, Immunofluorescence***

#### *In the trypanosome cells*

For cytoskeleton preparations, cells were extracted with 0.25% NP40 in Pipes buffer (100 mM Pipes pH6.9, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) for 5 minutes then washed twice in Pipes buffer. Cells or cytoskeletons were fixed in -20°C methanol or 3% paraformaldehyde (PFA). After PFA fixation, cells were neutralized 10 min in glycine (100 mM in PBS). After 3 washes in PBS, samples were incubated with the primary antibodies for 1h at room temperature in a moist chamber: anti-*TbSAXO*, an axonemal protein (mAb25, Dacheux et al, 2012), anti-calflagin (mouse monoclonal, neat), anti-living color GFP (rabbit polyclonal, Clontech #632460, 1:1000 dilution). After two PBS washes, cells were incubated for 1 hour with the secondary antibodies anti-mouse-IgG (H+L) conjugated to Alexa 594 (Molecular Probes A21201) (1:400 dilution) or FITC (Sigma F-2012) (1:100 dilution), anti-rabbit IgG  $\gamma$ -specific from goat conjugated to FITC (Jackson ImmunoResearch, 1:100

dilution). Expression of recombinant proteins or BILBO1 RNAi were induced with  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of tetracycline as in Bonhivers et al 2008 plos biol.

*In the U-2 OS cells.* For observation of whole cells, cells grown on coverslips were fixed in paraformaldehyde 3% in PBS for 10 minutes (at RT or at  $37^{\circ}\text{C}$ ). To remove soluble proteins, cells were briefly extracted for 2 min with 30  $\mu\text{l}$  of EMT, TX-100 0.5%, glycerol 10% then fixed in paraformaldehyde (at  $37^{\circ}\text{C}$ , 15 min). After fixation, cells were neutralized 10 min in glycine (100 mM in PBS). After two washes in PBS, cells were incubated in permeabilization buffer PB (PBS, 10% fetal calf serum, 0.1% saponin) for 10 minutes. Primary antibodies anti-BILBO1 (mouse monoclonal 5F2B3 [Bonhivers, 2008 #35], 1:10 dilution), anti-NTD BILBO1 (rabbit polyclonal, 1:50 dilution, Esson, H. J., Morriswood, B., Yavuz, S., Vidilaseris, K., Dong, G. and Warren, G. (2012). Eukaryot Cell.), anti-tubulin TAT1 (1:100 dilution, Woods A, et al. J Cell Sci 1989; 93 491-500.), anti-calnexin (rabbit polyclonal, 1:500 dilution), anti-giantin (rabbit polyclonal, 1:750 dilution), anti-Vimentin V9 (Interchim NB200-622, 1:250 dilution) were added for 1 hour in a dark moist chamber. After two PBS washes, cells were incubated for 1 hour with the secondary antibodies anti-mouse-IgG (H+L) conjugated to Alexa 594 (Molecular Probes A21201, 1:400 dilution) or FITC (Sigma F-2012, 1:100-1:400 dilution), anti-rabbit-IgG conjugated to Texas-Red (Molecular Probes T-6391, 1:400 dilution) or to FITC (Sigma F-9887, 1:100-1:400 dilution). For the F-actin labeling, Texas-red conjugated phalloidin (Molecular Probes A12380, 1:160 dilution) was incubated with the secondary antibody. The nuclei were stained with DAPI ( $0.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in PBS for 5 minutes) and cells were washed and mounted as described above. Images were acquired on a Zeiss Axioplan2 or a Zeiss Imager Z1 microscope, using a Photometrics Coolsnap HQ2 camera, at 100X or 63X (NA 1.4) with Metamorph® software (Molecular Devices), and processed with ImageJ.

### ***Yeast Two-hybrid interaction assays***

The plasmids pGADT7-AD and pGBKT7 based plasmid constructs were transformed in the yeast cell lines Y187 and Y2HGold respectively. After production of diploids cells, interaction tests were

done using the drop test technique according to the manufacturer's instructions (Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System, Clontech). Haploid and diploid strains were grown in SC medium (YNB (w/o ammonium sulfate 1.7 g.L<sup>-1</sup> (BD, #233520), Ammonium sulfate 5 g.L<sup>-1</sup> (Euromedex, #2019), CSM (-Leu, -His, -Trp, -Ade, -Ura) 0.59 g.L<sup>-1</sup> (MP, #4550-122), Dextrose (D-+-Glucose) 0.59 g.L<sup>-1</sup> (Euromedex, #UG3050), Uracil (0.02 g.L<sup>-1</sup>) and complemented with Leucine (1 g.L<sup>-1</sup>), Tryptophan (0.05 g.L<sup>-1</sup>), Histidine (0.02 g.L<sup>-1</sup>), or Adenine (0.04 g.L<sup>-1</sup>) as required. Absence of auto-activation for each pGBKT7 construct was tested on SC-Tryptophan-Histidine medium. Absence of toxicity for each pGADT7-AD and pGBKT7 construct was tested on SC-Leucine and SC-Tryptophan respectively. Diploid yeasts were selected on SC-Leucine-Tryptophan medium (SC-L-W). Interaction tests were done on SC-L-W-Histidine, SC-L-W+ aureobasidine-A (12.5 µg.mL<sup>-1</sup>), SC-L-W-Adenine and SC-L-W + the chromogenic substrate X-α-Gal (40µg.mL<sup>-1</sup>) media.

### ***Bioinformatics***

The two EF-Hand motifs (EF1: aa. 185-213 and EF2: aa. 221-249) were predicted by InterProScan and Smart softwares, and the coiled-coil domain by InterProScan (aa. 266-563) and Parcoil2 (aa. 264-533) softwares.

## **Acknowledgements**

We thank K. Gull for the anti-tubulin TAT1 antibody, G. Dong for the anti-NTD BILBO1, E. Chevet for the anti-Giantin and anti-calnexin antibodies, T. Baltz for the anti-calflagin antibody, the Bikfalvi lab - INSERM U1029 (F. Soulet) for the anti-Vimentin antibody, G. Cross for the *T. brucei* parental cell lines and pLew100 vector. Author contributions; CF and AS performed the yeast two-hybrid studies. MB, CF, NL, DDD, and EHB made the BILBO1 truncation/mutation plasmids, cell transfection and analysis. MB, EHB, NL, CF and DDD performed the IF studies. MB, EHB and DRR conceived the experimental plans and theoretical hypothesis and wrote the manuscript.

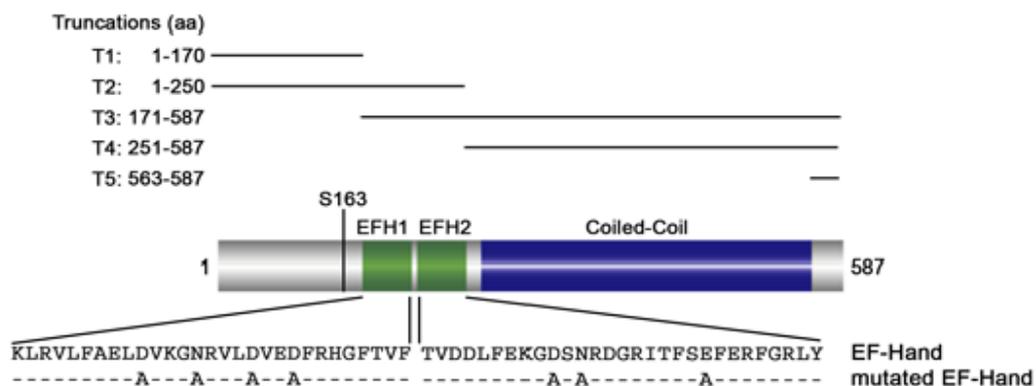
## **Financial Disclosure**

This work was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), (ANR-09-BLAN-0074), Région Martinique and preciput ANR University of Bordeaux.

## **Competing interests**

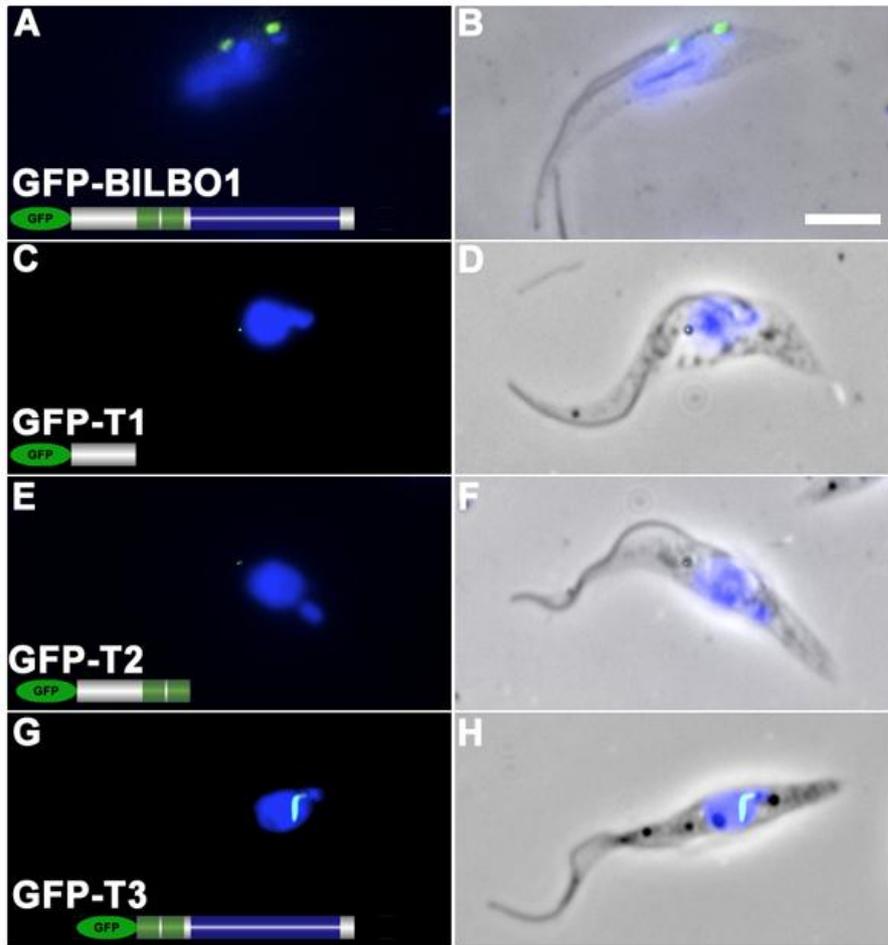
The authors have declared that no competing interests exist.

## Figure legends



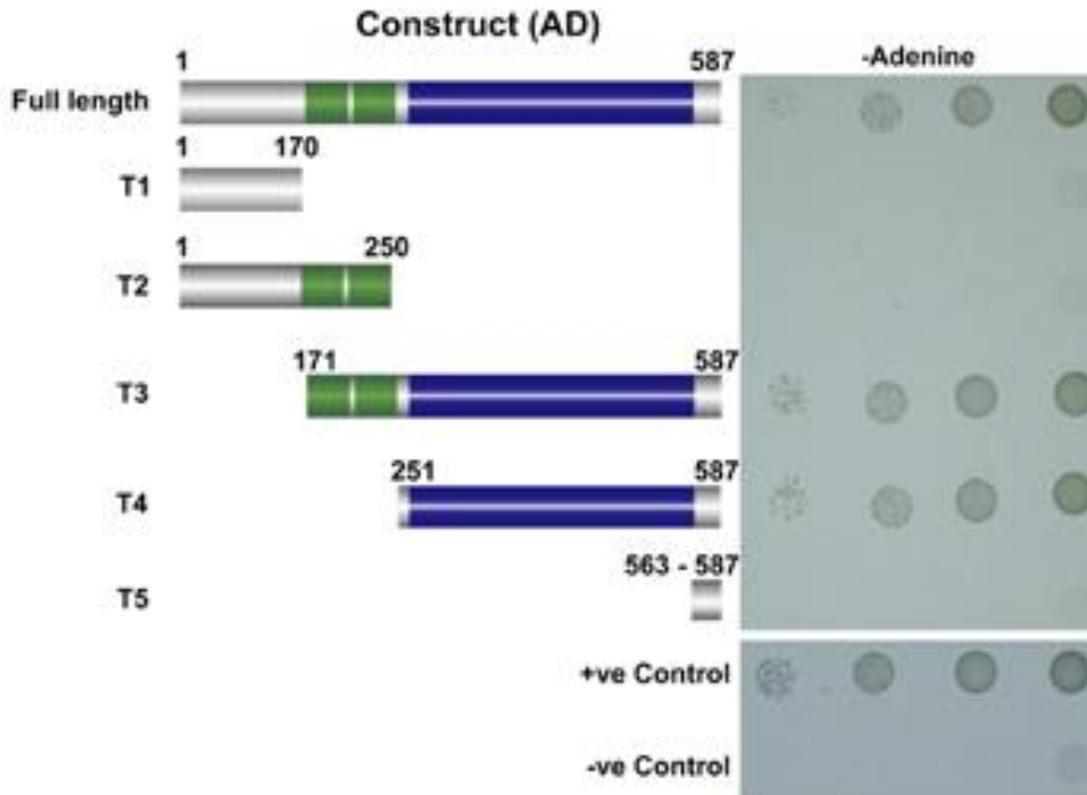
**Figure 1. Scheme primary sequence BILBO1**

BILBO1 has two predicted EF-Hand calcium-binding motifs and a long domain predicted as coiled-coil. Serine 163 is phosphorylated in vivo. In this work, several truncations have been made (truncations in aa) and the EF-Hand motifs have been mutated by site-directed mutagenesis as indicated.



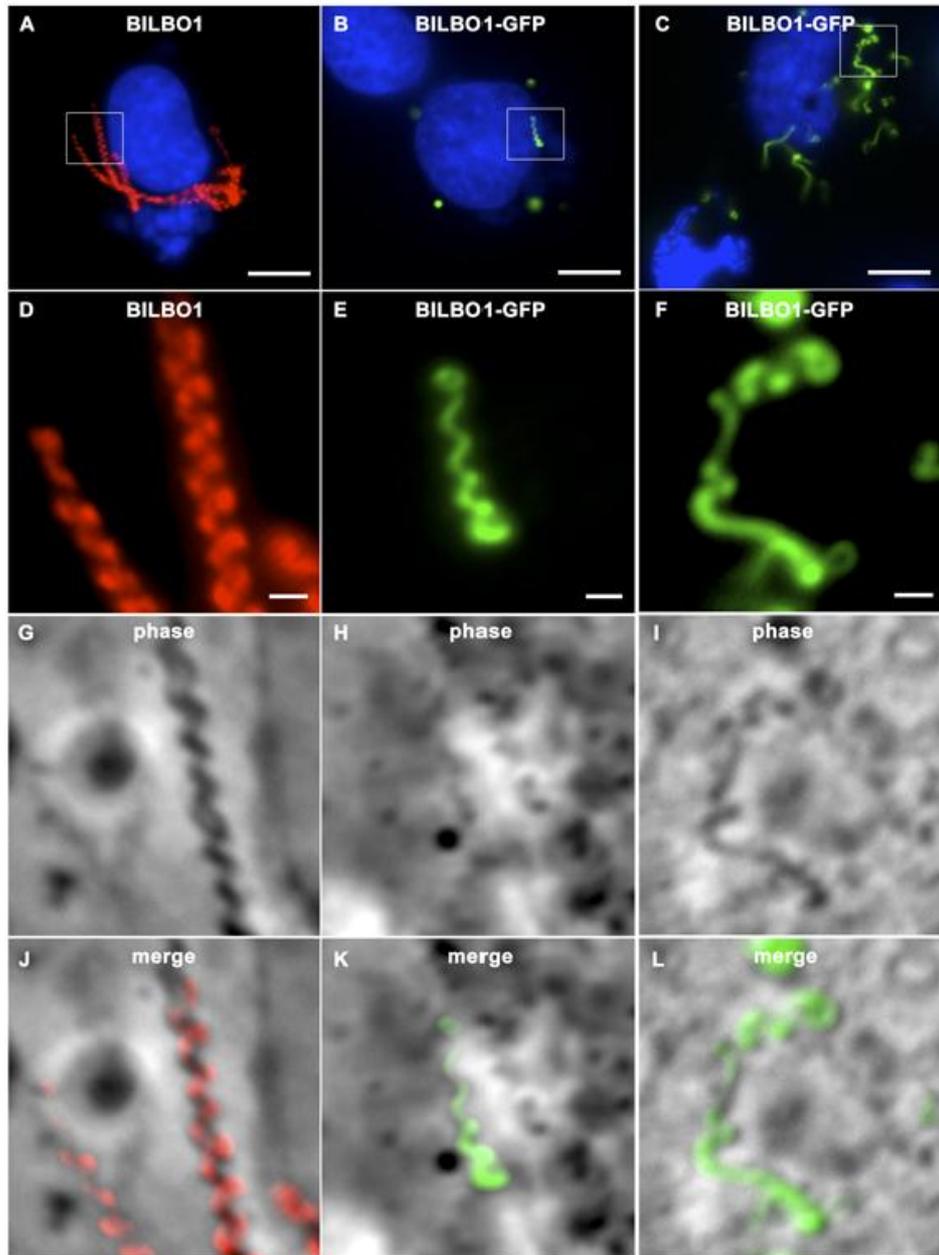
**Figure 2. The coiled-coil domain is required for BILBO1 polymerization in *T. brucei*.**

Fluorescence images of detergent extracted PCF cytoskeletons expressing GFP-tagged BILBO1 domains. (A-B) A cytoskeleton derived from a cell expressing full-length GFP-BILBO1 that localizes to the FPC. (C-D) A cytoskeleton derived from a cell expressing GFP-T1. (E-F) A cytoskeleton derived from a cell expressing GFP-T2. (G-H). A cytoskeleton derived from a cell expressing GFP T3, which localizes at the FPC but forms an abnormal polymer shape. Note that in C-E the expressed proteins were cytoplasmic and were removed during extraction and are thus not associated with the cytoskeleton. Scale bar = 5 $\mu$ m.



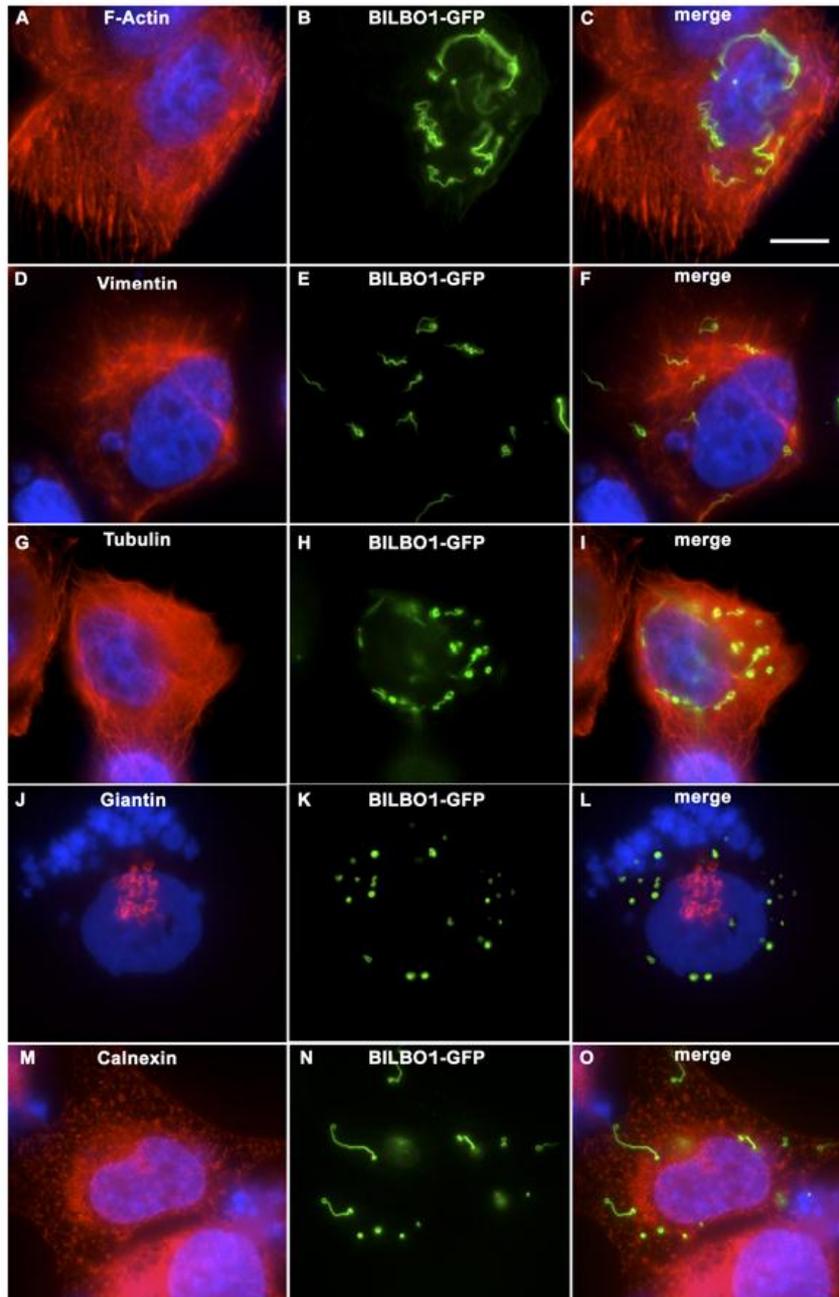
**Figure 3. Analysis of BILBO1-BILBO1 interaction domains using a yeast two-hybrid system**

Bait (BILBO1 full-length = BD) and preys (construct = AD) interactions were tested by drop tests on - adenine selective medium. BILBO1 interacts with itself, whilst truncations T1, T2, and T5 did not interact with full-length BILBO1. T3 and T4 protein interactions were positive, confirming the *T. brucei in vivo* GFP tagging results, and demonstrate that the coiled-coil domain is required for polymerization.



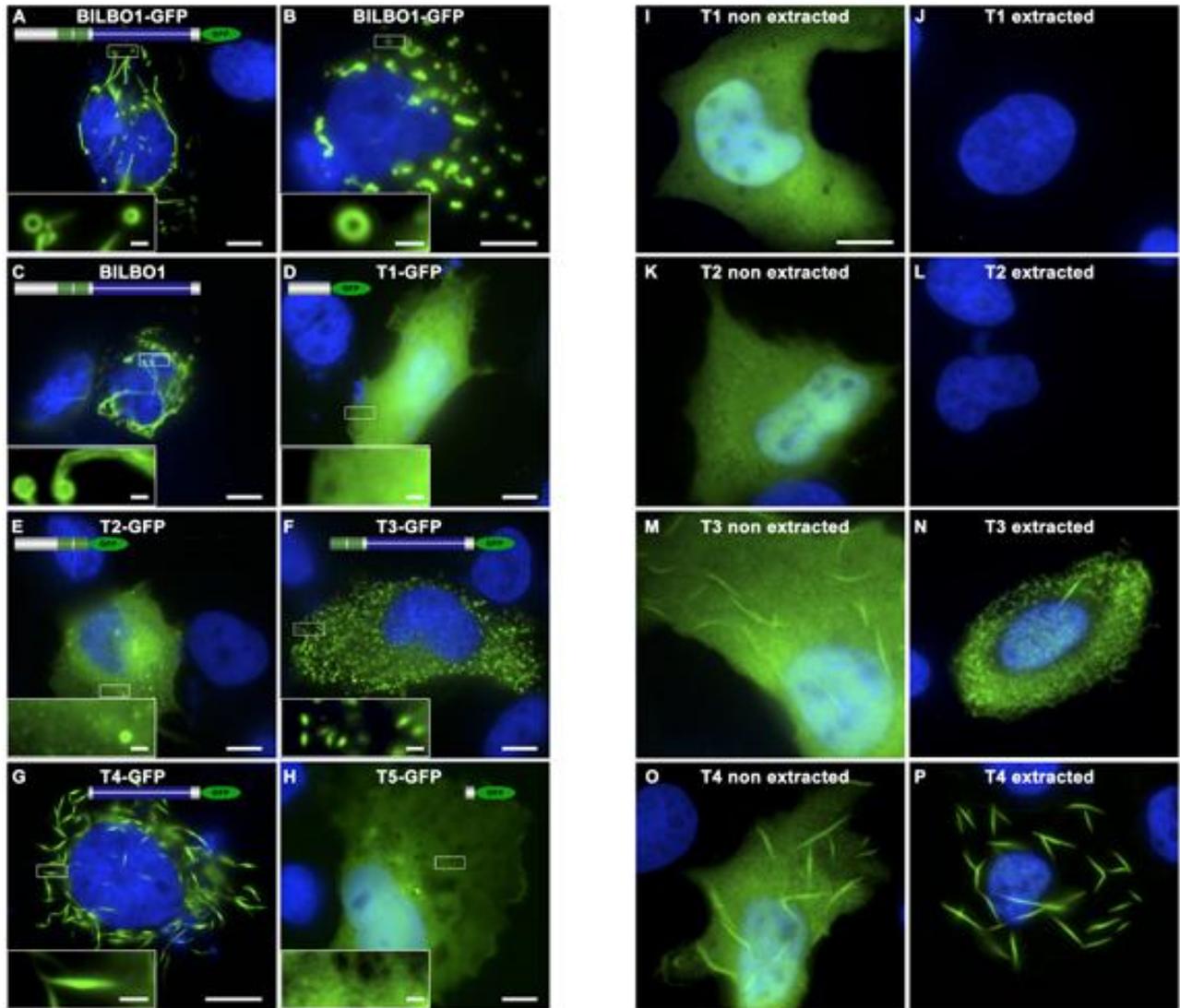
**Figure 4. BILBO1 forms polymers in a heterologous system**

Heterologous expression of BILBO1, or BILBO1-GFP, in U-2 OS cells demonstrate that BILBO1 has self-polymerizing properties. BILBO1 full-length protein was immuno-labelled with anti-BILBO1 monoclonal antibody (panels A, D, G). BILBO1-GFP expression was observed by direct GFP fluorescence. Phase contrast-fluorescence merged images illustrate the structures formed. The pitch of the helices in BILBO1 and BILBO1-GFP is  $\approx 1 \mu\text{m}$  and diameter is  $\approx 800 \text{ nm}$ . Scale bars in A, B represent  $10 \mu\text{m}$ ; scale bars in D-E-F represent  $1 \mu\text{m}$ .



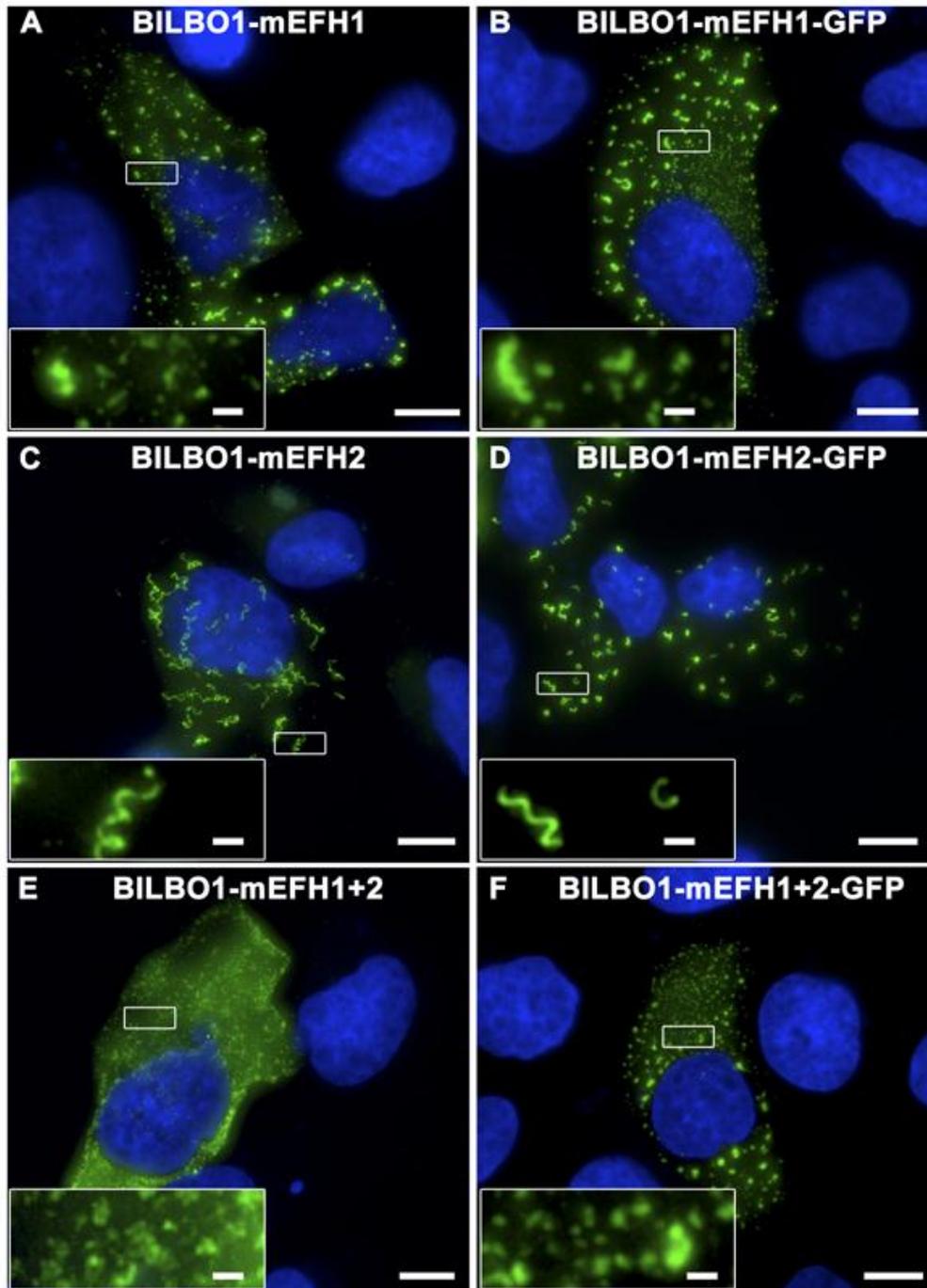
**Figure 5. The helices and annuli formed by BILBO1 are independent of the Golgi, ER, or the tubulin-actin cytoskeleton**

U-2 OS cells expressing BILBO1-GFP for 24H were probed or immuno-labeled with cellular markers. F-Actin was probed with Texas red-coupled phalloidin (A-C), Intermediate filaments were labeled with anti-vimentin (D-F), microtubules were labeled with anti-tubulin (G-I), the Golgi apparatus was labeled with anti-giantin (J-L), and the endoplasmic reticulum was labeled with anti-calnexin (M-O). Scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ . No co-localization of BILBO1-GFP with any of these structures was observed.



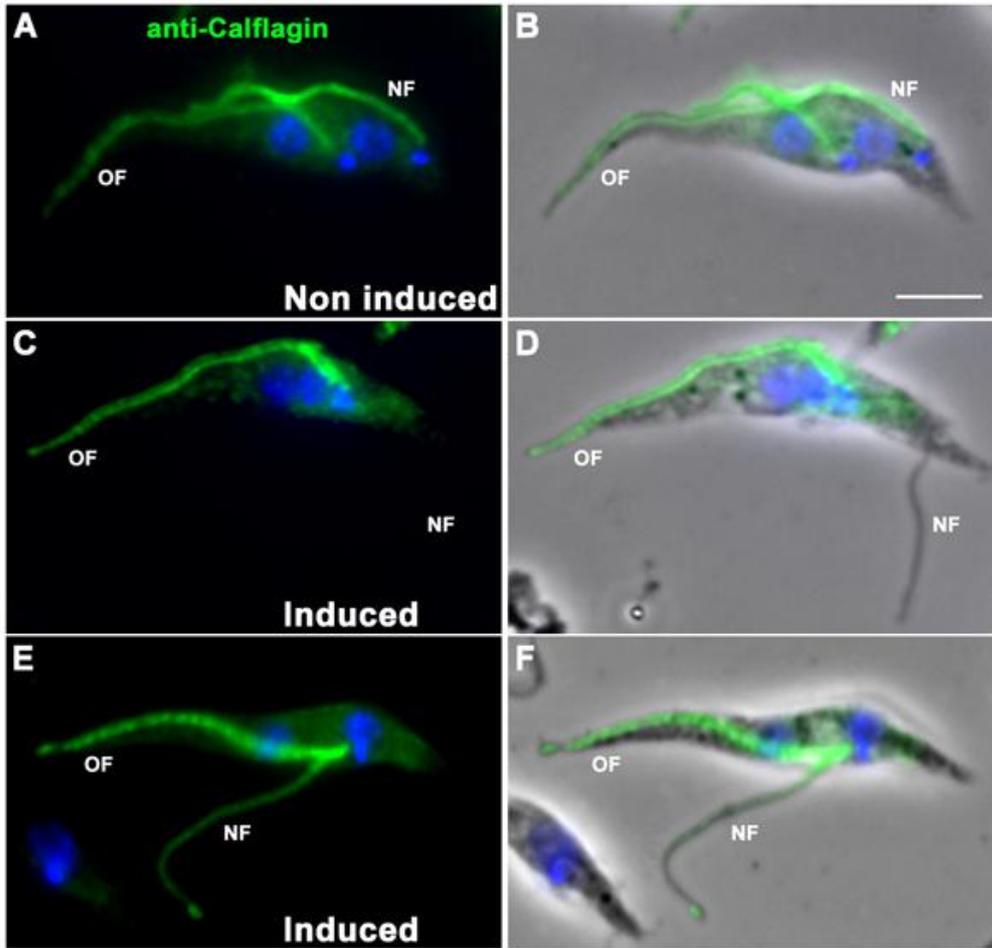
**Figure 6. The coiled-coil domain is required for polymerization**

BILBO1-GFP and truncated domains expressed in U-2OS cells. **Left panel:** Full-length BILBO1-GFP (A and B), un-tagged BILBO1 labeled with anti-BILBO1 monoclonal antibody (C), truncation T1-GFP (D), truncation T2-GFP (E), truncation T3-GFP (F), truncation T4 (G), truncation T5 (H). **Right panel:** cells expressing un-tagged truncated proteins were either immunolabeled after fixation (I, K, M, O), or extracted before fixation and immunolabeled (J, L, N, P). T1 and T2 proteins were immunolabeled with the anti-NTD antibody; T3 and T4 were immunolabeled with the anti-BILBO1 monoclonal antibody. GFP-tagged BILBO1 supports the abundant formation of annuli, which maintain a diameter of  $\sim 800\text{nm}$ . These data suggest that BILBO1 has intrinsic polymer, annuli, and helical polymer forming properties. Note: truncated proteins were expressed for 6H post-transfection, except for T1 and T1-GFP, which were expressed for 24H. Scale bars represent  $10\ \mu\text{m}$ , scale bars in magnified insets represent  $1\ \mu\text{m}$ .



**Figure 7. The EF-Hand motifs play a role in the polymerization properties of BILBO1**

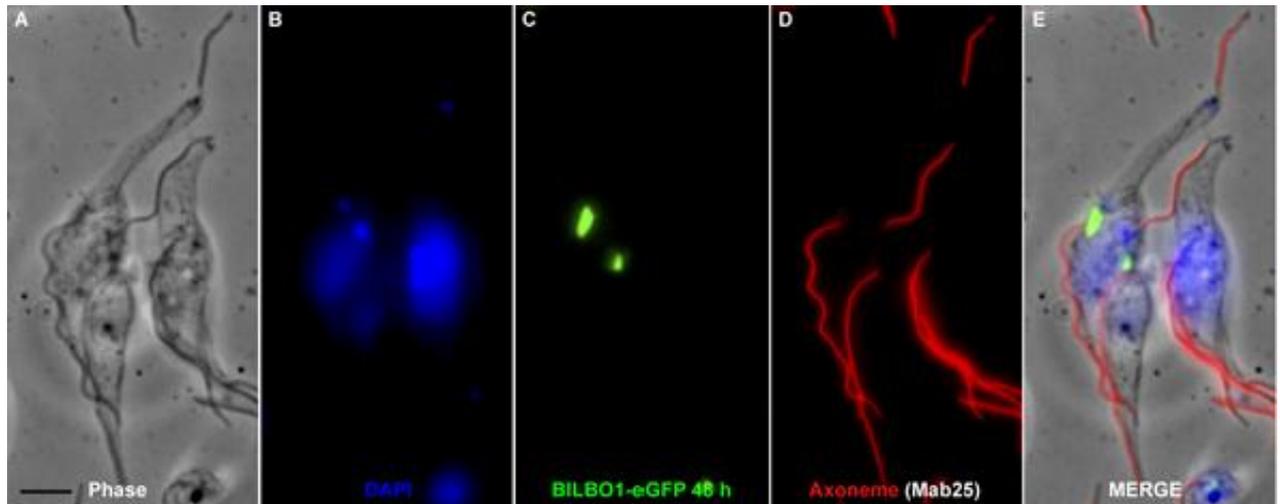
Mutation of EF-Hand motif 1 (mEFH1), EF-Hand motif 2 (mEFH2) and both motifs (mEFH1+2) by site-directed mutagenesis. Constructs were probed with anti-BILBO1 antibody (anti-NTD) in A, C, and E. Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$ , scale bars in magnified insets represent 1  $\mu\text{m}$ .



**Figure 8. BILBO1 RNAi knockdown prevents the targeting of the flagellar membrane protein calflagin to the new flagellum**

(A) A *BILBO1<sup>RNAi</sup>* non-induced dividing cell probed with anti-calflagin. Both the old flagellum (OF) and the new flagellum (NF) are labelled, indicating that the FP/FPC complex may function as a diffusion barrier. (B) Phase contrast merged image of (A). (C) A *BILBO1<sup>RNAi</sup>* induced cell probed with anti-calflagin after 36H of BILBO1 RNAi induction. A calflagin signal is observed only on the old flagellum, but not on the detached new flagellum, indicating that loss of the FP/FPC complex prevents targeting to the flagellum membrane. (D) Phase contrast merged image of (C). (E) A *BILBO1<sup>RNAi</sup>* induced dividing cell probed with anti-calflagin after 36H of BILBO1 RNAi induction. A major calflagin signal is observed on both the old and the new flagella flagellum emerging from the same flagellar pocket. (F) Phase contrast merged image of (E). Scale bar represents 5  $\mu$ m.

## Supporting Information



**Figure S1. Over expression of eGFP-BILBO1 in *T. brucei* is lethal**

Immuno-fluorescence micrographs of GFP-tagged BILBO1 expressed in *T. brucei* PCF for 48H. Induction of GFP-tagged BILBO1 produced RNAi-like phenotypes where cells are; arrested, do not construct a new FP, have detached flagella, and have elongated posterior ends. Note that the GFP signal indicates that the protein forms a large globular structure around the mother FPC, but no signal is observed on, or near, the new flagellum indicating that FPC division and new FPC biogenesis did not occur. Scale bar = 5 μm.

## References

1. Field MC, Carrington M (2009) The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol* 7: 775-786.
2. Kinoshita M, Field CM, Coughlin ML, Straight AF, Mitchison TJ (2002) Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell* 3: 791-802.
3. Bonhivers M, Nowacki S, Landrein N, Robinson DR (2008) Biogenesis of the Trypanosome Endo-exocytotic Organelle is Cytoskeleton Mediated. *PLoS Biology*.
4. Lacomble S, Vaughan S, Gadelha C, Morphew MK, Shaw MK, et al. (2009) Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. *J Cell Sci* 122: 1081-1090.
5. Satir P, Christensen ST (2007) Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69: 377-400.
6. Praetorius HA, Spring KR (2005) A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol* 67: 515-529.
7. Esson HJ, Morriswood B, Yavuz S, Vidilaseris K, Dong G, et al. (2012) Morphology of the trypanosome bilobe, a novel cytoskeletal structure. *Eukaryot Cell* 11: 761-772.
8. Bonhivers M, Nowacki S, Landrein N, Robinson DR (2008) Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. *PLoS Biol* 6: e105.
9. Hu Q, Milenkovic L, Jin H, Scott MP, Nachury MV, et al. (2010) A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium Maintains Ciliary Membrane Protein Distribution. *Science*.
10. Jain RK, Joyce PB, Molinete M, Halban PA, Gorr SU (2001) Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells. *Biochem J* 360: 645-649.
11. Marchini FK, de Godoy LM, Rampazzo RC, Pavoni DP, Probst CM, et al. (2011) Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. *PLoS One* 6: e25381.
12. Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* 405: 199-221.
13. Zhou Y, Yang W, Kirberger M, Lee HW, Ayalasomayajula G, et al. (2006) Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins. *Proteins* 65: 643-655.
14. Yap KL, Ames JB, Swindells MB, Ikura M (1999) Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins* 37: 499-507.
15. Kissel H, Georgescu MM, Larisch S, Manova K, Hunnicutt GR, et al. (2005) The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Dev Cell* 8: 353-364.
16. Takizawa PA, DeRisi JL, Wilhelm JE, Vale RD (2000) Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* 290: 341-344.
17. Wu Y, Deford J, Benjamin R, Lee MG, Ruben L (1994) The gene family of EF-hand calcium-binding proteins from the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 304 ( Pt 3): 833-841.

18. Emmer BT, Daniels MD, Taylor JM, Epting CL, Engman DM (2010) Calflagin inhibition prolongs host survival and suppresses parasitemia in *Trypanosoma brucei* infection. *Eukaryot Cell* 9: 934-942.
19. Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312: 217-224.
20. Ding DQ, Tomita Y, Yamamoto A, Chikashige Y, Haraguchi T, et al. (2000) Large-scale screening of intracellular protein localization in living fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. *Genes Cells* 5: 169-190.
21. Ghossoub R, Molla-Herman A, Bastin P, Benmerah A (2011) The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biol Cell* 103: 131-144.
22. Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, Meunier A, Serres C, et al. (2010) The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci* 123: 1785-1795.
23. Fawcett KJ, Eckstein EG, Innella F, Yokoyama M (1970) Four examples of Bhm blood in one family. *Vox Sang* 19: 457-467.
24. Rohatgi R, Snell WJ (2010) The ciliary membrane. *Curr Opin Cell Biol* 22: 541-546.
25. Yu WB, Jiang SM, Yu L (2008) [Research progresses on septin family]. *Yi Chuan* 30: 1097-1107.
26. Mostowy S, Cossart P (2012) Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 183-194.
27. Kim MS, Froese CD, Estey MP, Trimble WS (2011) SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J Cell Biol* 195: 815-826.
28. Chih B, Liu P, Chinn Y, Chalouni C, Komuves LG, et al. (2012) A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nat Cell Biol* 14: 61-72.
29. Veland IR, Awan A, Pedersen LB, Yoder BK, Christensen ST (2009) Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol* 111: p39-53.
30. Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seeley ES, Rosenbaum JL, et al. (2000) *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 151: 709-718.
31. Hu Q, Nelson WJ (2011) Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskeleton (Hoboken)* 68: 313-324.
32. Vincensini L, Blisnick T, Bastin P (2011) 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biol Cell* 103: 109-130.

## Annexe 2

BILBO1	pcDNA3	pcDNA3.1 CT-GFP TOPO	plew100GFPx
Forme entiere BILBO1	5:GGTCGCaagctAATGGCGTTTCTCGTACAAAGTAGCA3' 5:GGCCGctclagatTTAATCTCGCGGATAGGACCCTC3'	5:GGTCGCaagctAATGGCGTTTCTCGTACAAAGTAGCA3' 5:CTCGCGGATAGGACCCTCCCAACCGT3'	5:AGGACctclagatAGCGGTTTCTCGTACAAAGTAGCA3' 5:GGCCGctclagatTTAATCTCGCGGATAGGACCCTC3'
T1 (aa 1-170)	5:CTGGAATTCATGGCGTTTCTCGTACAAAGTA3' 5:GTGGGATCCTCAATTTGAGGTACTCCCGTGGAA3'	5:CTGGAATTCATGGCGTTTCTCGTACAAAGTA3' 5:CAATTTGAGGTACTCCCGTGGAA3'	5:AGGACctclagatAGCGGTTTCTCGTACAAAGTAGCA3' 5:ATCCGTTclagatTTAATTTGAGGTACTCCCGTGG3'
T2 (aa 1-250)	5:CTGGAATTCATGGCGTTTCTCGTACAAAGTA3' 5:GTGGGATCCTCAATTTGAGGTACTCCCGTGGAA3'	5:CTGGAATTCATGGCGTTTCTCGTACAAAGTA3' 5:CTGGATAGAGCCGTCGGAACCCGC3'	5:AGGACctclagatAGCGGTTTCTCGTACAAAGTAGCA3' 5:ATCCGTTclagatTTGATAGAGCCCGTCCGAACCCGC3'
T3 (aa. 171-587)	5:GTGGAATTCATGGCGCTCGTGGCCGCTGCCAAG3' 5:CTGGGATCCTAATCTCGCCGGAATAGGACCCT3'	5:GTGGAATTCATGGCGCTCGTGGCCGCTGCCAAG3' 5:CTCGCCGATAGGACCCTCCCAACCGT3'	5:GTACcctclagatAGCGCTCGTGGCCGCTGCC3' 5:GGCCGctclagatTTAATCTCGCCGATAGGACCCTC3'
T4 (aa. 251-587)	5:GTGGAATTCATGATGATGACCGGATTTGCCCTAT3' 5:CTGGGATCCTAATCTCGCCGGAATAGGACCCT3'	5:GTGGAATTCATGATGATGACCGGATTTGCCCTAT3' 5:CTCGCCGATAGGACCCTCCCAACCGT3'	
T5 (aa. 563-587)	5:GTGGAATTCATGATGATGACCGGATTTGCCCTAT3' 5:CTGGGATCCTAATCTCGCCGGAATAGGACCCT3'	5:GTGGAATTCATGATGATGACCGGATTTGCCCTAT3' 5:CTCGCCGATAGGACCCTCCCAACCGT3'	
<b>Mutations</b>	<b>pcDNA3 / pcDNA3.1 CT-GFP TOPO</b>		
Mutation EF- Hand1	Sens1 GGTAACCCGTGTGCTCGCCGTTGAGGcCTTCCGACACCGG Antisens1 GTGAACCCGTGTCGGAAGgCCTCAACGgCGAGCACACCGG Sens2 GCTATTCCGGAACTCGcGTAAAGGGTgcCCGTGTGCTCG Antisens 2 CGTCGAGCACACGGgCACCCCTTACAGcGAGTTCCGC		
Mutation EF- Hand2	Sens 1 CTCCTTTGAAAAAGGgTGcCAGCgCCCGGGAGCGGGCG Antisens 1 GGTAAATCCGCCCGTCCCGGgCGTgCACCCTTTTCAAAAG Sens 2 GGCCGATTACCTTTTCAAGcATTGAGCGGGTTCCG Antisens 2 CGTCCGAACCCGCTCAAAATgCTGAAAAAGGTAAATCC		

Liste des amorces utilisées pour cloner les différentes tronctions de BILBO1 ou mutations des domaines EF-Hand dans les vecteurs pcDNA3.1, pcDNA CT-GFP TOPO et plew100GFPx.

<b>Troncations</b>	<b>pgADT7-AD / pGBKT7</b>
BILBO1	5'CTGTGAATTCATGGCGTTTCTCGTACAAGTA3' 5'CTGTGGATCCTTAATCTCGCGGATAGGACCCT3'
T1 (aa 1-170)	5'CTGTGAATTCATGGCGTTTCTCGTACAAGTA3' 5'GTGGATCCCTCAATTTGAGGTACTCCCGTGGAA3'
T2 (aa 1-250)	5'CTGTGAATTCATGGCGTTTCTCGTACAAGTA3' 5'GTGGATCCCTCATGGATAGAGCCGTCGAAACCG3'
T3 (aa. 171-587)	5'GTGGAATTCATGGCGCTCGTGCCCGTGCCCAG3' 5'CTGTGGATCCTTAATCTCGCGGATAGGACCCT3'
T4 (aa. 251-587)	5'GTGGAATTCATGATCATGACGGATTGCCCTAT3' 5'CTGTGGATCCTTAATCTCGCGGATAGGACCCT3'
T5 (aa. 563-587)	5'GTGGAATTCATGTCAGAAGCCAGCAGCCTT3' 5'CTGTGGATCCTTAATCTCGCGGATAGGACCCT3'
T6 (aa. 194-520)	5'GTGGAATTCATGGTAAAGGGTAACCGTGTGCTC3' 5'GTGGATCCCTCAAAAGCCTTACGGCGTGTTCCT3'
T7 (aa. 225-499)	5'GTGGAATTCATGTTGAAAAGGGTGAACAGCAAC3' 5'GTGGATCCCTCACACATGCATCATACCTCTCGC3'
T8 (aa. 303-587)	5'GTGGAATTCATGGCTAAGGATGCCGTCGCAACT3' 5'CTGTGGATCCTTAATCTCGCGGATAGGACCCT3'
T9 (aa. 330-587)	5'GTGGAATTCATGAACGGCAAAAGCCGAGAGAGAG3' 5'CTGTGGATCCTTAATCTCGCGGATAGGACCCT3'
T10 (aa. 340-587)	5'GTGGAATTCATGATCCGCGGAGAAAGAGGATCGC3' 5'CTGTGGATCCTTAATCTCGCGGATAGGACCCT3'
T11 (aa. 373-587)	5'GTGGAATTCATGCAGGACCCGACGGGGCTTTTCT3' 5'CTGTGGATCCTTAATCTCGCGGATAGGACCCT3'
T12 (aa. 381-587)	5'GTGGAATTCATGGCTGGGGAAAGCGAGTGTGCCC3' 5'CTGTGGATCCTTAATCTCGCGGATAGGACCCT3'
T13 (aa. 381-499)	5'GTGGAATTCATGGCTGGGGAAAGCGAGTGTGCCC3' 5'GTGGATCCCTCACACATGCATCATACCTCTCGC3'

Liste des amorces utilisées pour cloner les différentes tronctions de BILBO 1 dans les vecteurs pgADT7-AD and pGBKT7.

<b>FPC2</b>	<b>plew100-xGFP</b>	<b>pgADT7-AD / pGBKT7</b>
Forme entière	5'AGAAaagcttcattGCAGCCTTTGTTATAGTTG3' 5'GTTcctcgagAAcCTcCTTTCTGTAAT3'	5'CTGTGAATTCATGCAGCCTTTGTTATAGTTG3' 5'CTGTGATCCTCAACCCTCTTTCTGTAAT3'
aa 1-387	5'AGAAaagcttcattGCAGCCTTTGTTATAGTTG3' 5'GTTcctcgagATAAATCTCGGCTCGTCTCTG3'	
aa 388-508	5'GAAGTaagctHA TGTCcGTCAAGGACCCTGCAGCATTAACG3' 5'GTTcctcgagAAcCTcCTTTCTGTAAT3'	

Liste des amorces utilisées pour cloner FPC2 ainsi que ses tronçons dans les vecteurs plew100-xGFP, pgADT7-AD and pGBKT7.

<b>FPC4</b>	<b>pCDNA3</b>	<b>pCDNA3.1 CT-GFP TOPO</b>	<b>plew100GFPx</b>
Forme entière	5'GTTGggtaccTTATTTTATGAGTAACTCATC3' 5'GTTGtctagattATTTTATGAGTAACTCATC3'	5'AAcAgthaacATGAAAGAAAAAAGAGGTGAATTC3' 5'TTTTATGAGTAACTCATCGG3'	5'AAcAgthaacATGAAAGAAAAAAGAGGTGAATTC3' 5'GTTGtctagattATTTTATGAGTAACTCATC3'

<b>FPC4</b>	<b>pET28a(+)</b>	<b>plew100 / PHD1336 (stem-loop)</b>
Forme entière	5'GATCggtaccATGAAA GAAAAAAGAGG3' 5'GATCgctgacctTTTATGAGTAACTCATC3'	5'GCGGaaagctGGCAGTAGCAGCAACAACA3' 5'GTCCctcgaggCAATGTTAGAGCATCG3' 5'GTGCGggtaccGGCAGTAGCAGCAACAACA3' 5'AAGTctcggagCCACCTAGTACTGTTACTGAG3'

<b>FPC4</b>	<b>pgADT7-AD / pGBKT7</b>
Forme entière	5'GTTGggtccatgggtccatGAAA GAAAAAAGAGGTG3' 5'GTTGggtaccTTATTTTATGAGTAACTCATC3'
aa. 1-356	5'GTTGggtccatgggtccatGAAA GAAAAAAGAGGTG3' 5'CGTgggtaccTTAATAAACGCCATCGCCGAGGG3'
aa. 357-444	5'GTgggtccatgggtccatGTCA CAACCTCCCTCTGGTATG3' 5'GTTGggtaccTTATTTTATGAGTAACTCATC3'

Liste des amorces utilisées pour cloner FPC4 dans les vecteurs plew100GFPx, plew100, PHD1336, pCDNA3, pCDNA3.1 CT-GFP TOPO, pgADT7-AD and pGBKT7.

<b>FPC6</b>	<b>pcDNA3.1 CT-GFP TOPO</b>	<b>pLew100GFPx</b>	<b>pgADT7-AD / pGBKT7</b>
Forme entière	5' AGTaaacttATGGAATTGAAGGGCATG 3' 5' TCGATATCATGCTAAATAGTTC 3'	5'GGCAcatalatgATGGAATTGAAGGGCAATG 3' 5'CATAtctagatTCACGATATCATGCTAAATAG 3'	5'GGCAcatalatgATGGAATTGAAGGGCATG3' 5'TATTggccctccatggccTCACGATATCATGCTAAATAG3'

<b>FPC6</b>	<b>pET28a(+)</b>	<b>pLew100</b>
Forme entière	5'GGCAcatalatgATGGAATTGAAGGGCATG3' 5'CATAtctagatTCACGATATCATGCTAAATAG 3'	5'TGA GAA GCT TCA ACAAGC GAC TTG GAC TC3' 5'CATAtctagatTCACGATATCATGCTAAATAG 3' 5'TGA GGG ATC CCA ACAAGC GAC TTG GAC TC.3' 5'CGA GTC TAG ACG TGCAAA GTT TTT CGC CG 3'

Liste des amorces utilisées pour cloner FPC6 dans les vecteurs pLew100GFPx, pLew100, pcDNA3.1 CT-GFP TOPO, pgADT7-AD and pGBKT7.

