



HAL
open science

Squelette membranaire chez *Paramecium tetraurelia* : caractérisation d'une nouvelle famille multigénique et analyse par les approches GFP et RNAi

Sébastien Pomel

► **To cite this version:**

Sébastien Pomel. Squelette membranaire chez *Paramecium tetraurelia* : caractérisation d'une nouvelle famille multigénique et analyse par les approches GFP et RNAi. Biologie cellulaire. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2005. Français. NNT : 2005CLF21630 . tel-00686966

HAL Id: tel-00686966

<https://theses.hal.science/tel-00686966>

Submitted on 13 Apr 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

***ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE***
N° d'ordre

Thèse

**Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de**

**Docteur d'Université
Spécialité : Biologie (Protistologie)**

Sébastien POMEL

**Squelette membranaire chez *Paramecium tetraurelia* :
caractérisation d'une nouvelle famille multigénique et
analyse par les approches GFP et RNAi**

Président : **Jacques BOHATIER**
Professeur Université d'Auvergne

Rapporteurs : **Anne FLEURY-AUBUSSON**
Chargée de Recherche CNRS, Université Paris XI
Eric VISCOGLIOSI
Chargé de Recherche CNRS, Institut Pasteur, Lille

Examineurs : **Jean COHEN**
Directeur de Recherche CNRS, CGM, Gif-sur-Yvette
Gérard PRENSIER
Professeur Université Blaise Pascal
Bernard VIGUES
Chargé de Recherche CNRS, Université Blaise Pascal

**UMR CNRS 6023, Laboratoire de Biologie des Protistes
Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II**

***ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE***
N° d'ordre

Thèse

**Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de**

**Docteur d'Université
Spécialité : Biologie (Protistologie)**

Sébastien POMEL

**Squelette membranaire chez *Paramecium tetraurelia* :
caractérisation d'une nouvelle famille multigénique et
analyse par les approches GFP et RNAi**

Président : **Jacques BOHATIER**
Professeur Université d'Auvergne

Rapporteurs : **Anne FLEURY-AUBUSSON**
Chargée de Recherche CNRS, Université Paris XI
Eric VISCOGLIOSI
Chargé de Recherche CNRS, Institut Pasteur, Lille

Examineurs : **Jean COHEN**
Directeur de Recherche CNRS, CGM, Gif-sur-Yvette
Gérard PRENSIER
Professeur Université Blaise Pascal
Bernard VIGUES
Chargé de Recherche CNRS, Université Blaise Pascal

**UMR CNRS 6023, Laboratoire de Biologie des Protistes
Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II**

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, dirigé par Christian Amblard.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie Jacques Bohatier d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, Anne Fleury-Aubusson et Eric Viscogliosi d'avoir accepté d'expertiser ce travail en tant que rapporteurs, Jean Cohen et Gérard Prensier d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examineurs.

Je tiens tout particulièrement à remercier Bernard Viguès pour avoir encadré ce travail de thèse avec patience et perspicacité et de m'avoir fait partager son expérience dans le domaine de la protistologie. Merci GUS pour m'avoir conseillé, encouragé et soutenu (et peut être aussi supporté...) pendant ces années passées au laboratoire.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe de Jean Cohen (CGM, Gif-sur-Yvette) pour m'avoir initié à la technique de microinjection dans des délais relativement brefs ainsi qu'à l'annotation du génome de la paramécie dans le cadre du GDR "Paramecium Genomics".

Un grand merci à Gérard Coffe, l'inventeur des épiplasmies, pour tous ces précieux conseils qu'il a pu m'apporter ainsi que pour sa constante disponibilité.

Je remercie Jean-Luc Vincenot pour le travail artistique.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe "Cytosquelette" pour leur participation occasionnelle et inestimable dans ce travail.

Je finirais en remerciant l'ensemble des membres du laboratoire avec qui j'ai sympathisé au cours de ces années.

SOMMAIRE

Résumé	6
Abstract	7
Introduction générale	8
CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	11
PARTIE 1 : Cytosquelette des métazoaires	13
I. Principaux réseaux cytosquelettiques : protéines constitutives et protéines associées ...	14
A. Les microtubules	14
1. Présentation générale.....	14
2. Les centres organisateurs de microtubules (MTOC).....	15
B. Les Filaments Intermédiaires (IF)	17
C. Les microfilaments	19
1. L'actine	19
2. Protéines associées à l'actine : Actin Binding Proteins (ABP).....	20
a) La myosine	21
(1) Présentation générale.....	21
(2) Contractilité des fibres d'acto-myosine	21
b) La tropomyosine.....	21
(1) Présentation générale.....	21
(2) Liaison à la troponine et rôle dans la contraction des fibres d'acto- myosine	22
D. Relations avec le squelette membranaire	22
II. Squelette membranaire chez les métazoaires	23
A. Rôle et structure générale	23
B. Composants majeurs du squelette membranaire chez les métazoaires	24

1. Les spectrines et leurs homologues	24
a) La spectrine érythrocytaire.....	24
b) Les spectrines non-érythrocytaires (fodrines).....	25
c) La famille des spectrines	26
2. L'ankyrine.....	26
3. La protéine 4.1.....	27
4. La protéine 4.2.....	28
5. L'adducine	28
6. La tropomoduline	29
PARTIE 2 : Le cytosquelette cortical chez les protozoaires ciliés	31
I. Le cytosquelette du cortex somatique.....	32
A. Le système de microfilaments : l'exemple du processus de cytokinèse chez <i>Tetrahymena</i>	32
B. Les systèmes microtubulaires chez les modèles <i>Tetrahymena</i> et <i>Paramecium</i>	34
C. Les réseaux de centrines chez les modèles <i>Tetrahymena</i> et <i>Paramecium</i>	36
D. Le squelette membranaire chez les modèles <i>Pseudomicrothorax</i> , <i>Euplotes</i> , <i>Tetrahymena</i> et <i>Paramecium</i>	37
1. L'épithélium de <i>Pseudomicrothorax</i> : une structure majoritairement composée d'articulines.....	37
2. Le squelette membranaire d' <i>Euplotes</i> : une structure composée de protéines homologues aux articulines	39
3. L'épithélium de <i>Tetrahymena</i> : une première entorse au concept "tout-articuline"	40
4. Le squelette membranaire de <i>Paramecium</i>	41
5. Analogie de composition entre les épithéliums	43
II. Cytosquelette du cortex oral chez les modèles <i>Tetrahymena</i> et <i>Paramecium</i>.....	44
III. Cytosquelette et morphogénèse cellulaire chez les modèles <i>Tetrahymena</i> et <i>Paramecium</i>.....	46
A. Stomatogénèse.....	46
B. Morphogénèse du cortex somatique.....	47

PARTIE 3 : L'interférence ARN : un processus conservé chez de nombreux organismes 53

I. Découverte du phénomène d'interférence ARN chez les plantes, les champignons et le nématode *C. elegans* 55

II. Le mécanisme d'interférence ARN 56

A. Un intermédiaire commun : l'ARN double-brins (dsRNA) 56

B. Synthèse des siRNA : la protéine Dicer 57

C. Effecteurs de l'interférence ARN : les siRNA 57

D. Mode d'action des siRNA : le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) ... 58

E. Amplification du signal : l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP) 60

III. Fonctions naturelles de l'interférence ARN 61

A. Résistance aux virus 61

B. Autres ARN des petite taille possédant une fonction naturelle 63

1. Les miRNA 63

2. Les tasiRNA 64

3. Les rasiRNA (heterochromatin RNA) 64

4. Les scnRNA 65

IV. L'interférence ARN : un outil d'analyse fonctionnelle applicable à un grand nombre d'organismes 68

V. Applications technologiques du processus d'interférence ARN 69

A. Un outil thérapeutique 69

B. Une méthode d'analyse fonctionnelle à l'échelle du génome 69

VI. L'interférence ARN chez les protozoaires parasites 70

VII. *Paramecium* : un modèle tout disposé à l'étude de son génome via l'approche RNAi 72

CHAPITRE II : RESULTATS 74

PARTIE 1 : The membrane skeleton in *Paramecium* : molecular characterization of a novel epiplasmin family and preliminary GFP expression results 76

Abstract	78
Introduction	80
Results	82
Discussion	87
Methods	91
References	97
Supplementary data	100
Annex	101

**PARTIE 2 : The membrane skeleton in *Paramecium* : a functional analysis
by RNAi of epiplasmins 108**

Abstract	110
Introduction	112
Results	114
Discussion	116
Methods	119
References	124

**PARTIE 3 : Production d'un nouvel anticorps dirigé contre les épiplasmines
de paramécie : application à l'étude des phénotypes boomerang et pré-
boomerang 128**

Abstract	130
Introduction	130
Matériels et Méthodes	131
Résultats	133
Discussion	135
Références	137

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	138
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	147
ANNEXES	162

RESUME

Le cortex de la plupart des protozoaires ciliés contient un squelette membranaire dont le principal élément est l'épiplasme, une structure apposée à la membrane alvéolaire interne. Chez la paramécie, l'épiplasme se présente sous forme d'écailles indépendantes disposées autour de chaque appareil ciliaire et composées d'une multitude de protéines appelées épiplasmines.

Dans une première partie, nous avons contribué à l'annotation du génome macronucléaire de *Paramecium tetraurelia* à partir de la séquence de deux épiplasmines (*EPI-1* et *EPI-2*) et identifié 39 gènes supplémentaires. Deux gènes orthologues ont également été identifiés chez *Tetrahymena thermophila*. L'analyse structurale des 43 séquences indique que la signature de cette nouvelle famille multigénique est un domaine de 79 acides aminés flanqué de deux régions variables riches en résidus Q, P et V. L'analyse phylogénétique au sein de cette famille a permis de confirmer l'existence de 3 sous-familles (sur un total de 4), préalablement déterminées sur la base de critères biochimiques. L'expression de l'épiplasmine 1 couplée à la GFP confirme la localisation de cette protéine au niveau des écailles épiplasmiques ainsi qu'au niveau de structures orales apparentées.

La deuxième partie porte sur l'analyse fonctionnelle d'épiplasmines à partir d'une approche ARN interférence. Suite à l'ingestion de bactéries produisant des ARN double-brins homologues aux séquences codantes de *EPI-1* et/ou *EPI-2*, nous avons obtenu un phénotype nommé "boomerang" caractérisé par un blocage répété de la cytokinèse conduisant à des organismes "monstrueux" qui sont finalement lysés après 72 heures d'induction. L'analyse du phénotype en microscopie à fluorescence a confirmé l'absence de sillon de division et a révélé plusieurs anomalies dans les processus de morphogenèse corticale et de karyocinèse.

Enfin, la production d'un nouvel anticorps dirigé contre deux peptides issus des séquences d'épiplasmines 1 et 2 et marquant l'épiplasme de la paramécie nous a permis de mettre en évidence l'extinction d'une sous-famille d'épiplasmines suite à l'induction du phénotype "boomerang". L'épitope de l'anticorps monoclonal CTS-32 reconnaissant l'ensemble des épiplasmines n'est pas contenu dans les peptides 1 et 2.

ABSTRACT

The cortex of most ciliated protozoa encloses a membrane skeleton including the epiplasm, a sub-membranous layer extending underneath the cytoplasmic face of the inner alveolar membrane. In *Paramecium*, epiplasmic scales are centered around ciliary units and are composed of a complex set of proteins named epiplasmins.

In the first part of this study, using the sequence of two epiplasmins (*EPI-1* and *EPI-2*), we have contributed to the annotation of *Paramecium tetraurelia* macronuclear genome and identified 39 additional sequences. Two orthologous sequences were found in the *Tetrahymena thermophila* genome. Structural analysis of the 43 sequences indicates that the hallmark of this new multigenic family is a 79 amino acids domain flanked by two Q, P and V-rich stretches of sequence that are much more variable in amino-acid composition. A phylogenetic analysis confirmed the existence of 3 sub-families (on a total of 4) that were previously determined on the basis of distinct biochemical properties. The expression of GFP-tagged epiplasmin 1 showed significant labelling of epiplasmic scales and oral structures as well.

The second part concerns the functional analysis of epiplasmins using an RNA interference approach. Following the ingestion of bacteria producing double-stranded RNA homologous to the *EPI-1* and/or *EPI-2* coding sequences, we obtained a phenotype named "boomerang" characterized by repeated blockages of cytokinesis leading to monstrous organisms which are finally lysed after 72 hours of induction. The analysis of induced cells by fluorescence microscopy revealed multiple abnormalities in cortical morphogenesis and karyokinesis processes despite the normal progression of some mechanisms like oral apparatus duplication.

Finally, the production of a novel antibody raised against 2 peptides (1 and 2) included in epiplasmins 1 and 2 sequences, and decorating the epiplasm of *Paramecium*, allowed us to evidence the co-suppression of a sub-family of epiplasmins following the "boomerang" phenotype induction. The epitope of the monoclonal antibody (CTS-32) which labels the overall family of epiplasmins is not contained in peptides 1 and 2.

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

Autrefois considéré à tort comme une armature intracellulaire rigide et inerte, le cytosquelette est désormais connu pour constituer un réseau tridimensionnel composé de structures dynamiques responsables des changements de formes de la cellule et impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la locomotion, la motilité, la cytokinèse et la morphogénèse.

Le cytosquelette des cellules de métazoaires est constitué de trois grands groupes de structures qui se distinguent par leur diamètre et leurs constituants protéiques : les microfilaments (diamètre inférieur à 8 nm), les filaments intermédiaires (8 à 15 nm de diamètre) et les microtubules (diamètre d'environ 25 nm). Les structures cytosquelettiques sont capables de s'interconnecter entre elles afin de développer des activités différentes et complémentaires de façon coordonnée dans l'espace et dans le temps.

Un second concept qui semble aussi désormais est de considérer que le cytosquelette était un organelle spécifique des cellules eucaryotes alors que de nombreux arguments existent aujourd'hui en faveur de l'existence d'éléments cytosquelettiques chez les bactéries. Plusieurs protéines bactériennes apparentées à celles du cytosquelette semblent impliquées dans la division et la structure cellulaire mais aussi dans la ségrégation de l'ADN. Ces protéines forment des structures filamenteuses dynamiques associées à la membrane cellulaire. Il semble donc probable que les structures du cytosquelette ont émergé très tôt au cours de l'évolution et que leur fonction primitive aurait été liée à une interaction directe avec la membrane cellulaire. A ce jour, c'est essentiellement grâce au modèle érythrocytaire (globule rouge) que ces interactions ont pu être élucidées à l'échelle moléculaire. Elles n'ont été que très rarement étudiées chez les protistes en dépit du développement extrêmement important des structures cytosquelettiques sous-membranaires chez ces micro-organismes.

Dans ce mémoire, nous présentons une revue des éléments cytosquelettiques majeurs des cellules eucaryotes (métazoaires et protistes) ainsi que des informations sur le mécanisme d'interférence ARN (RNAi) qui est la principale approche expérimentale développée dans cette étude. Cette approche ainsi que les données émanant d'un criblage de banque et du séquençage du génome macronucléaire de la paramécie ont permis une étude structurale et fonctionnelle des constituants protéiques (épiplasmines) du squelette membranaire de *P. tetraurelia*. Nous terminons par une discussion générale où nous tentons d'interpréter à un

niveau mécanistique les phénotypes obtenus par l'approche RNAi qui affecte sévèrement le processus de cytotinèse et, dans une moindre mesure, celui de la morphogénèse chez le modèle étudié.

CHAPITRE I

ANALYSE

BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre se décline en trois parties qui sont un bilan des connaissances sur les trois points suivants :

- Le cytosquelette en général.
- Le cytosquelette chez les protistes.
- L'approche méthodologique permettant d'invalider des gènes par interférence ARN. (RNAi).

PARTIE I

Cytosquelette des cellules de métazoaires

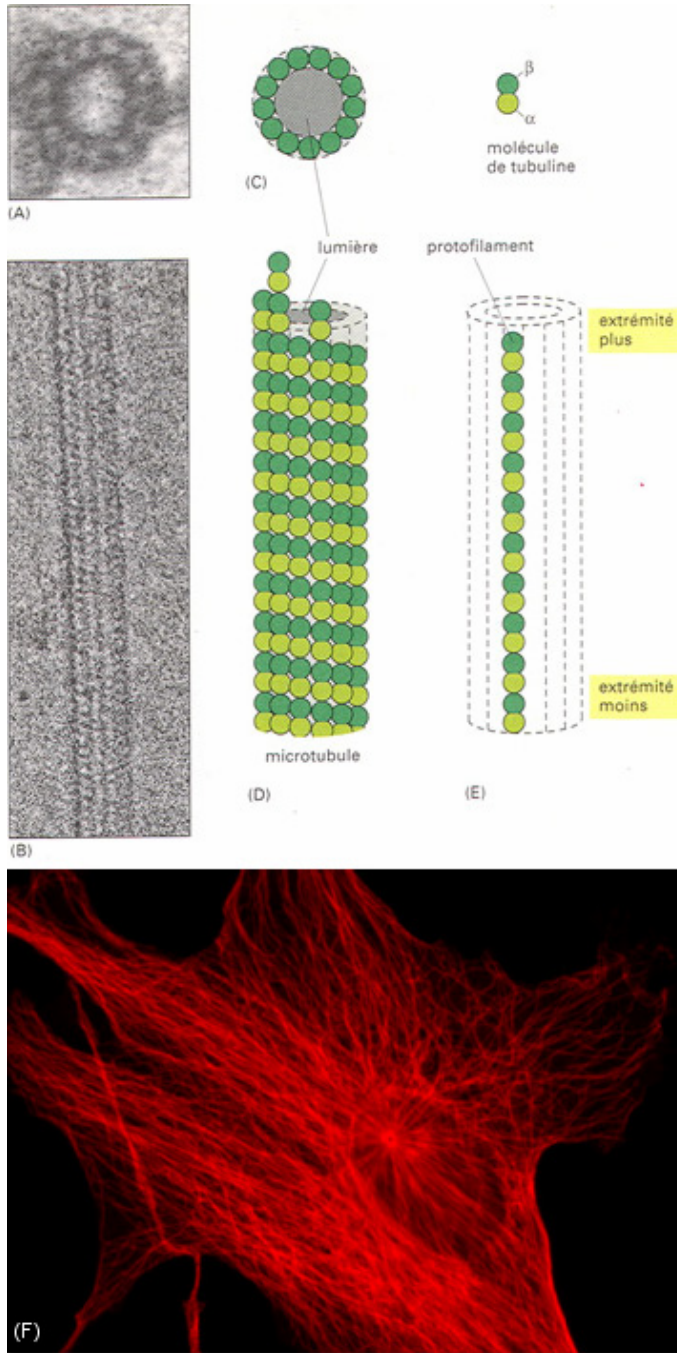


Fig. 1 : Les microtubules

Coupes transversales (A et C) et longitudinales (B et D) d'un microtubule observé en microscopie électronique (A et B) ou représenté schématiquement (C et D). Le détail de la composition d'un protofilament est représenté en (E). Immunofluorescence mettant en évidence un réseau de microtubules d'un fibroblaste à l'aide d'un anticorps monoclonal anti- α -tubuline bovine (F).

D'après

<http://www.humans.be/bio%20cell%20cytosquelette.html> et

<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/red/cy5hyq/cy5mntjactubulincy5.html>.

Cytosquelette des cellules de métazoaires

I. Principaux réseaux cytosquelettiques : protéines constitutives et protéines associées

A. Les microtubules (voir pour revue Pollard et Earnshaw, 2004)

1. Présentation générale

Les microtubules sont des polymères d' α - et de β -tubuline en forme de tube rigide de 25 nm de diamètre. Les dimères formés par l'association en tête à queue des sous-unités α et β s'assemblent pour former un protofilament dont la croissance est polarisée : l'extrémité qui croît le plus rapidement est appelée extrémité (+), l'autre étant l'extrémité (-). Les microtubules sont formés de 13 protofilaments parallèles disposés autour d'un cylindre central creux (Fig. 1).

Les tubulines α et β , composants majeurs des microtubules, sont des protéines d'environ 50 kDa remarquablement conservées au cours de l'évolution. Cependant, la diversité des isoformes de tubulines α et β varie considérablement suivant les espèces. L'espèce humaine possède 15 gènes d' α -tubuline et 21 gènes de β -tubuline alors que la plupart des organismes unicellulaires comme la levure n'en possèdent qu'un ou deux exemplaires. Dans la plupart des cellules eucaryotes, l'hétérogénéité des tubulines est liée aux modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la polyglycylation, la polyglutamylation, la tyrosination/détyrosination, la phosphorylation et la palmitoylation. Ces modifications ont une influence sur la diversité fonctionnelle des microtubules (Westermann et Weber, 2003). L'extrémité C-terminale des tubulines α et β , permettant de distinguer chaque isoforme en raison de sa variabilité, est utilisée pour effectuer la plupart des modifications post-traductionnelles, mis à part l'acétylation.

Le rôle général des microtubules est de maintenir l'architecture interne de la cellule en contrôlant la distribution des organelles. Les microtubules forment les fuseaux mitotiques et méiotiques qui jouent un rôle primordial dans la ségrégation des chromosomes. Les flagelles et les cils des cellules eucaryotes sont constitués d'une armature axiale composée d'un

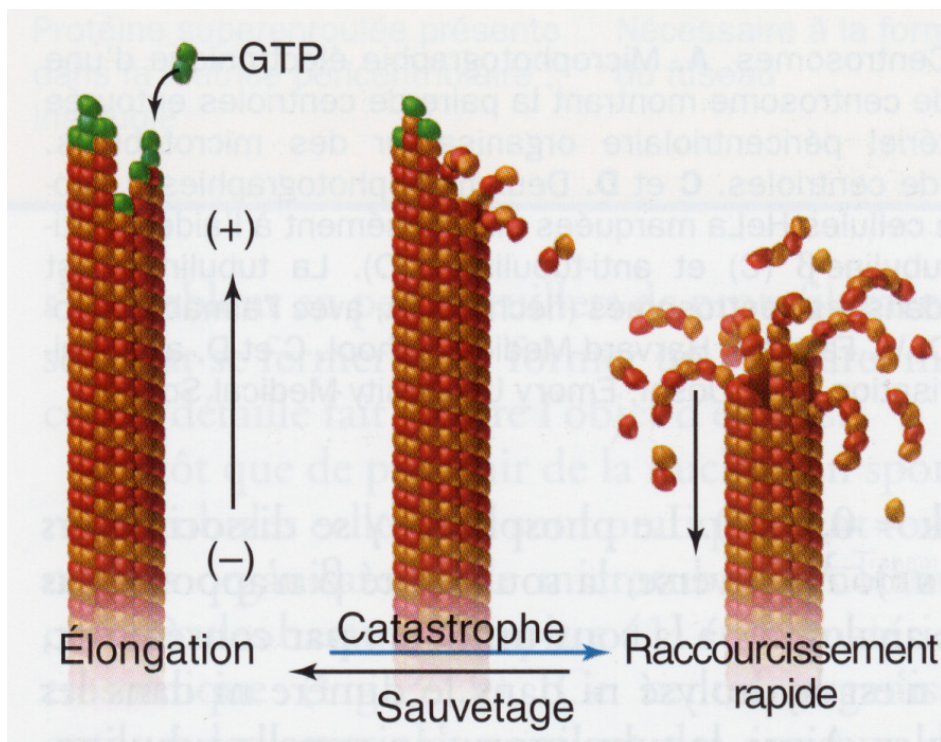


Fig. 2 : Modèle illustrant les transitions au cours de l'instabilité dynamique à l'état d'équilibre des microtubules *in vitro*.

La tubuline-GTP est indiquée en vert et la tubuline GDP en rouge-orange.

D'après Pollard et Earnshaw, 2004.

cylindre de 9 doublets de microtubules partiellement fusionnés et d'un doublet central. Les microtubules des cils et des flagelles sont extrêmement stables, contrairement aux microtubules cytoplasmiques qui sont dynamiques et se renouvellent rapidement. A l'état d'équilibre en conditions *in vitro*, les microtubules cytoplasmiques s'allongent lentement par hétéropolymérisation des sous-unités α et β jusqu'à une phase de raccourcissement brutale rapide, appelée "catastrophe". Cette phase, qui est aléatoire, est interrompue par une phase dite de "sauvetage" au cours de laquelle les microtubules s'allongent de nouveau de manière régulière (Fig. 2).

L'isolement des microtubules suite à plusieurs cycles d'assemblage/désassemblage *in vitro* ont permis l'identification biochimique des premières MAP (protéines associées aux microtubules). Le complexe de co-purification obtenu contient 80% de tubulines et 20% de MAP. Cependant, ces complexes n'incluent pas les MAP à faible affinité pour les microtubules, comme la protéine motrice kinésine par exemple. Actuellement, de nombreuses MAP ont été identifiées et la liste ne cesse de s'accroître (Maiato et al., 2004). Ces protéines interviennent dans la nucléation, l'élongation, la stabilisation, la destabilisation, la fragmentation des microtubules, leur liaison à d'autres structures cellulaires ou le transport antérograde d'organites et de vésicules de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) des microtubules (kinésine) ou inversement rétrograde (dynéine cytoplasmique). Comme les dynéines cytoplasmiques, les dynéines reliant les doublets de microtubules entre eux dans les flagelles et les cils, se lient puis se détachent des microtubules adjacents, entraînant alors un mouvement de glissement entre les doublets de microtubules qui est converti en battement ciliaire ou flagellaire en raison du pontage entre les doublets (Fig. 3).

2. Les centres organisateurs de microtubules (MTOC) (voir pour revue Job et al., 2003 ; Dutcher, 2003)

Le centrosome, composé de deux centrioles en orientation orthogonale et d'un matériel péricentriolaire (MPC), est le principal MTOC dans la plupart des cellules animales. Les centrioles sont des cylindres composés de 9 triplets de microtubules. Des structures équivalentes aux centrioles, appelées corps basaux ou cinétosomes, sont les centres organisateurs des cils et des flagelles.

Lors de la duplication des centrosomes, les nouveaux centrioles se forment orthogonalement aux extrémités proximales des anciens qui ont perdu leur orientation orthogonale stricte. Les centrosomes dupliqués procèdent à la nucléation des microtubules du fuseau mitotique. La γ -tubuline, localisée dans le lumen des microtubules du cylindre centriolaire et dans le MPC, a un rôle central dans la nucléation des microtubules : un complexe en forme d'anneau formé de 10 à 13 molécules de γ -tubulines et de plusieurs autres polypeptides, appelé γ -TURC, serait le

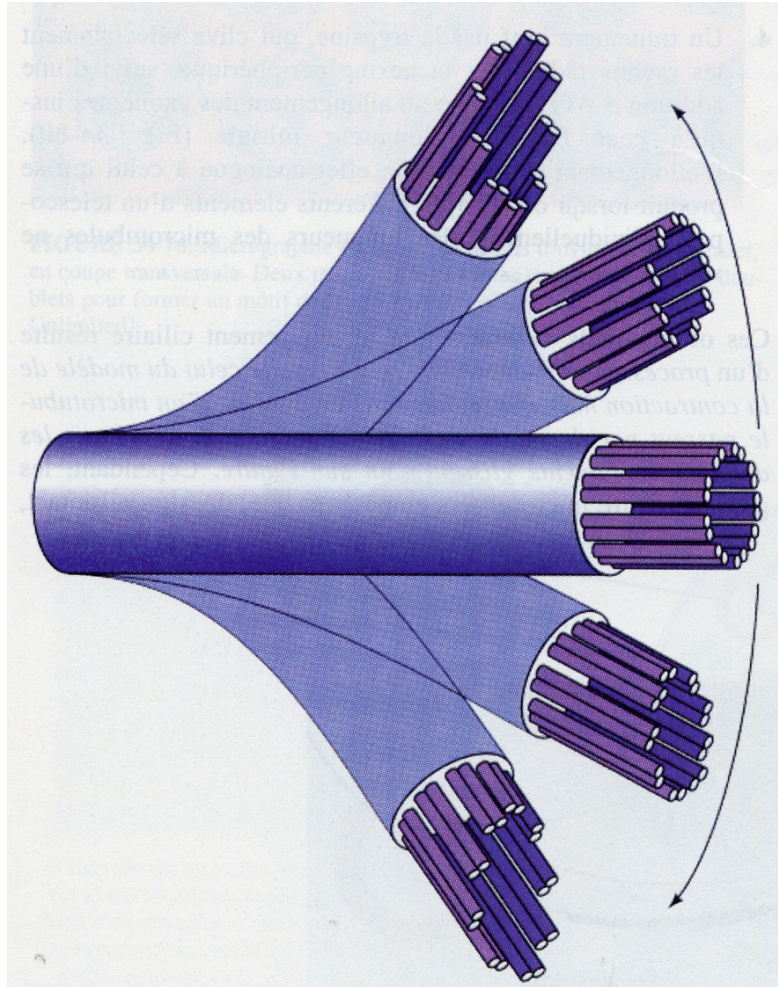


Fig. 3 : Représentation schématique d'un battement de cil.

Lorsque le cil est rectiligne, tous les doublets périphériques sont au même niveau (au centre). La courbure du cil entraîne un glissement des doublets situés à l'intérieur de la courbure sur ceux qui sont à l'extérieur (en haut et en bas).

D'après Voet et Voet, 1998.

principal acteur de ce mécanisme. Deux modèles sont proposés pour expliquer le mécanisme de nucléation des microtubules (Fig. 4) : le modèle "matrice" où le complexe γ -TURC servirait essentiellement à établir des contacts avec les dimères α/β à l'extrémité (-) des microtubules et le modèle "protofilament" où les complexes γ -TURC s'associent pour former un protofilament qui peut alors nucléer les microtubules par liaison avec les dimères α/β .

Avec trois exemplaires chez l'homme et un seul chez la levure, la γ -tubuline est une protéine conservée chez la plupart des organismes eucaryotes. Récemment, de nouveaux isotopes de tubulines, appelées δ (delta), ε (epsilon), ζ (zeta), η (eta), ι (iota), θ (theta) et κ (kappa) ont été identifiés chez les protozoaires, les algues et les amphibiens mais contrairement aux α -, β - et γ -tubulines, de nombreux organismes ne possèdent qu'un seul gène codant pour ces nouvelles tubulines. Ces protéines ne sont pas présentes de façon ubiquitaire chez tous les eucaryotes et sont notamment absentes chez les champignons, les végétaux, la drosophile et le ver *C. elegans*. Chacune de ces isoformes est localisée au niveau du centriole ou du corps basal des cils et semble nécessaire à leur duplication, leur structure et leur fonction. Les centrioles sont également composés de protéines semblables à la calmoduline, les centrinines, qui sont capables de fixer le Ca^{2+} grâce à quatre domaines EF-hand. Cette protéine de 20 kDa, identifiée chez *Chlamydomonas*, est très conservée de la levure à l'homme (Salisbury, 1995). L'homologue du gène de centrinine chez la levure, appelé *CDC31*, code pour une protéine associée au spindle pole body qui est l'équivalent fonctionnel du centrosome. Dans les centrosomes, les cils et les flagelles, ces protéines ont un rôle essentiel dans la biogenèse du centriole ou du corps basal (Middendorp et al., 2000 ; Salisbury et al., 2002 ; Koblenz et al., 2003).

Il est connu depuis longtemps que les microtubules sont capables d'interagir avec les filaments intermédiaires. En effet, les microtubules détyrosinés seraient impliqués dans cette association dans le fibroblaste. De plus, l'échange de sous-unités, la demi-vie ainsi que la motilité des filaments intermédiaires seraient dépendants de la présence des microtubules. La motilité des filaments intermédiaires est bidirectionnelle et concerne toutes les formes d'assemblage : particules non-filamenteuses, filaments courts et "en tortillon" et filaments longs (Fig. 5). Les protéines motrices, kinésines et dynéines, assurent respectivement les transports antérograde et rétrograde des IF, et particulièrement de la vimentine, le long des microtubules (Chang et Goldman, 2004).

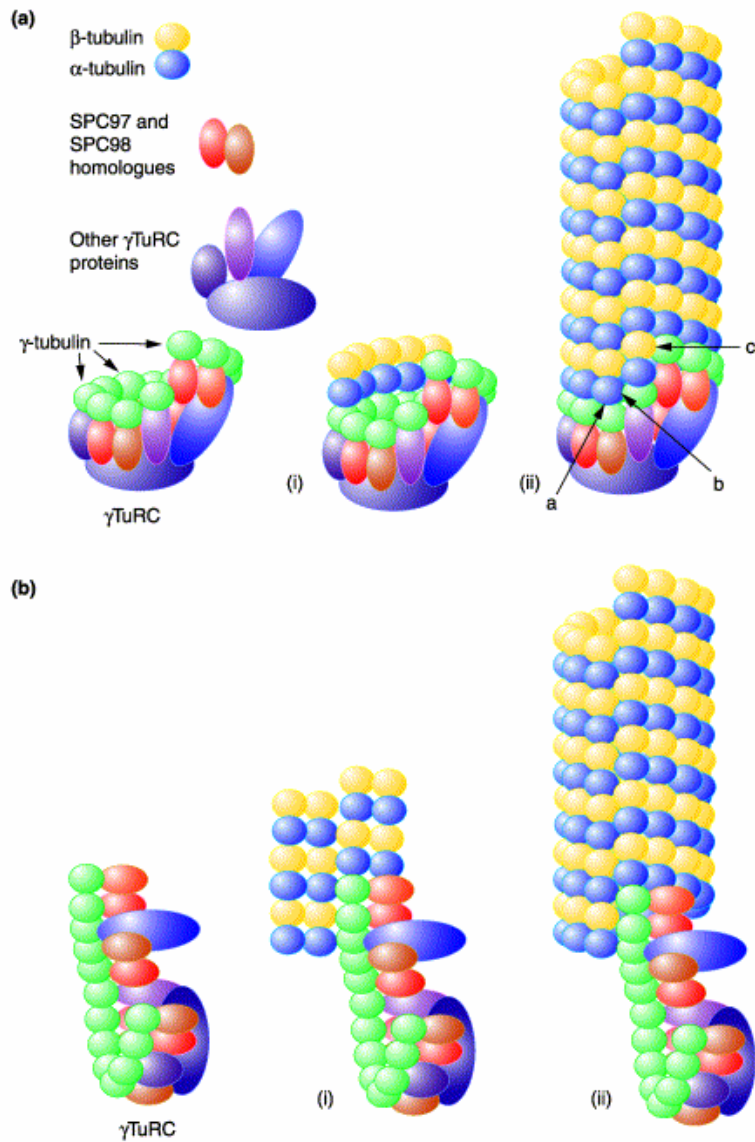


Fig. 4 : Mécanisme de nucléation des microtubules par la γ -tubuline.

(a) Modèle matrice

(b) Modèle protofilament

D'après Job et al., 2003.

B. Les Filament Intermédiaires (IF) (voir pour revue Herrmann et Aebi, 2004 ; Chang et Goldman, 2004)

La dénomination "filaments intermédiaires" est issue de leur diamètre d'environ 10 nm qui est intermédiaire entre celui des microtubules (25 nm) et celui des microfilaments (4 à 7 nm). Les IF sont des polymères flexibles fournissant un support aux cellules capable de résister aux stress mécaniques. Un réseau continu d'IF s'étend de l'enveloppe nucléaire jusqu'à des points d'attaches au niveau de la membrane plasmique permettant de transmettre les forces mécaniques d'une cellule à l'autre (desmosomes) ou à la matrice extracellulaire (hémidesmosomes).

Contrairement aux microtubules ou aux microfilaments, les IF sont des filaments apolaires formés de protéines sans activité enzymatique et sont exprimés de façon spécifique dans certains types cellulaires. Leurs protéines ont une structure secondaire commune formée d'un domaine central de 310 à 350 acides aminés flanqué de deux domaines en N- et C-terminaux de tailles variables conférant à chaque filament des caractéristiques biochimiques distinctes (Fig. 6). Le domaine central est composé de répétitions d'heptades $(abcdefg)_n$ où a et d sont des résidus hydrophobes et b, c, e, f, g sont souvent des résidus acides. Les répétitions, avec une conformation en α -hélice, forment des structures dites en "coiled-coil" (coil 1A, 1B, 2A, 2B). La partie variable non-hélicoïdale en N-terminal (la tête) serait essentielle à l'assemblage des filaments intermédiaires alors que la partie C-terminale (la queue) serait impliquée dans les interactions latérales et l'organisation du réseau d'IF.

L'assemblage *in vitro* des IF cytoplasmiques se déroule en trois étapes : (1) des tétramères s'associent latéralement pour former des unités de longueur de filaments (ULF) de 16 nm de diamètre et 60 nm de long ; (2) ces ULF s'assemblent bout-à-bout pour former des filaments de plusieurs centaines de nanomètres de long qui se compactent afin de réduire leur diamètre (11 à 14 nm) ; (3) une réorganisation/compaction se propage ensuite tout au long du filament pour produire un IF mature de 10 nm de diamètre (Fig. 7). Des études utilisant la Green Fluorescent Protein (GFP) ont aussi montré que les protéines constituant les IF existent *in vivo* sous la forme de particules non-filamenteuses, de courts filaments "en tortillon" et de longs filaments. Les particules non-filamenteuses et les filaments courts "en tortillon" contiendraient des précurseurs d'IF (dimères, tétramères ou ULF) et seraient à l'origine de l'assemblage des IF de longue taille. Un remarquable polymorphisme est à noter dans l'assemblage *in vitro* des IF, en terme de "masse par longueur" des filaments, qui varie en fonction de la classe d'IF ou des conditions physiologiques considérées.

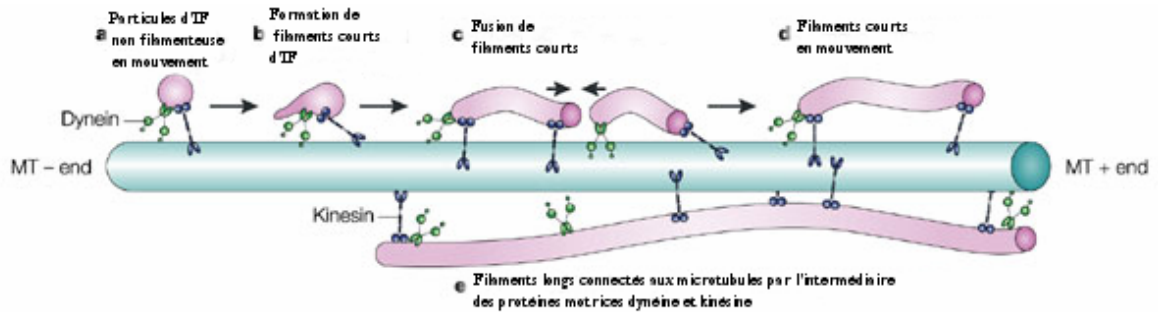


Fig. 5 : Associations entre microtubules et IF : rôle dans l'assemblage et la motilité des IF.

D'après Chang et Goldman, 2004.

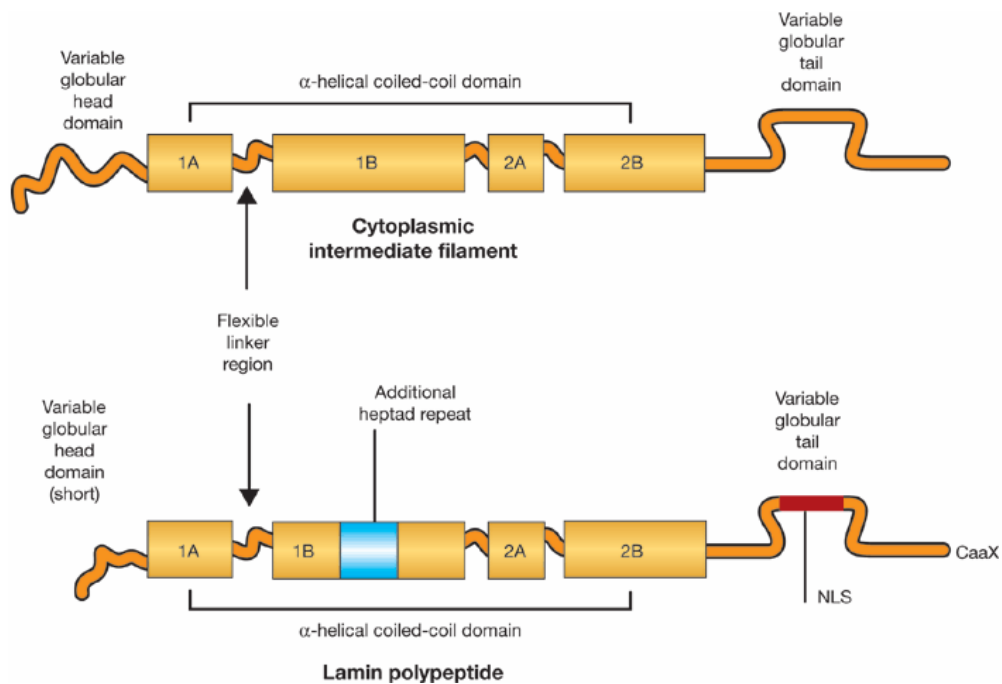


Fig. 6 : Structure des IF cytoplasmiques et nucléaires.

1A, 1B, 2A et 2B : domaines coiled-coil, NLS : domaine d'adressage au noyau ; CaaX : domaine de méthylation, farnésylation et clivage protéolytique.

D'après Hutchison et Worman, 2004.

Avec 67 gènes chez l'homme, les IF constituent l'une des plus grandes familles multigéniques humaines. Chez les vertébrés, plus de 50 gènes ont été répertoriés et regroupés en 6 classes (seule la classe V représente des IF nucléaires, les autres sont cytoplasmiques ; Fig. 8) :

- les membres des classes I et II sont respectivement des kératines acides et basiques exprimées dans les cellules épithéliales. Seuls des hétéropolymères entre les protéines des classes I et II peuvent être formés. Des mutations dans les gènes de kératines sont responsables de maladies comme l'épidermolyse bulleuse.
- les membres de la classes III, incluant la vimentine, la desmine, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et la périphérine, forment des homopolymères. Ces protéines sont présentes dans de nombreux types cellulaires : cellules mésenchymateuses pendant le développement précoce (vimentine), les cellules musculaires (desmine), les cellules gliales et astrocytaires (GFAP) et les cellules neuronales (périphérine).
- les membres de la classe IV, incluant les neurofilaments formés de trois sous-unités (NF-L, NF-M et NF-H) et l' α -internexine, forment des homopolymères. Cependant, le triplet de protéines NF-L, NF-M et NF-H forme un filament complexe dans lequel NF-M et NF-H ne peuvent pas s'auto-assembler. Les membres des classes III et IV sont aussi capables de former des hétéropolymères au sein d'une même classe et entre les deux classes *in vitro* et *in vivo*.
- les lamines A, B1, B2 et C constituent la classe V des IF et composent la lamina nucléaire des cellules d'eucaryotes supérieurs. Cette classe d'IF possède 42 acides aminés supplémentaires dans le coil 1B, soit 6 heptades (Fig. 6). Contrairement aux IF cytoplasmiques, ces IF nucléaires forment en premier lieu, lors de leur assemblage *in vitro*, des dimères de 50 nm de long qui sont utilisés, par association "tête-queue", pour former des protofilaments. L'association latérale des protofilaments permet l'élaboration des IF nucléaires. Les lamines ne co-polymérisent pas avec les protéines des autres classes d'IF.
- la classe VI correspond à la nestine. En raison de la structure de son gène, la nestine peut aussi être regroupée avec les neurofilaments dans la classe IV. Pendant l'embryogenèse, la nestine est exprimée dans les cellules en prolifération et en migration.
- IF orphelins ou non-classés tels que la phakinine et la filensine qui sont exprimées dans le cristallin.

Ces 6 classes d'IF ont aussi été regroupées suivant leurs capacités d'assemblage en homo- ou hétéropolymères : le groupe 1 inclue les classes I et II, le groupe 2 correspond aux classes III, IV et VI et le groupe 3 à la classe V (Fig. 8).

Certaines protéines associées aux IF (IFAP) comme la desmoplakine, la plectine ou BPAG1 (Bullous Pemphigoid Antigen-1) ont un rôle de liaison des IF entre eux ou avec les

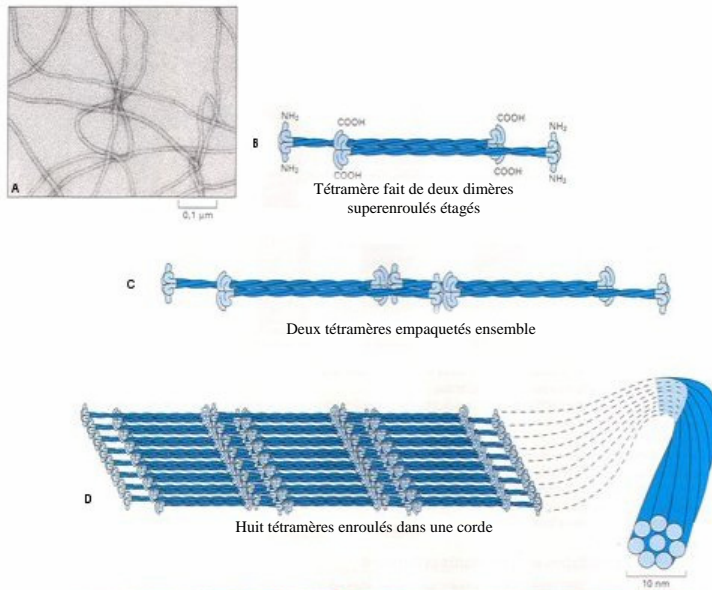
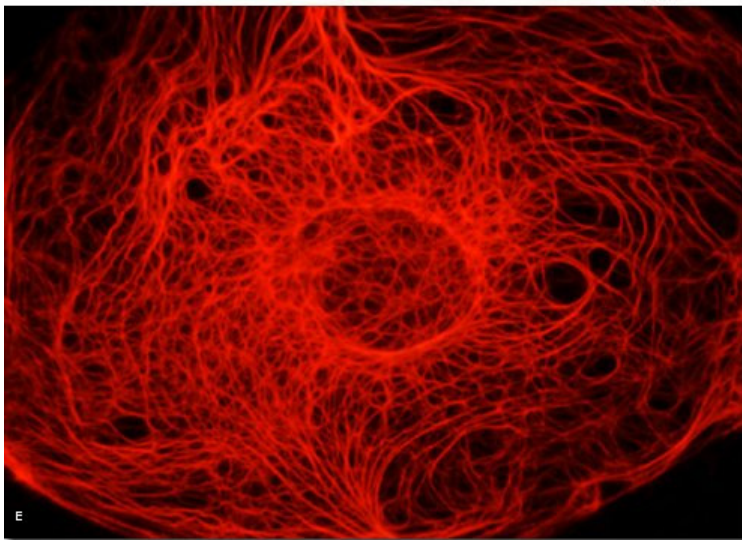


Fig. 7 : Les filaments intermédiaires

Observation d'IF en microscopie électronique (**A**) et représentation schématique de leur mécanisme d'assemblage (**B-D**). Visualisation d'un réseau de kératine dans une cellule PtK2 en immunofluorescence (**E**).



D'après <http://www.humans.be/bio%20cell%20Cytosquelette.html> et <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/green/tritichyq/tritichyqptk2cy3keratin.html>.

microtubules, les filaments d'actine ou la membrane plasmique. Ces protéines présentent un long domaine en α -hélice responsable de la formation de structures homodimériques en "coiled-coil". Cette région est flanquée de deux domaines non-hélicoïdaux : un domaine en N-terminal présentant des motifs de liaison à l'actine et aux microtubules et un domaine en C-terminal permettant l'association avec les IF. La liste des IFAP ne cesse de s'accroître révélant ainsi le degré de complexité structurale et fonctionnelle des réseaux d'IF formés dans la cellule.

L'assemblage *in vivo* des filaments de kératine dépend de l'intégrité des deux réseaux microtubulaires et microfilamenteux. Ce dernier joue également un rôle, à un degré moindre, dans l'organisation des filaments de vimentine. Dans les cellules neuronales, plus de la moitié de la myosine Va, associée au réseau d'actine, est liée aux neurofilaments et est essentielle à sa distribution dans l'axone. Ces résultats montrent que la motilité et l'organisation des IF peut être régulée par de nombreux modulateurs agissant conjointement : IFAP, microtubules ou microfilaments (Fig. 9).

C. Les microfilaments (voir pour revue Kreis et Vale, 1999 ; Fattoum, 2001; Pollard et Earnshaw, 2004)

1. L'actine

L'actine, composant majeur des microfilaments, est une molécule de 42 kDa très conservée au cours de l'évolution. Les gènes d'actines ont été caractérisés dans de nombreux organismes eucaryotes et sont souvent organisés en familles multigéniques comme chez *Dictyostelium* ou l'homme. Chez les oiseaux et les mammifères, six isoformes distinctes sont exprimées de façon tissu-spécifique : deux isoformes dans les muscles striés, deux dans les muscles lisses et deux dans les cellules non-musculaires. Trois variants isoélectriques, appelés α -, β - et γ -actines, ont pu être séparés parmi ces isoformes par électrophorèse bidimensionnelle. Ces isoformes sont très similaires : aucune différence n'a été trouvée dans leurs propriétés de polymérisations. Leurs différences majeures se situent dans une partie N-terminale variable qui jouerait un rôle dans la régulation de la localisation sub-cellulaire de la protéine. La molécule d'actine est capable de fixer les nucléotides (ATP ou ADP) et des ions divalents (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) dans une partie charnière centrale.

Dans des conditions physiologiques, les monomères d'actine (actine G) se polymérisent pour former des filaments hélicoïdaux de 4 à 7 nm de diamètre (actine F). Dans les structures comme les microvilli ou les stéréocils, le réseau d'actine est sous forme de faisceaux de filaments parallèles. A l'aide du complexe Arp2/3 (Actin Related Protein), les filaments

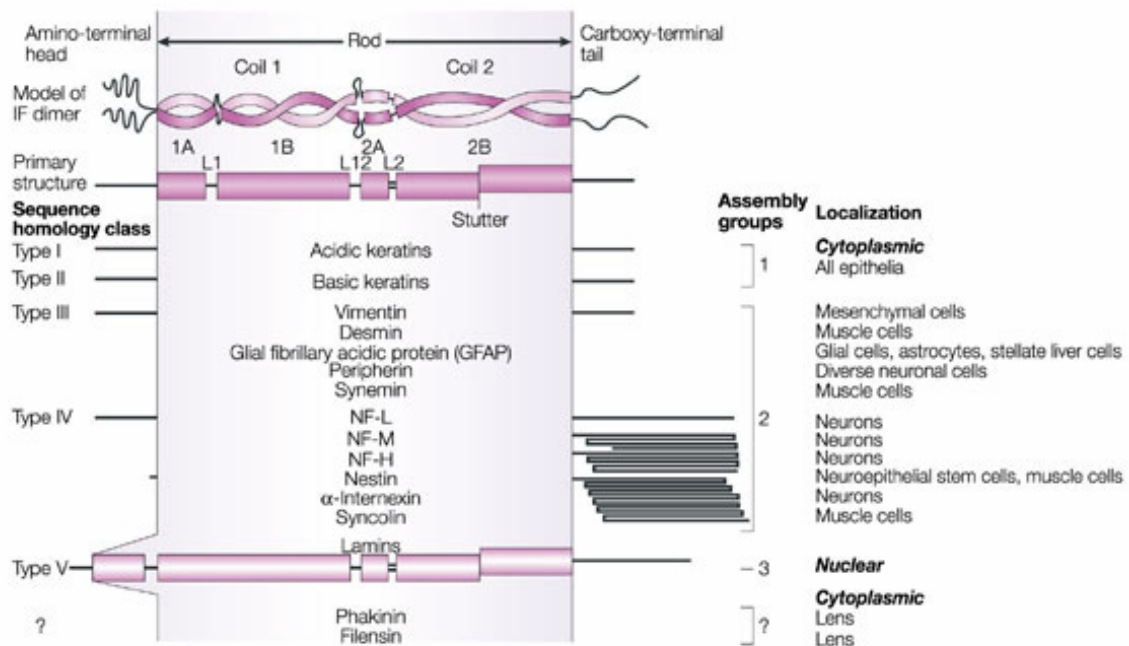


Fig. 8 : Classification des IF permettant de distinguer 5 groupes en fonction de leurs identités de séquences, leurs modes d'assemblages et leurs distributions tissulaires.

D'après Chang et Goldman, 2004.

d'actines se connectent entre eux et se regroupent (filopodes) ou non (lamellipodes) en faisceaux plus ou moins denses. Les filaments d'actine sont formés par addition de monomères aux deux extrémités avec une cinétique différente définissant ainsi l'extrémité positive dite barbue, à croissance rapide, et l'extrémité négative, aussi appelée pointue, à croissance lente. La génération d'amorces de trois monomères d'actine est l'étape limitante à l'initiation de la polymérisation, appelée nucléation. La présence de Mg^{2+} ainsi que l'hydrolyse de l'ATP lié à l'actine sont nécessaires à cette polymérisation. Suite à l'hydrolyse d'ATP en ADP + Pi, la libération du Pi destabilise les filaments d'actine entraînant une dissociation plus rapide à l'extrémité pointue du filament (riche en ADP) qu'à l'extrémité barbue (riche en ATP) et ainsi un équilibre d'assemblage/déassemblage de monomères d'actine responsable de la dynamique des filaments d'actine dans la cellule (Fig. 10).

Ces propriétés confèrent à l'actine un rôle fondamental dans la coordination d'un grand nombre de fonctions biologiques (Fig. 11). Cette protéine peut, par exemple, jouer un rôle dynamique dans la contraction musculaire, la cytokinèse ou l'expansion de pseudopodes. Elle peut aussi avoir un rôle structural dans le contrôle de la morphologie cellulaire. Ces fonctions sont régulées par des protéines associées à l'actine, appelées ABP (Actin Binding Proteins), qui constituent une famille complexe tant du point de vue structural que du point de vue fonctionnel.

2. Protéines associées à l'actine : Actin Binding Proteins (ABP) (voir pour revue dos Remedios et al., 2003)

Un grand nombre d'ABP ont été identifiées (au moins 160) et la liste s'agrandit encore de jours en jours. Actuellement, ces protéines se déclinent en 6 grands groupes dont les fonctions sont les suivantes : 1) séquestration de monomères d'actines, 2) dépolymérisation, 3) coiffe et nucléation, 4) coupure, 5) inter-connection, 6) stabilisation des filaments d'actine. Les fonctions assurées par les ABP semblent être redondantes en raison de leur diversité limitée par rapport au nombre d'ABP identifiées. En plus de leur capacité à influencer la dynamique d'assemblage des filaments d'actine, un grand nombre d'ABP possède des fonctions spécifiques telles que la liaison de l'actine à la matrice extracellulaire (vinculine), l'ancrage à la membrane (annexine) ou l'utilisation de l'actine comme support mécanique pour induire un mouvement (protéines motrices comme la myosine). Un exemple est celui des ABP dont la fonction prépondérante est liée à la rétraction des fibres d'acto-myosine lors de la contraction musculaire ou dans la mise en place de l'anneau contractile nécessaire à la cytokinèse.

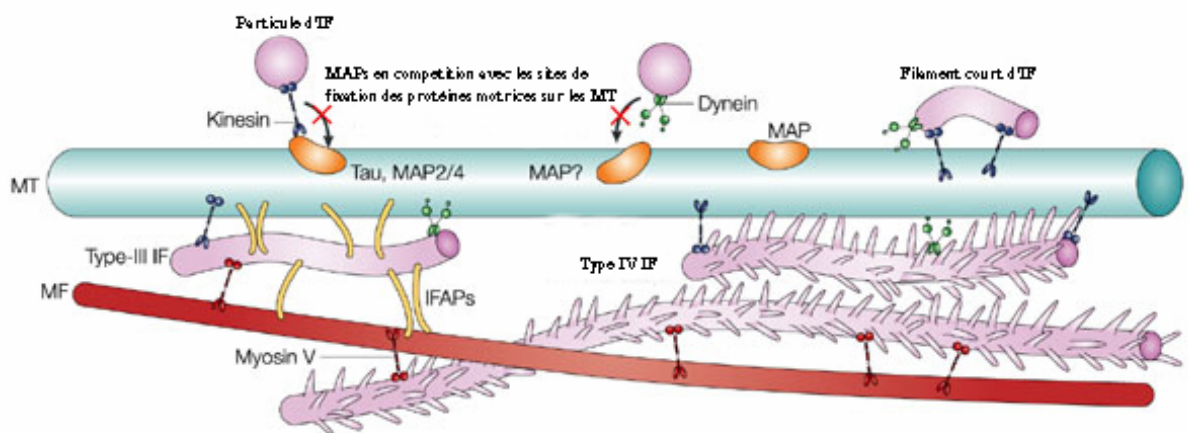


Fig. 9 : Modulations de la motilité des IF impliquant une association étroite avec les microfilaments et les microtubules.

D'après Chang et Goldman, 2004.

a) **La myosine** (voir pour revue Pollard et Earnshaw, 2004; De la Cruz et Ostap, 2004)

(1) **Présentation générale**

La famille des myosines regroupe au moins 18 membres possédant des propriétés biochimiques diverses et des fonctions cellulaires spécifiques. Les 18 isoformes de myosines sont conservées au cours de l'évolution en raison de leur présence dans une grande variété d'organismes eucaryotes uni- et pluricellulaires, exception faite des formes VIII, XI et XIII spécifiques des végétaux, XIV spécifique de *Toxoplasma* et *Plasmodium* et XII spécifique de *C. elegans*. Ces protéines sont formées de deux domaines essentiels : 1) la tête de myosine, interagissant avec l'actine et l'ATP, est la partie la mieux conservée 2) la queue, extrêmement variable, ancre la myosine à diverses structures cellulaires comme la membrane. Les têtes de myosine sont constituées d'au moins deux polypeptides : une chaîne lourde de 850 résidus dans lequel se trouve le domaine catalytique de liaison à l'actine et à l'ATP (710 premiers acides aminés) et une ou plusieurs chaînes légères de moins de 200 résidus qui stabilisent et s'enroulent autour de l'hélice α de la chaîne lourde. Les myosines sont des protéines motrices utilisant les filaments d'actine comme support afin de produire un mouvement de traction. Ce mécanisme joue un rôle primordial dans des cellules à activité contractile comme le myocyte.

(2) **Contractilité des fibres d'acto-myosine**

La myosine utilise de manière cyclique l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer sur les filaments d'actines. Dans un premier temps, lors de l'interaction avec l'ATP, la myosine se détache de l'actine. L'ATP est ensuite hydrolysé en ADP + Pi entraînant un changement conformationnel de la myosine en position "armée", prête à produire un mouvement. La myosine se fixe ensuite à l'actine, avec une faible affinité dans un premier temps. Cette affinité augmente lors de la libération du Pi, entraînant un nouveau changement conformationnel et déplaçant ainsi la molécule de myosine. L'ADP est ensuite libéré terminant le cycle (Fig. 12).

b) **La tropomyosine** (voir pour revue Gunning et al., 2005)

(1) **Présentation générale**

Les gènes de tropomyosine ont été caractérisés dans un grand nombre d'organismes eucaryotes. Une grande variété d'isoformes de tropomyosines est créée à partir de plusieurs gènes (quatre chez l'homme et le rat nommés α , β , γ , et δ) grâce à une alternance de l'usage

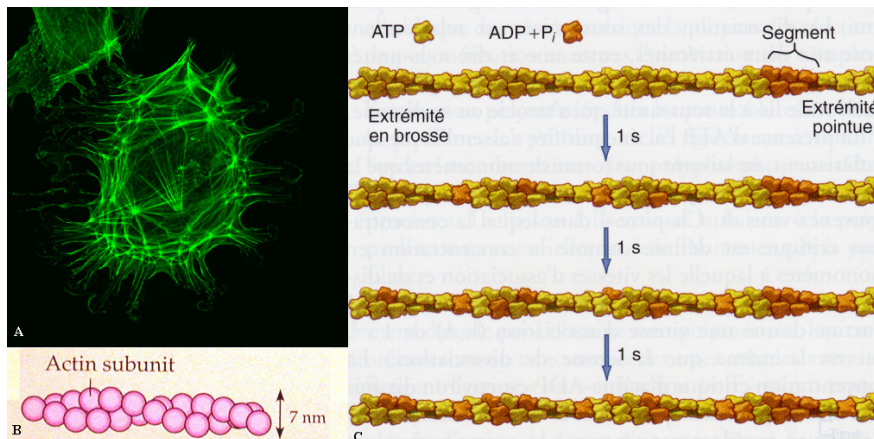


Fig. 10 : Les microfilaments d'actine.

Mise en évidence du réseau d'actine dans un chondrocyte à l'aide d'un marquage à la phalloïdine (A). Représentations schématiques d'un filament d'actine (B) et de sa dynamique lors de l'hydrolyse d'ATP (C).

D'après <http://www.bms.ed.ac.uk/services/impact/pages/Image3.htm> ;
<http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/actin.html> ;
 Pollard et Earnshaw, 2004.

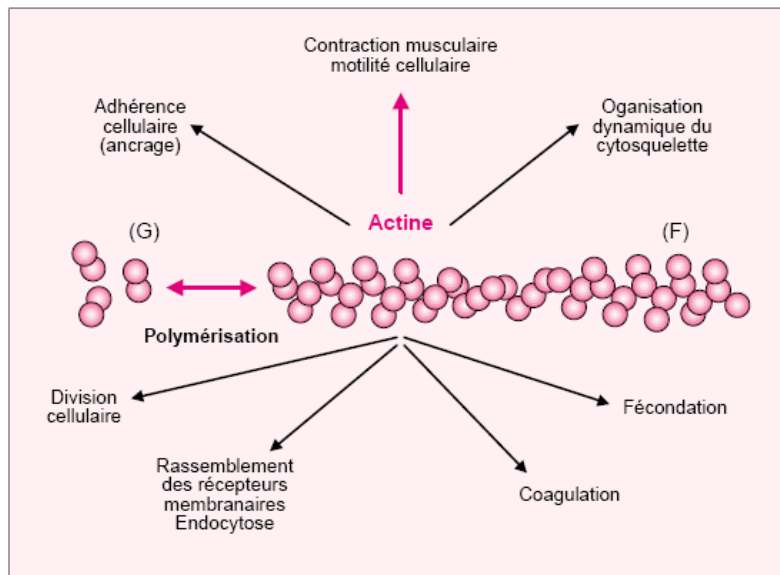


Fig. 11 : L'actine est un carrefour cellulaire incontournable.

Elle participe à de nombreux processus biologiques vitaux tels que la motilité cellulaire, la contraction musculaire et la mise en place du cytosquelette.

D'après Fattoum, 2001.

des promoteurs et des introns. Un même gène, comme α , peut aller jusqu'à coder pour 10 isoformes différentes. Deux grandes classes de tropomyosines, longues (284 acides aminés) et courtes (245 à 251 acides aminés), ont été caractérisées dans une grande variété de tissus. Chaque isoforme joue un rôle spécifique et essentiel dans l'organisation et la fonction des filaments d'actine : par exemple, l'isoforme Tm5NM1 peut stabiliser les filaments d'actine et favoriser l'accrochage de la myosine alors que la forme TmBr3 favorise plutôt le désassemblage et la formation de filaments d'actine de petite taille. La possibilité d'assemblage de ces isoformes en homo- ou hétérodimères est responsable d'un degré supplémentaire de diversité des molécules de tropomyosine. Ces molécules sont assemblées en "tête à queue" avec une conformation en "coiled-coil" pour former des chaînes polypeptidiques enroulées dans les sillons de l'hélice d'actine F, de sorte que chaque molécule de tropomyosine soit en contact soit avec sept (pour les isoformes longues), soit avec six (pour les isoformes courtes) monomères consécutifs d'actine bloquant ainsi le site d'interaction avec la myosine et donc la contraction des fibres d'acto-myosine. Dans des cellules non musculaires de vertébrés le rôle de la tropomyosine se restreint à favoriser la stabilité des filaments d'actine en ralentissant leur dépolymérisation. Cependant, le rôle principal de la tropomyosine est lié à la contraction des fibres d'acto-myosine.

(2) Liaison à la troponine et rôle dans la contraction des fibres d'acto-myosine

La tropomyosine constitue, avec la troponine, un complexe de régulation Ca^{2+} -dépendant localisé sur les filaments d'actine de muscle strié et régulant la contraction musculaire. La troponine est constituée des trois sous-unités : TnC qui fixe le Ca^{2+} et fait partie d'une famille de protéines contenant des domaines EF-hand, dans laquelle on retrouve la calmoduline ; TnI qui se fixe sur l'actine ; TnT qui se fixe sur la tropomyosine, à sa jonction entre sa tête et sa queue. L'interaction de TnC avec le Ca^{2+} , libéré *in vivo* par le reticulum sarcoplasmique après stimulation du muscle, induit des changements conformationnels de cette sous-unité et un déplacement du complexe troponine/tropomyosine exposant ainsi le site d'interaction de la myosine avec l'actine et induisant donc la contraction musculaire (Fig. 13).

D. Relations avec le squelette membranaire

Dans le système érythrocytaire, les filaments d'actine, qui font partie intégrante du cytosquelette sous-membranaire, sont de taille limitée (oligomères). Cette caractéristique serait due à la faible concentration en monomères ainsi qu'à leur association avec des protéines stabilisatrices telles que l'adducine, la tropomoduline ou la tropomyosine (Pinder et Gratzner, 1983 ; Fowler, 1996). La tropomyosine participerait à la régulation de la longueur

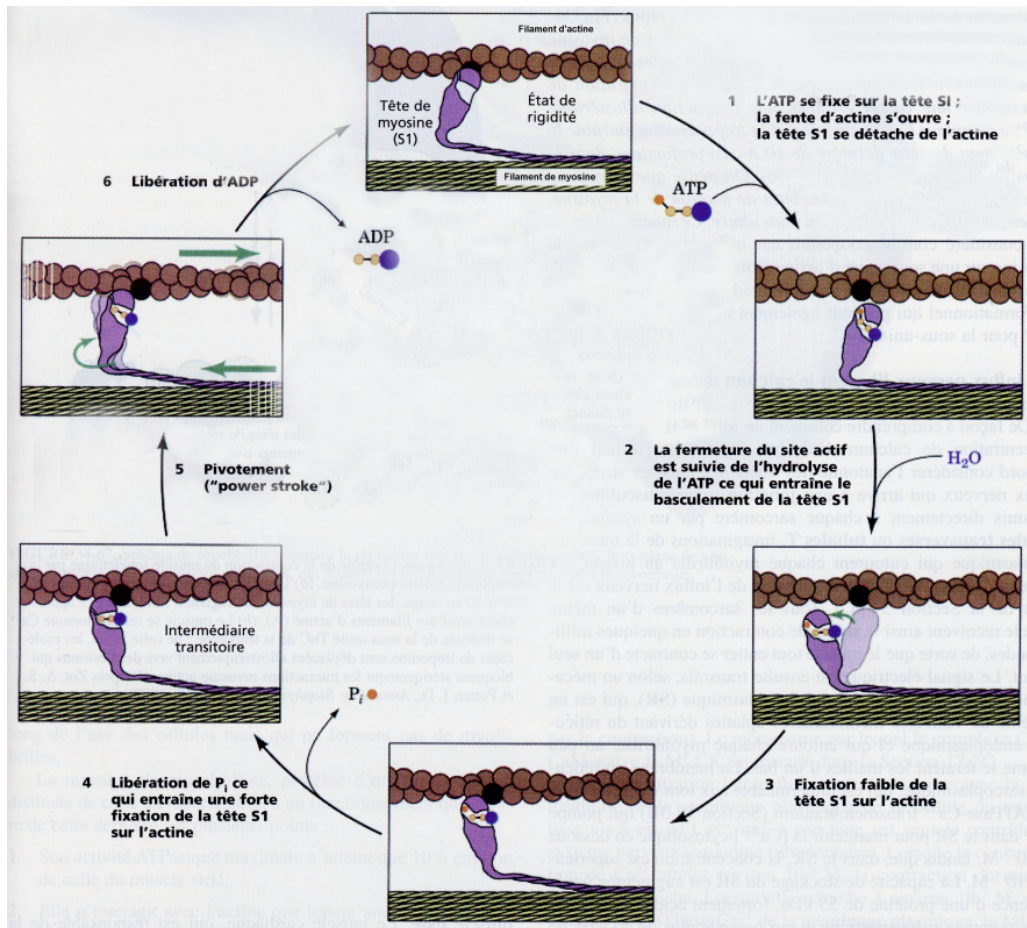


Fig. 12 : Mécanisme de contraction des fibres d'acto-myosine : un processus cyclique de l'hydrolyse d'ATP.

D'après Voet et Voet, 1998.

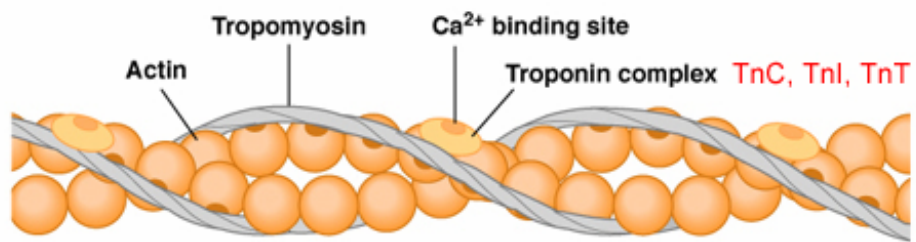
des filaments d'actine en raison de la similarité de la longueur de cette molécule (33 à 34 nm) par rapport à celle des filaments d'actines (environ 37 nm). La myosine interagit aussi avec des composants du squelette membranaire, comme la protéine 4.1 et l'actine, et contrôlerait la forme de la cellule grâce à un mécanisme contractile impliquant des fibres d'acto-myosine (Pasternack et Racusen ; 1989 ; Fowler, 1986).

Les interactions entre microtubules et microfilaments sont nécessaires à la plupart des fonctions cellulaires, en particulier lors de la morphogenèse et le déterminisme de la polarité de la cellule (Etienne-Manneville, 2004). Plusieurs composants du squelette membranaire sont capables d'interagir avec les microtubules ou les filaments intermédiaires. Ainsi, la protéine 4.1 est capable de s'associer avec la tubuline à l'aide d'un motif de 22 acides aminés présent en N-terminal. Cette protéine régule l'organisation des microtubules dans le centrosome en interphase et leur dynamique pendant la mitose (Krauss et al., 2004). Un autre composant du squelette membranaire, l'ankyrine, interagit à la fois avec la tubuline par l'intermédiaire de son domaine N-terminal de 89 kDa ainsi qu'avec un composant des IF : la vimentine (Davis et al., 1991 ; Georgatos et Marchesi, 1985). Suivant le type cellulaire, érythrocytaire ou non, les spectrines, composant majeur du squelette membranaire de métazoaires, sont capables de s'associer à de nombreuses protéines d'IF telles que les neurofilaments ou la vimentine (Langley et Cohen, 1987). Grâce à leurs propriétés de liaison à de nombreux éléments cytosquelettiques, plusieurs IFAP, telles que la plectine ou IFAP300, sont capables d'interagir à la fois avec les microtubules mais aussi avec l' α -spectrine (Herrmann et Wiche, 1987). Ces travaux montrent que les interactions possibles entre squelette membranaire et réseaux cytoplasmiques sont nombreuses et qu'un dialogue entre ces différents composants est nécessaire à leur régulation au cours du cycle cellulaire.

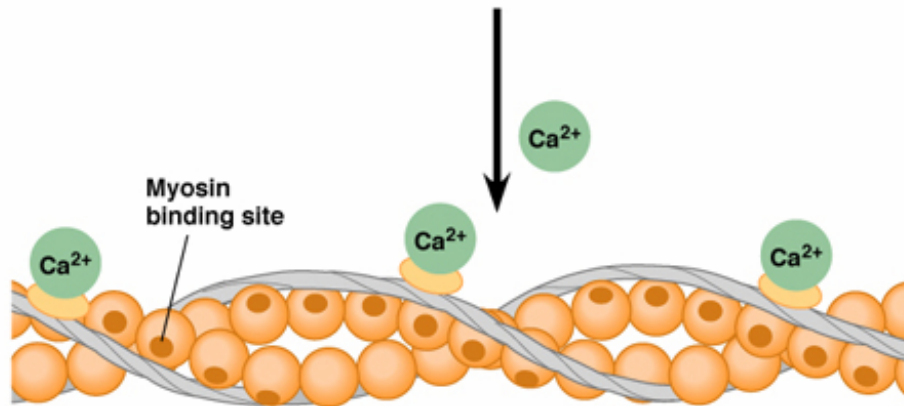
II. Le squelette membranaire chez les métazoaires (voir pour revue Niggli, 1995 ; Bennett et Baines, 2001 ; Gallagher, 2003 ; Baines et Pinder, 2005)

A. Rôle et structure générale

Le squelette membranaire est une composante commune à l'ensemble des cellules de métazoaires. Il constitue le principal élément du cytosquelette dans le système érythrocytaire qui s'est donc avéré comme un modèle de choix pour l'étude de son organisation, de sa composition protéique et de son rôle dans le maintien de la structure et de la fonction de la membrane plasmique. Le squelette membranaire érythrocytaire est formé d'un réseau polygonal de molécules de spectrines lié à de courts filaments d'actine d'environ 37 nm de long (Fig. 14). La longueur et la stabilité de ces filaments sont régulées par des protéines



(a) Myosin binding sites blocked; muscle cannot contract



(b) Myosin binding sites exposed; muscle can contract

Fig. 13 : Contrôle de la contraction des fibres d'acto-myosine par la troponine et la tropomyosine de façon calcium-dépendante.

D'après <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/neuro/49x29.jpg>.

regroupées sous le terme ABP (voir paragraphe I.C.2 Les Actin Binding Protein) comme la spectrine, la protéine 4.1, la protéine 4.2, l'adducine ou encore la tropomoduline. La stabilité du complexe spectrine / actine est régulée par plusieurs protéines (protéine 4.1 ou ankyrine) interagissant avec ce complexe ainsi qu'avec des protéines transmembranaires (échangeur d'anions AE1 ou glycophorine C) permettant de le maintenir en contact avec la membrane plasmique. Cette structure a aussi été étudiée dans de nombreuses cellules non-érythrocytaires et a fait l'objet de nombreuses revues (Niggli, 1995, Bennett et Baines, 2001, Gallagher, 2003). Les études les plus récentes portent plus particulièrement sur le système cardiaque où de nombreuses pathologies sont développées à la suite de mutations dans les gènes de spectrine, protéine 4.1 ou ankyrine (voir pour revue Baines et Pinder, 2005).

B. Composants majeurs du squelette membranaire chez les métazoaires

1. Les spectrines et leurs homologues

a) La spectrine érythrocytaire

Les composants majeurs du squelette membranaire érythrocytaire sont l' α et la β -spectrine. Les sous-unités α et β de la spectrine s'associent latéralement de façon antiparallèle pour former des hétérodimères α/β de 100 nm de long. Les dimères s'assemblent en tétramères de 200 nm de long avec un domaine d'interaction avec l'actine à chaque extrémité (Fig. 15). La caractéristique principale de l' α et la β -spectrine (240 et 220 kDa respectivement) est la présence de multiples répétitions de 106 résidus formant pour la plupart des segments de triple hélice : 20 segments dans l' α -spectrine (domaines 1 à 9 et 11 à 21) et 17 dans la β -spectrine (domaines 2 à 19). La répétition 17 de la β -spectrine interagit avec l'extrémité COOH de l' α -spectrine pour former une structure en triple hélice non covalente.

L' α -spectrine contient un motif SH₃ (src homology domain 3) dans le segment 10 qui est aussi retrouvé dans d'autres protéines cytoplasmiques comme les tyrosine kinases ou la phospholipase C. Ce motif jouerait un rôle dans la transduction de signaux intracellulaires lors de cascades de phosphorylations / déphosphorylations. L' α -spectrine contient deux motifs EF-hand (motif d'interaction avec le calcium) en C-terminal, capables de changer de conformation de façon Ca²⁺ dépendante.

Le domaine d'interaction à l'actine est situé sur l'extrémité N-terminale de la β -spectrine, juxtaposé aux motifs EF-hand de la sous-unité α . Il est formé d'une répétition en tandem de

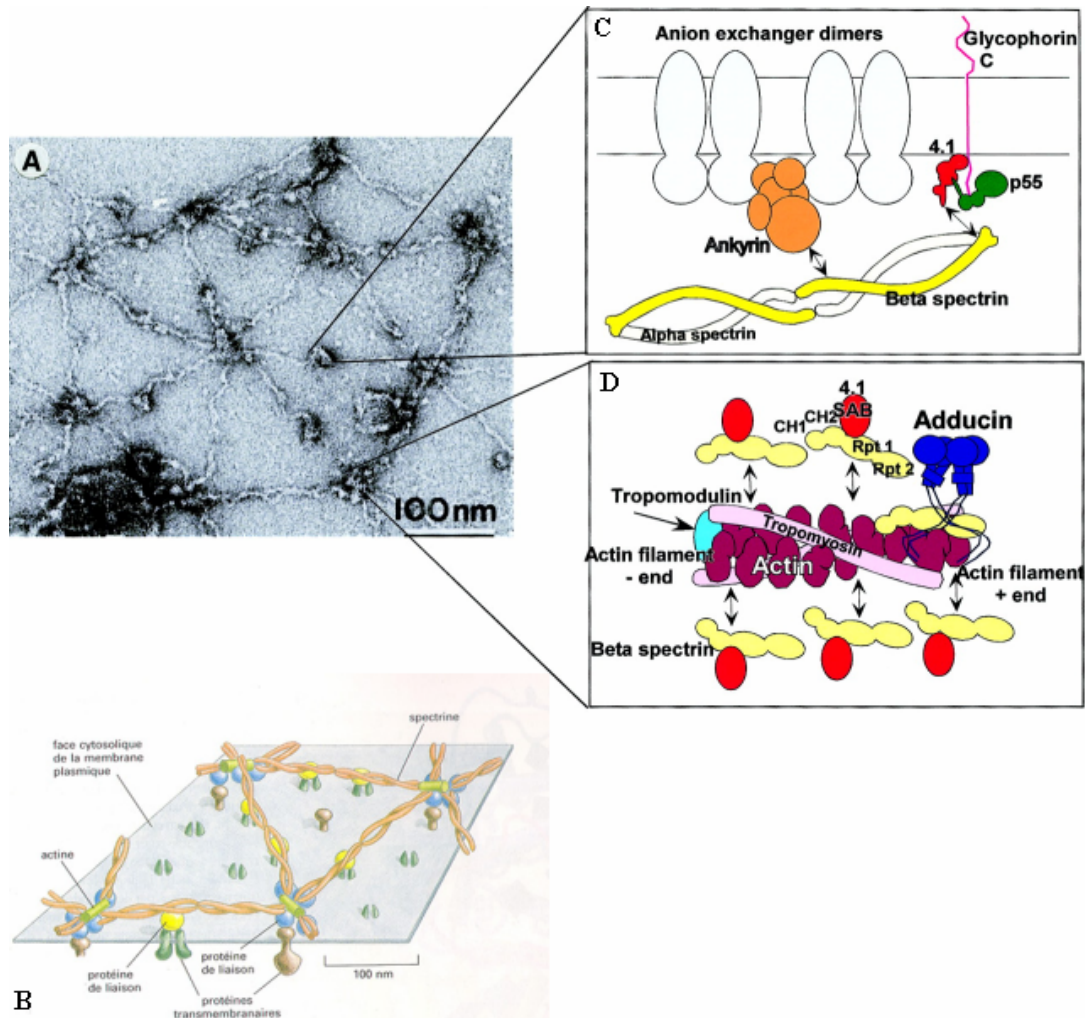


Fig. 14 : Organisation du squelette membranaire d'un érythrocyte.

Observation en microscopie électronique (A) et représentation schématique du réseau cytosquelettique sous-membranaire érythrocytaire (B) impliquant de nombreux composants protéiques dans l'établissement des connections entre le cytosquelette et la membrane (C) ainsi qu'entre la spectrine et l'actine (D).

D'après Bennett et Baines, 2001 et

<http://www.humans.be/bio%20cell%20cytosquelette.html>

deux domaines homologues à la calponine (CH). La plus forte affinité pour l'actine proviendrait du domaine CH1 alors que le domaine CH2, n'interagissant que faiblement avec cette protéine, présenterait une spécificité différente suivant les isoformes d'actine ciblées. Un motif PH homologue à la plekstrine est localisé en C-terminal de la β -spectrine. Une caractéristique générale du motif PH est le rôle dans la signalisation intracellulaire et la proximité avec la membrane plasmique. Le site d'interaction à l'ankyrine a été localisé dans la 15^e répétition de la β -spectrine. Le site d'interaction avec la protéine 4.1 n'a pas encore été identifié mais semblerait se situer dans la région N-terminale de la β -spectrine. Les dimères de spectrines sont nécessaires pour la formation du complexe spectrine-actine-protéine 4.1.

b) Les spectrines non-érythrocytaires (fodrines)

Au moins cinq types différents de β -spectrines ont été identifiés jusqu'à aujourd'hui : la forme érythrocytaire β_R , la forme non-érythrocytaire β_G , la forme β_{NM} limitée aux jonctions neuromusculaires, la forme β_{TW} spécifique à l'épithélium intestinal aviaire et la forme β_H trouvée chez la drosophile. La forme β_G est une forme ubiquitaire alors que la forme β_R n'a été détectée que dans l'érythrocyte, le cerveau et le cœur. Les sous-unités α , β et β_H ont été identifiées, chacune en une copie, dans les génomes de *C. elegans* et *D. melanogaster*. Actuellement, deux sous-unités α (α_1 et α_2), quatre sous-unités β (β_1 , β_2 , β_3 et β_4) et une sous-unité β_H ont été caractérisées chez l'homme. La sous-unité α non-érythrocytaire humaine peut se combiner avec différentes isoformes de sous-unités β favorisant ainsi la diversité fonctionnelle dans la famille des spectrines. La longueur de l'extrémité C-terminale des sous-unités β_1 , β_2 et β_4 peut varier du fait de l'épissage alternatif de leur ARNm, assurant ainsi une diversité supplémentaire au sein des spectrines. Des promoteurs distincts contrôlent l'expression des isoformes de spectrine de façon tissu-spécifique.

Les spectrines non-érythrocytaires sont des protéines semblables à la forme érythrocytaire avec cependant quelques différences (Fig. 15). Ces protéines sont composées de deux sous-unités non-identiques α et β formées de répétitions de 106 résidus qui ont gardé la capacité à interagir avec l'actine, l'ankyrine et la protéine 4.1. Cependant la sous-unité α_2 de vertébrés a acquis la capacité d'interagir avec la calmoduline grâce à un motif de 24 acides aminés situé entre les domaines 11 et 12, exception faite pour la forme humaine (Sahr et al., 1990). De plus, les fodrines peuvent être couplées à la membrane plasmique soit par l'intermédiaire d'autres protéines (ankyrines ou protéine 4.1) soit par interaction directe avec la membrane plasmique. Deux sites d'interaction à la membrane ont été caractérisés dans la séquence de la β -spectrine : l'un en N-terminal, régulé par la calmoduline, et l'autre en C-terminal, incluant le motif PH.

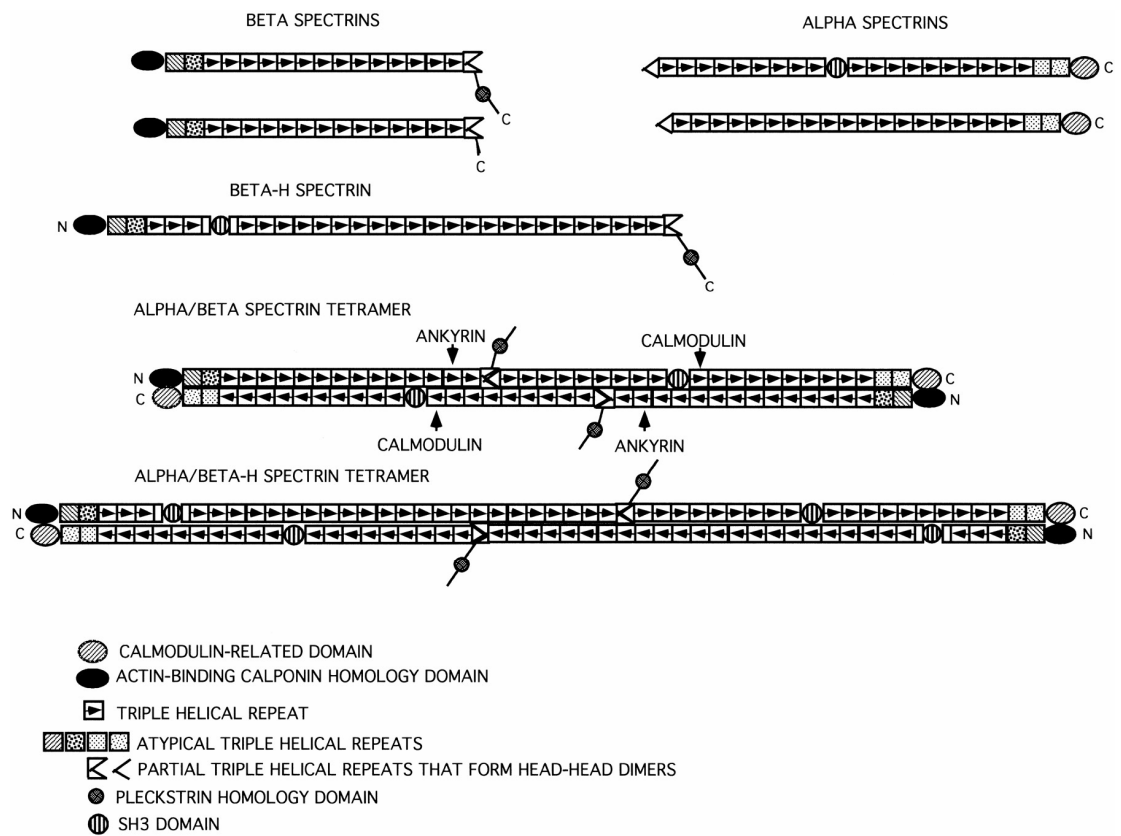


Fig. 15 : Structures des monomères et tétramères de spectrines.

D'après Bennett et Baines, 2001.

c) La famille des spectrines

Toute protéine contenant des domaines CH en N-terminal, des domaines EF-hand en C-terminal et des domaines formant des triple hélices fait partie la famille des spectrines. Les protéines présentant ces caractéristiques sont l' α -actinine (environ 100 kDa), la dystrophine (427 kDa) et l'utrophine (400 kDa).

La dystrophine et l'utrophine (Fig. 16), localisées principalement dans les cellules musculaires, sont des monomères composés respectivement de 24 et 22 répétitions de 120 acides aminés et d'une extrémité C-terminale riche en cystéines qui leur est propre. L'absence de la dystrophine chez l'homme est la cause d'une myopathie progressive létale : la dystrophie musculaire de Duchenne. Aucune maladie n'a été associée à l'absence d'utrophine. L' α -actinine est exprimée dans de nombreux sites d'adhésion cellulaires comme les hémidesmosomes ou les jonctions d'adhérences. Elle interagit avec le domaine cytoplasmique de nombreuses protéines transmembranaires ainsi qu'avec des molécules impliquées dans la transduction du signal. L' α -actinine (Fig. 16) est une protéine ubiquitaire qui contient, en un seul polypeptide le domaine C-terminal de l' α -spectrine (deux dernières répétitions et les domaines EF-hand) et le domaine N-terminal de la β -spectrine (deux premières répétitions et domaines CH). Ces caractéristiques insistent à penser que l' α et la β spectrine auraient évolué à partir d'une protéine ancestrale apparentée à l' α -actinine (Fig. 17 ; Viel, 1999).

2. L'ankyrine (voir pour revue Rubtsov et Lopina, 2000)

Les ankyrines sont des monomères de forme globulaire de 190 à 220 kDa. Elles ont un rôle d'adaptateur entre les protéines transmembranaires et le réseau de spectrines. Grâce à un domaine N-terminal de 89 kDa l'ankyrine interagit avec de nombreux types de protéines transmembranaires mais avec une affinité relativement faible : les échangeurs d'anions (AE1, AE2, AE3), les protéines des canaux sodiques, les ATPases Na/K, les protéines d'adhésion cellulaire (CAMs), les récepteurs membranaires et la protéine kinase C (PKC). Ce domaine N-terminal est de forme sphérique et présente 24 copies contiguës d'un motif de 33 acides aminés, appelé ANK impliqué dans la reconnaissance d'un large spectre de protéines et dans la diversification des partenaires de l'ankyrine. Deux autres domaines ont été identifiés : un domaine central de 62 kDa riche en proline qui interagit avec la spectrine et un domaine régulateur de 50 à 55 kDa localisé en C-terminal, plus variable en composition, qui contrôle l'interaction de l'ankyrine avec la spectrine et les protéines transmembranaires.

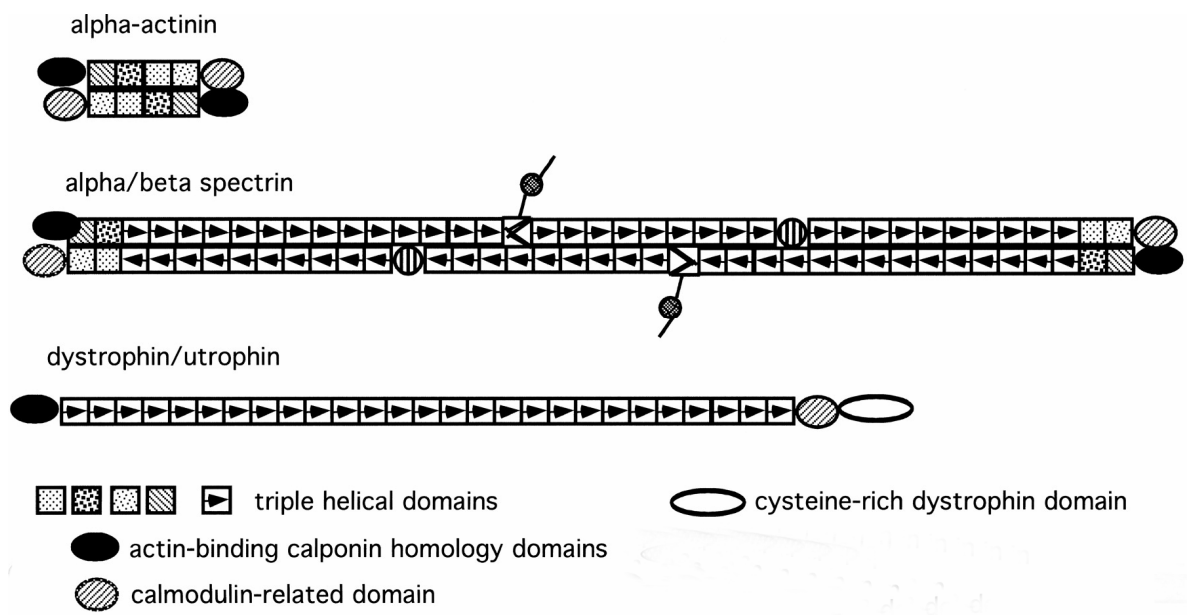


Fig. 16 : Structure des protéines membres de la famille des spectrines.

D'après Bennett et Baines, 2001.

L'ankyrine, et ses isoformes, sont des protéines exprimées dans de nombreux tissus. Trois types d'ankyrines ont été caractérisés : l'isoforme érythrocytaire, aussi présente dans le cerveau, appelée Ankyrine_R ou Ankyrine1, l'isoforme majeure du cerveau exprimée dans de nombreux autres tissus, appelée Ankyrine_B ou Ankyrine2 et l'isoforme limitée aux nœuds de Ranvier et aux cellules épithéliales, appelée Ankyrine_G ou Ankyrine3 (Fig. 18). L'ankyrine_B interagit avec la spectrine β_G et l'ankyrine_R avec la spectrine β_R . Grâce à un mécanisme d'épissage alternatif, les isoformes d'ankyrine_B et d'ankyrine_G peuvent avoir jusqu'à 2500 acides aminés insérés entre le domaine de liaison à la spectrine et le domaine régulateur, formant ainsi des isoformes de fort poids moléculaire allant de 270 à 480 kDa abondamment exprimées dans les axones. Certaines autres isoformes ont, au contraire, perdu un ou plusieurs domaines fonctionnels. Ces ankyrines sont de faible poids moléculaire allant (26 à 119 kDa) et sont associées aux organelles comme l'appareil de Golgi, le lysosome ou le reticulum endoplasmique où de nombreux autres constituants cytosquelettiques sont également présents. L'utilisation alternée de différents promoteurs permet l'expression de chaque isoforme d'ankyrine de façon tissu-spécifique.

3. La protéine 4.1

Le rôle de la protéine 4.1 érythrocytaire, de masse moléculaire de 78 à 80 kDa, ainsi que d'autres ABP comme l'adducine, est de stabiliser le complexe spectrine/actine. Parmi les domaines identifiés dans la protéine 4.1, une partie N-terminale de 30 kDa, appelée domaine FERM, est impliquée dans l'interaction avec les glycophorines A et C, la guanylate kinase p55, l'échangeur d'anions AE1 et la calmoduline. Ce domaine FERM est composé de 3 lobes (Bennett et Baines, 2001) : le premier en N-terminal impliqué dans la liaison avec l'échangeur d'anions AE1, le second central interagissant avec la glycophorine C et le dernier en C-terminal liant la p55. La glycophorine C serait le partenaire majeur de la protéine 4.1 *in vivo*. En présence de calmoduline et de Ca^{2+} , la liaison de la protéine 4.1 avec la glycophorine C et la p55 est inhibée (Nunomura et al., 2000). Un domaine interne fortement chargé de 10 kDa, appelé SAB (Spectrin Actin Binding), est essentiel à la formation du complexe ternaire spectrine-protéine 4.1-actine. Ce domaine serait aussi impliqué dans la liaison de la myosine avec la membrane érythrocytaire.

Trois gènes homologues à la protéine 4.1 érythrocytaire (4.1R), dont les produits d'expression sont nommés 4.1G, 4.1B et 4.1N, ont été identifiés chez l'homme et la souris (Fig. 19). Un seul gène de protéine 4.1 est présent chez *C. elegans* et *D. melanogaster*. La protéine 4.1 de drosophile, appelée coracle, se distingue des protéines 4.1 de mammifère par l'absence du domaine SAB. L'ARNm de 4.1R est surtout présent dans les tissus hématopoïétiques comme la moelle osseuse. L'isoforme 4.1G est exprimée dans de nombreux tissus alors que 4.1B et

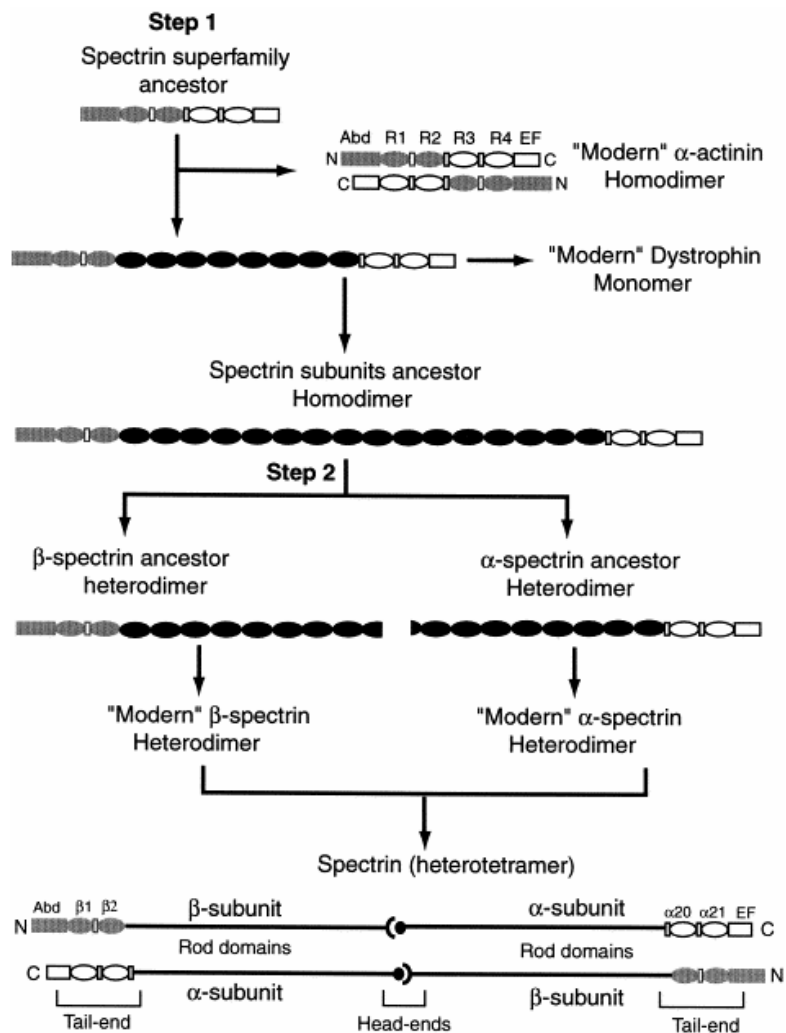


Fig. 17 : Modèle expliquant l'évolution des protéines au sein de la famille des spectrines.

Étape 1 (Step 1) : une duplication d'un gène d' α -actinine ancestrale aurait été nécessaire pour former l' α -actinine homodimérique "moderne". Les molécules ancestrales d' α -actinine auraient alors été allongées par insertion de plusieurs répétitions pour donner les monomères de dystrophine.

Étape 2 (Step 2) : ce gène de longue taille aurait été scindé en deux gènes fonctionnels codant chacun pour une sous-unité différente de spectrine (α et β).

Daprès Viel, 1999.

4.1N sont surtout exprimées dans le cerveau. Tout comme la spectrine et l'ankyrine, les gènes de protéines 4.1 utilisent des promoteurs différents suivant leur expression dans des cellules érythrocytaires ou non. La diversité des protéines 4.1 est due à des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles ainsi qu'à un épissage alternatif formant une variabilité dans le domaine de liaison à la spectrine et en N-terminal de leurs ARNm. De multiples isoformes de protéines 4.1 de tailles variables (entre 30 et 210 kDa) sont exprimées dans de nombreuses cellules non-érythrocytaires d'oiseaux, d'amphibiens ou de mammifères (Kreis et Vale, 1999).

Une famille de protéines apparentées aux protéines 4.1, comprenant notamment l'eitrine, la radixine et la moesine, a été identifiée et nommée famille ERM (Eitrine Radixine Moesine). Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence des domaines FERM et SAB caractéristiques de la protéine 4.1. L'eitrine, la radixine et la moesine, de poids moléculaires apparents respectifs 81, 80 et 77 kDa, sont exprimées spécifiquement dans des structures à base d'actine comme les microvilli, les filopodes, les adhésions cellule/substrat et cellule/cellule ou dans le sillon de division. Bien que les protéines ERM soient présentes dans la plupart des types cellulaires, leur expression varie considérablement d'un tissu à l'autre : par exemple, l'eitrine est enrichie dans les cellules épithéliales alors que la moesine est particulièrement bien représentée dans l'endothélium (Kreis et Vale, 1999).

4. La protéine 4.2

La protéine 4.2 est une protéine majeure du squelette membranaire érythrocytaire de 77 kDa dont diverses formes immunoréactives ont été décelées au niveau de fractions de membrane plasmique de plaquettes, de cerveau ou de rein. Grâce à son association avec la membrane ainsi qu'avec l'échangeur d'anions AE1, la protéine p55, l'ankyrine et la protéine 4.1, cette protéine serait impliquée dans le maintien de la stabilité du squelette membranaire des globules rouges. La myristylation de la protéine 4.2 est responsable de la stabilisation de ces interactions. L'analyse de sa séquence a révélé une homologie inattendue avec la transglutaminase. N'ayant aucune d'activité enzymatique, la protéine 4.2 s'associerait à des cibles de la transglutaminase et les protégerait de l'activité de cette enzyme (Niggli, 1995).

5. L'adducine

L'adducine favorise l'association de la spectrine à l'extrémité barbue des filaments d'actine et est ainsi responsable de la formation d'un complexe ternaire adducine/spectrine/actine. Cependant, l'adducine peut bloquer l'élongation et la dépolymérisation à l'extrémité barbue de l'actine F contribuant ainsi à la stabilisation et à la régulation de la taille des filaments (Fowler, 1996). Chez l'homme et le rongeur, l'adducine comprend 3 sous-unités α (103 kDa),

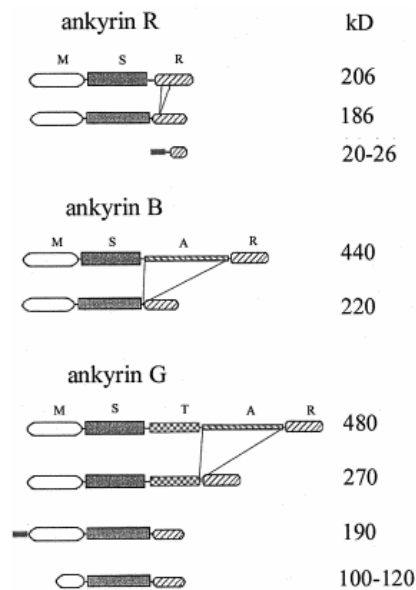


Fig. 18 : Structure des isoformes d'ankyrine.

M : domaine de liaison à la membrane ; **A** : domaine d'extension ; **S** : domaine de liaison à la spectrine ; **T** : domaine riche en résidus sérine et thréonine ; **R** : domaine régulateur.

D'après Rubtsov et Lopina, 2000.

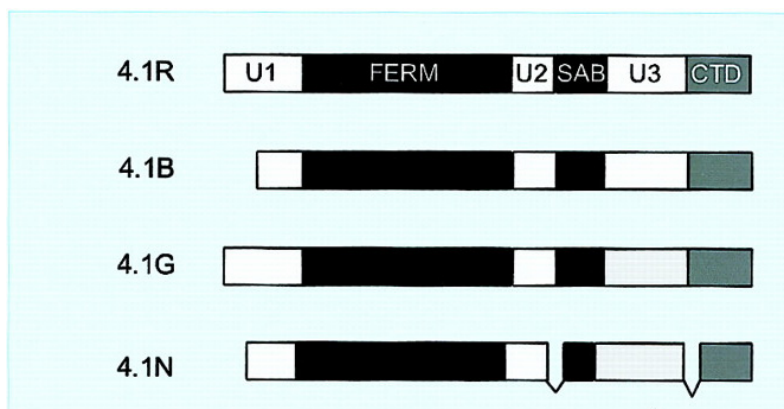


Fig. 19 : Structure des protéines 4.1 de mammifère (4.1R, 4.1B, 4.1G et 4.1N).

U1, U2 et U3 : domaines non-conservés ; **FERM** : domaine de liaison aux protéines et aux lipides commun à l'e-zrine, la radixine et la moesine ; **SAB** : domaine de liaison à l'actine ; **CTD** : domaine C-terminal.

D'après Bennett et Baines, 2001.

β (97 kDa) et γ (90 kDa), codées respectivement par les gènes *ADD1*, *ADD2* et *ADD3*. Chaque sous-unité d'adducine contient en N-terminal un domaine globulaire participant à l'interaction des sous-unités, un domaine nommé "cou" qui favorise la formation d'oligomères, un domaine nommé "queue" non-structuré et un domaine C-terminal montrant une homologie avec le domaine de la famille des MARCKS (Myristolated Alanine Rich C Kinase Substrate). Ce dernier domaine assure l'interaction avec le complexe spectrine/actine. Il comprend aussi un site de phosphorylation pour la PKC ainsi qu'un site d'interaction avec le complexe calmoduline/ Ca^{2+} (Fig. 20). L'activité d'assemblage de l'adducine impliquant la spectrine et l'actine est inhibée par l'interaction avec le complexe calmoduline/ Ca^{2+} ou la phosphorylation par la PKC. Dans la cellule, l'adducine se présente sous forme de dimères et de tétramères. Dans l'érythrocyte, cette protéine est uniquement formée du complexe α/β alors que dans les autres cellules une combinaison des complexes α/β et α/γ est observée.

6. La tropomoduline (voir pour revue Fischer et Fowler, 2003)

La tropomoduline est une protéine de 40 kDa qui est capable de stabiliser et de réguler la taille des filaments d'actine en bloquant l'assemblage/désassemblage de monomères à l'extrémité pointue. Cette activité de coiffe a été caractérisée dans deux régions (Fig. 21) : une région en N-terminal non structurée interagissant aussi avec un domaine N-terminal de la tropomyosine et une région à l'extrémité C-terminale contenue dans un domaine riche en leucine. L'activité de coiffe de la région N-terminale est accrue lorsque la tropomyosine est associée au filament d'actine. La région en C-terminal coiffe le filament d'actine de manière tropomyosine-indépendante et, comme la protéine entière, est capable de nucléer l'assemblage de filaments d'actines.

Les gènes codant pour la tropomoduline sont présents dans une grande variété d'espèces de métazoaires de la drosophile à l'homme. Chez les vertébrés, quatre isoformes canoniques (Tmod1, Tmod2, Tmod3 et Tmod4) et deux plus longues appelées leiomodines (Lmod1 et Lmod2) ont été caractérisées. Bien que Tmod1 et Tmod3 soient présents dans de nombreux tissus, l'expression de Tmod2 et Tmod4 est respectivement limitée aux neurones et aux muscles squelettiques. De plus, aucune isoforme de Tmod n'a été détectée dans les fibroblastes.

Les protéines du squelette membranaire sont conservées et caractéristiques de la plupart des métazoaires : par exemple, les spectrines de *D. melanogaster*, *C. elegans* et des vertébrés présentent 50 à 60% de similarité entre elles, avec certaines régions présentant jusqu'à 70 à 80% d'identité. Malgré l'absence de gènes de spectrines dans les génomes des plantes et de *S. cerevisiae*, des réactions immunologiques croisées ont été mises en évidence chez ces

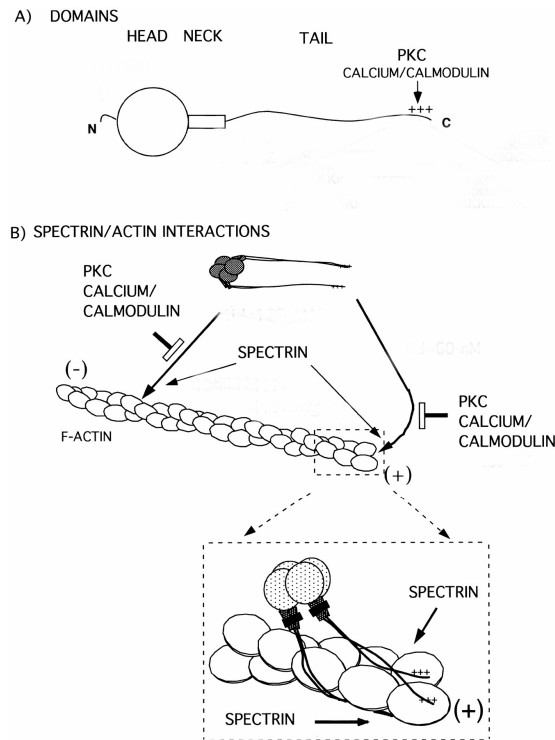


Fig. 20 : Structure de l'adducine (A) et associations avec la spectrine et l'actine (B).

D'après Bennett et Baines, 2001.

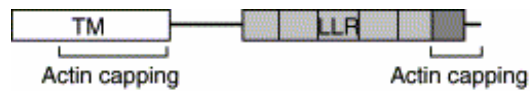


Fig. 21 : Structure des tropomodulines.

Le domaine TM interagissant avec la tropomyosine et le domaine LLR riche en leucine comportent chacun un motif de coiffe des filaments d'actine.

D'après Fischer et Fowler, 2003.

organismes suggérant la présence de protéines apparentées (Michaud et al., 1991 ; Slaninova et al., 2003). Des protéines immunoanalogues de spectrines ont aussi été caractérisées dans plusieurs micro-organismes eucaryotes tels que *Dictyostelium* (Bennett et Condeelis, 1988) *Acanthamoeba* (Pollard, 1984), *Trypanosoma* (Schneider et al., 1988) et *Paramecium* (Kwiatkowska et Sobota, 1992). De plus, le parasite *Leishmania* présente des protéines apparentées à la fois aux spectrines mais aussi aux ankyrines (Dagger et al., 1988-1989). En dépit de l'absence de données de séquences, ces résultats suggèrent la présence de protéines ancestrales de spectrines et aussi d'ankyrines chez ces micro-organismes. Les données concernant la composition du cytosquelette des protozoaires ciliés semblent beaucoup plus complexes en raison de l'identification de nouvelles protéines jusqu'alors inconnues chez les organismes pluricellulaires.

PARTIE II

Le cytosquelette cortical chez les protozoaires ciliés

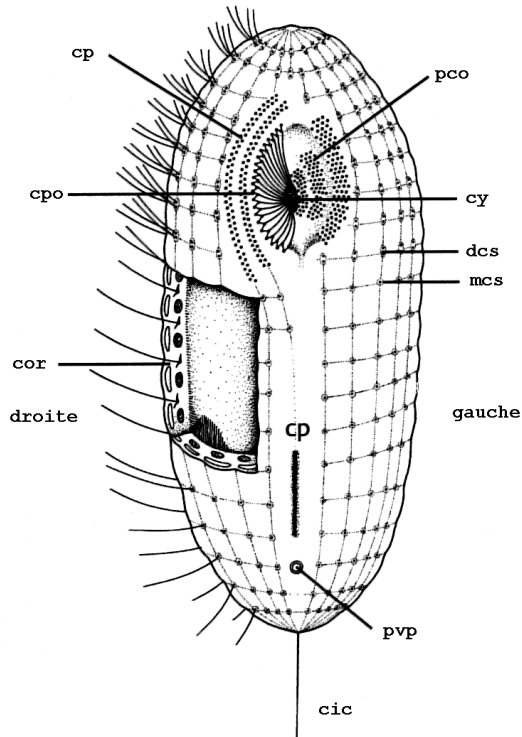


Fig. 22 : Représentation schématique idéalisée d'un Cilié (face ventrale).

Cic : cil caudal, **cor** : cortex (alvéoles, réseaux filamenteux et mitochondries), **Cp** : cytoprocte ou cytopyge, **cy** : cytostome, **pco** : polycinétides orales, **pvp** : pore de la vacuole pulsatile, **cpo** : cinéties péri-orales, **dcs** : dicinétides somatiques, **mcs** : monocinétides somatiques.

D'après Haussmann et Hülsmann, 1996.

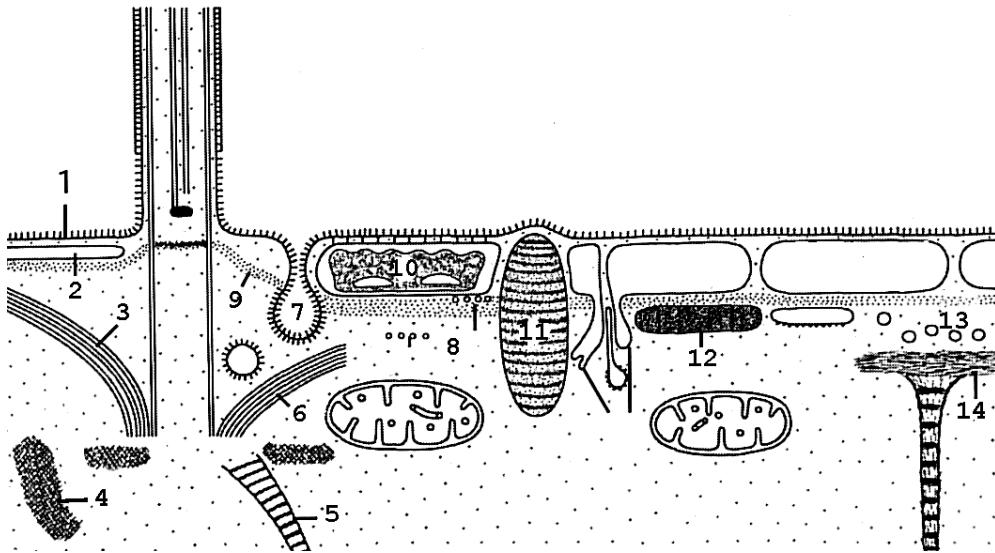


Fig 23 : Représentation schématique des principales structures corticales chez les Ciliés.

1 membrane plasmique, **2** alvéoles, **3** microtubules postcilliaires, **4** myonèmes, **5** fibre cinétodesmale, **6** microtubules transverses, **7** sacs parasomaux, **8** microtubules longitudinaux, **9** épiplasma, **10** épiplasma alvéolaire, **11** extrusome, **12** réserves polysaccharidiques, **13** vésicules, **14** faisceau de filaments.

D'après Haussmann et Hülsmann, 1996.

Le cytosquelette cortical chez les protozoaires ciliés

Au-delà de leur unicellularité, la plupart des protistes se distinguent des cellules d'organismes métazoaires par la présence d'une armature cytosquelettique extrêmement complexe au niveau du cortex. Certains constituants du cytosquelette cortical des protistes sont communs au cytosquelette des métazoaires. C'est le cas des systèmes microtubulaires qui sont particulièrement développés dans la région corticale des ciliés (e.g. *Paramecium* et *Tetrahymena*) et de certains protozoaires parasites (e.g. *Trypanosoma* et *Toxoplasma*). C'est également le cas des réseaux microfilamenteux à base d'actine qui, chez les amibes, participent au maintien de la forme et à la déformation active de la cellule.

C'est de toute évidence chez les ciliés que le cytosquelette cortical et sa dynamique ont été principalement étudiés. L'une des particularités du cortex des ciliés est sa partition en deux régions (Fig. 22 et 23) ; l'une majeure, dite somatique, impliquée dans la locomotion ou le maintien de la forme générale de la cellule ; l'autre qualifiée de région orale (ou appareil oral) qui permet l'acquisition et l'ingestion des nutriments. Dans ce chapitre, nous procédons à un rappel des principales données de la littérature concernant la nature des éléments cytosquelettiques présents dans ces deux régions, leurs fonctions présumées et leurs contributions aux processus de morphogénèse qui accompagnent la division.

I. Le cytosquelette du cortex somatique

A. Le système de microfilaments : l'exemple du processus de cytokinèse chez *Tetrahymena* (voir pour revue Numata et Gonda, 2001)

Suite à la division du micronoyau, une protéine de 85 kDa, caractéristique de *Tetrahymena* et nommée p85, apparaît dans le domaine présomptif du sillon de division. Cet événement, précédant la division du macronoyau et l'apparition de l'actine en forme d'anneau en région équatoriale, serait l'un des plus précoces dans le processus de cytokinèse chez *Tetrahymena*. Le groupe du Dr. O. Numata a montré que la protéine p85 interagit directement de façon Ca^{2+}

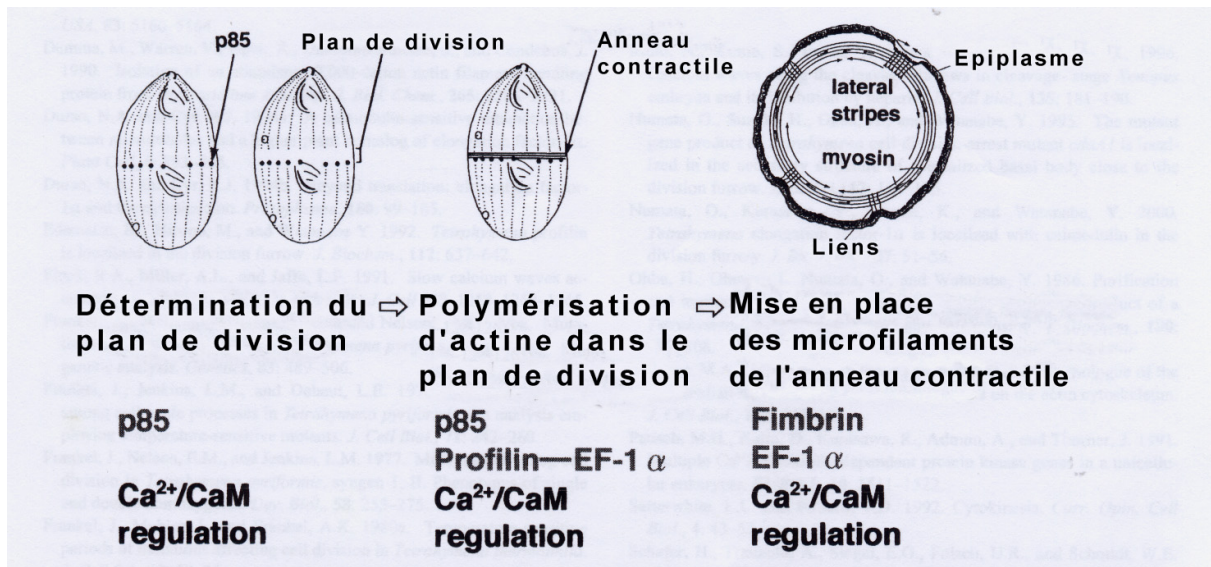


Fig. 24 : Assemblage de l'anneau contractile chez *Tetrahymena*.

Dans un premier temps, la protéine p85 se localise dans la région présumptive du sillon de division. La détermination du plan de division est régulée par la protéine p85 et le complexe Ca²⁺/CaM.

La protéine p85 interagit ensuite avec les monomères d'actine et semble initier la polymérisation d'actine. La profiline interagit avec le facteur EF-1α et régule également la polymérisation d'actine.

Enfin, le facteur EF-1α et la fimbrine induisent l'assemblage des microfilaments en un anneau contractile. La capacité du facteur EF-1α à assembler les filaments d'actine est régulée par le complexe Ca²⁺/CaM. Le schéma de droite montre une coupe transversale de l'anneau contractile.

D'après Numata et Gonda, 2001.

dépendante avec la calmoduline (CaM) et de façon Ca^{2+} /CaM dépendante avec l'actine G. Des expériences de traitement par un inhibiteur du complexe Ca^{2+} /CaM (W7) ont montré que ce complexe est indispensable à l'ancrage de la protéine p85 dans le territoire présomptif du sillon de division pendant la cytokinèse. L'ensemble $\text{p85}/\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ aurait ainsi un rôle à la fois dans la mise en place du sillon de division et la formation de l'anneau contractile dans la cytokinèse chez *Tetrahymena*. En immunofluorescence, Hirono et al. (1987) ont mis en évidence la présence d'actine dans l'anneau contractile chez *Tetrahymena*. La profiline, une protéine de type ABP impliquée dans la séquestration des monomères d'actine, a également été détectée dans le sillon de division chez *Tetrahymena*. A l'aide d'une approche ARN antisens, Wilkes et Otto (2003) ont montré que cette protéine joue un rôle important dans la stomatogénèse et dans les étapes précoces et tardives du processus de cytokinèse. La profiline interagirait indirectement avec l'actine F par l'intermédiaire du facteur EF-1 α (Elongation Factor 1 α) qui co-sédimente avec les filaments d'actine et possède la capacité de les interconnecter. L'inhibition de cette activité en présence du complexe Ca^{2+} /CaM qui interagit directement avec la protéine EF-1 α , permettrait, selon Numata et Gonda (2001), de favoriser l'association des filaments d'actine à d'autres protéines comme la myosine. En raison de la présence de myosines non-conventionnelles dans le génome de *Tetrahymena* (Williams et Gavin, 2005), il est concevable que l'anneau contractile de cet organisme soit formé de fibres d'acto-myosine. Les deux éléments, Ca^{2+} /CaM et EF-1 α , sont localisés dans les axonèmes, une structure en croissant de l'appareil oral, l'anneau apical ainsi que dans le sillon de division au cours de la cytokinèse (Ueno et al., 2003). La fimbrine, une seconde protéine de type ABP, a également été détectée dans ces structures, à l'exception des axonèmes (Shirayawa et Numata, 2003). Cette protéine s'associe de façon Ca^{2+} indépendante avec l'actine et possède une activité d'assemblage des filaments d'actine qui serait essentielle à la formation de l'anneau contractile pendant la division cellulaire. La figure 24 résume les principales étapes d'assemblages protéiques dans le sillon de division lors de la cytokinèse chez *Tetrahymena*. Il est à noter que le facteur EF-1 α est présent chez *Paramecium caudatum* et co-localiserait également avec la CaM dans les cils de cet organisme.

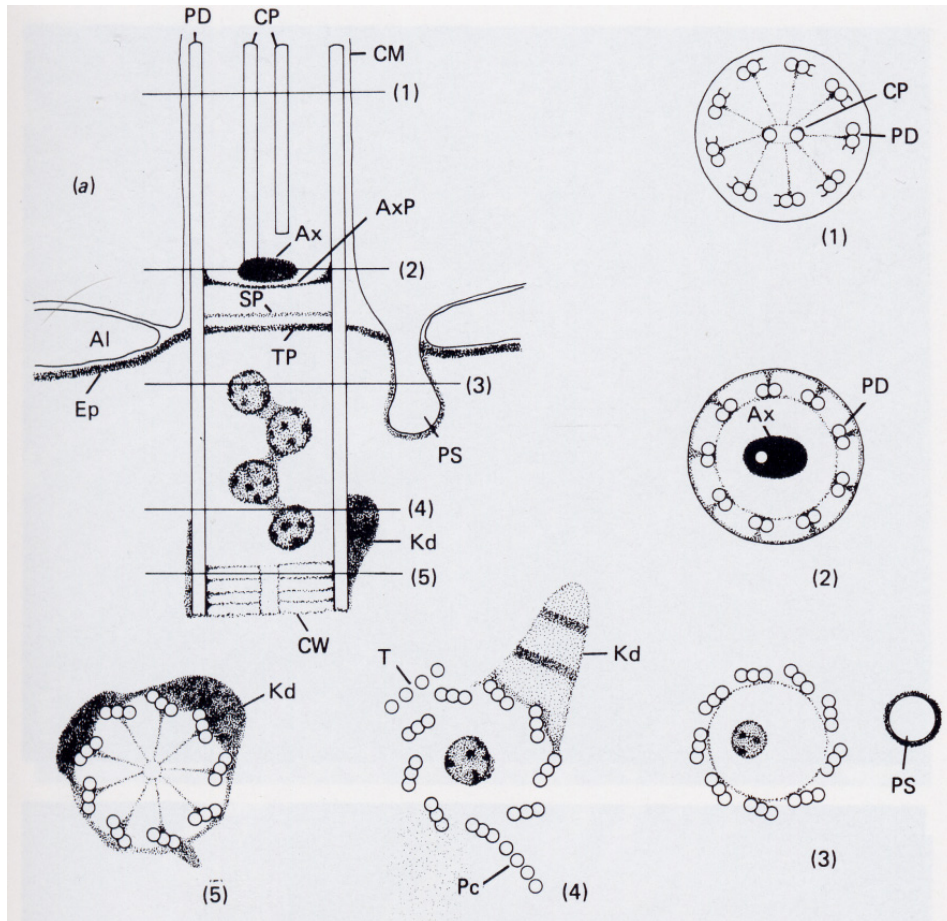


Fig . 25 : Coupes longitudinale (a) et transversales (1-5) de cil et cinétosome de cilié.

CW : cartwheel ; **TP** : plaque terminale ; **Ep** : épiplasma ; **Al** : alvéole ; **SP** : plaque secondaire ; **AxP** : plaque axosomale ; **PD** : doublet de microtubules périphériques de l'axonème ; **CP** : paire de microtubules centraux ; **Ax** : axosome ; **CM** : membrane plasmique ; **T** microtubules transverses ; **Pc** : microtubules post-ciliaires ; **Kd** : fibre cinétodesmale ; **PS** : sac parosomal.

D'après Small et Lynn., 1985.

B. Les systèmes microtubulaires chez les modèles *Tetrahymena* et *Paramecium*

Comme dans le cas des cellules d'organismes de métazoaires, le cytoplasme des protozoaires ciliés renferme un réseau dynamique de microtubules assurant le déplacement des organites pendant l'interphase. Ce réseau s'organise aussi en fuseaux mitotiques au cours de la division et forme le cytofuseau cortical et le fuseau intranucléaire (Cohen et Beisson, 1988). Cependant, dans ces organismes, la majeure partie des structures microtubulaire est localisée au niveau cortical, dans les cils organisés en rangées parallèles appelées cinéties. Les cils sont constitués de 9 doublets de microtubules périphériques et d'un doublet central (Fig. 25). A la base des cils se trouvent les cinétosomes ou corps basaux dont le rôle est d'assurer la nucléation des microtubules de l'axonème. Tout comme les centrioles de cellules de métazoaires, les corps basaux résultent de la juxtaposition de 9 triplets périphériques de microtubules (un complet, le tubule A et deux incomplets les tubules B et C formés de 10 protofilaments seulement). Les tubules A, B et C ne sont pas équivalents et confèrent aux corps basaux, indépendamment de leur polarité proximo-distale, une asymétrie périphérique qui est nécessaire à plusieurs de leurs fonctions (Beisson et Jerka-Dziadosz, 1999). Dans la zone profonde du corps basal, dite zone du cartwheel, de fins rayons relient la partie centrale du cinétosome à chacun des triplets (Fig. 25). La zone de transition entre le cinétosome et l'axonème, appelée plaque terminale, se situe à la jonction des membranes alvéolaires internes et externes. Cette dernière, reliée au squelette membranaire aussi appelé épiplasma chez les protozoaires ciliés, est percée de 9 orifices correspondant au passage des tubules A et B de chaque triplet se prolongeant dans les cils (Fig. 25). Le cinétosome est associé à plusieurs racines ciliaires qui, à l'exception des fibres cinétodesmales, sont toutes de nature microtubulaire. Grâce à une étroite association avec l'épiplasma à leur extrémité distale, ces fibres contribuent à l'implantation et à l'orientation du cinétosome et donc du cil à la périphérie de la cellule (Fig. 25).

Tetrahymena et *Paramecium* possèdent respectivement un et deux gènes de γ -tubuline codant pour des protéines de 50 kDa ayant un rôle central dans la duplication des corps basaux, ainsi que dans leur maintenance dans le cas de *Tetrahymena*. Dans ces deux organismes, ces protéines sont localisées dans les corps basaux, le micronoyau, les pores des vacuoles contractiles et le macronoyau dont l'immunomarquage est révélé seulement de façon

transitoire lors de la division chez la paramécie (Shang et al., 2002b ; Ruiz et al., 1999). De nombreux gènes de tubulines ont récemment été découverts dans cet organisme tels que la δ - (delta), l' ϵ - (epsilon) ou la η - (eta) tubuline. La δ -tubuline aurait un rôle dans l'assemblage du tubule C et l' ϵ -tubuline dans l'assemblage et l'ancrage des tubules B et C dans les corps basaux (Garreau de Loubresse et al., 2001 ; Dupuis-Williams et al., 2002). L'isotype η , serait essentiel à duplication des corps basaux et la localisation de la γ -tubuline (Ruiz et al., 2000). De plus des séquences de ι - (iota), θ - (theta) et κ - (kappa) tubulines, dont le rôle reste à déterminer, ont aussi été caractérisées dans le génome de la paramécie.

Les gènes d' α - et de β -tubulines sont présents en un nombre limité d'exemplaires chez les protozoaires ciliés : à titre d'exemple, la paramécie possède 4 gènes d' α -tubuline et 3 de β -tubuline et *Tetrahymena* ne possède qu'un seul exemplaire d' α -tubuline et deux de β -tubuline (Dupuis-Williams et al., 1996 ; Gaertig et al., 1993). Dans ces organismes, la diversité des tubulines repose essentiellement sur des modifications post-traductionnelles comparativement aux organismes métazoaires. Chez *Paramecium*, la stabilité et la fonction des axonèmes seraient influencées par l'abondante polyglycylation de leurs tubulines (Redecker et al., 1994). Chez *Tetrahymena*, la polyglutamylolation, qui est nettement plus utilisée que chez *Paramecium*, stabiliserait, avec la polyglycylation, le tubule B de l'axonème (Redecker et al., 2005). Il est à noter cependant qu'aucun phénotype anormal n'est observé dans les mutants de *Tetrahymena* présentant une altération de tous les sites de polyglycylation de l' α -tubuline (Xia et al., 2000). A l'inverse, dans cet organisme, la perte des cinq sites de polyglycylation existant dans la β -tubuline est létale et les mutants contenant uniquement trois sites modifiés dans cette protéine sont viables mais présentent une motilité réduite et des anomalies de cytokinèse. Un gène d' α -tubuline dont l'extrémité C-terminale est remplacée par une extrémité C-terminale de β -tubuline est capable de compléter ces mutations. Dans ces double mutants, aucune polyglycylation n'est détectée sur la β -tubuline, contrairement à la protéine chimère d' α - β -tubuline qui est hyperglycylée, ce qui n'est pas le cas de l' α -tubuline d'une cellule sauvage. Ce résultat montre que la fonction essentielle de polyglycylation à l'extrémité C-terminale de la β -tubuline peut être transférée à l' α -tubuline et que la quantité totale de polyglycylation sur ces deux protéines est nécessaire à la viabilité de *Tetrahymena*.

Il paraît également intéressant de noter qu'une mutation K350M dans le gène de β -tubuline *BTU1* de *Tetrahymena* entraîne un blocage de la division du macronoyau ainsi que des

anomalies de division du micronoyau sans affecter la cytokinèse, l'architecture corticale ou l'assemblage des appareils oraux (Smith et al., 2004). Dans cet organisme, une incapacité à assembler les nouveaux cils ainsi qu'un blocage de la cytokinèse sont observés dans les cellules présentant un double KO des gènes *KIN1* et *KIN2* ($\Delta KIN1\Delta KIN2$) codant pour des protéines motrices associées aux microtubules de la famille des kinésines II (Brown et al., 1999a). Le phénotype sauvage est rétabli après la transformation des gènes *KIN2* ou *KIN1* dans les cellules $\Delta KIN1\Delta KIN2$. Dans ce cas, la protéine Kin1p s'accumule préférentiellement dans les cils en cours d'assemblage, mettant ainsi en évidence l'implication de cette protéine dans le transport de composants du cil lors de leur élongation, comme les dimères ou oligomères de tubulines. Un troisième membre de la famille des kinésines II, nommé *KIN5*, a récemment été caractérisé chez *Tetrahymena* (Awan et al., 2004). La protéine codée par ce gène contient un domaine FERM en C-terminal, caractéristique des protéines 4.1 et ERM (voir partie précédente) et présente une homologie plus importante avec une kinésine II de *C. elegans*, nommée Osm3, par rapport aux protéines Kin1p ou Kin2p de *Tetrahymena*. Le domaine FERM de la protéine Kin5p serait impliquée dans le transport de protéines membranaires dans le cil.

C. Les réseaux de centrines chez les modèles *Tetrahymena* et *Paramecium*

Le génome de *Tetrahymena thermophila* contient au moins 4 gènes codant pour des centrines de 19 à 20 kDa qui ont une localisation distincte dans la cellule (Guerra et al., 2003 ; Stemm-Wolf et al., 2005). L'isoforme Cen1 est localisée dans la région proximale des corps basaux où la duplication est initiée, dans la zone de transition entre le corps basal et l'axonème, dans les fibres corticales de l'appareil oral, les fibres cinétodesmales, un anneau filamenteux apical et les bras internes des doublets microtubulaires de l'axonème. Cette protéine contrôle l'activité du bras interne de dynéine de façon Ca^{2+} dépendante et influence ainsi la motilité des microtubules ciliaires. Elle joue aussi un rôle essentiel dans la duplication et la maintenance des corps basaux. Parmi les 3 autres isoformes, Cen2 ne semble pas être exprimée contrairement à Cen3 et Cen4 qui sont localisées dans les corps basaux et au niveau des pores des vacuoles contractiles. Dans la forme microstome de *Tetrahymena paravorax*, la centrine est présente dans l'anneau filamenteux apical dont la fonction demeure énigmatique (Diogon et al., 2001).

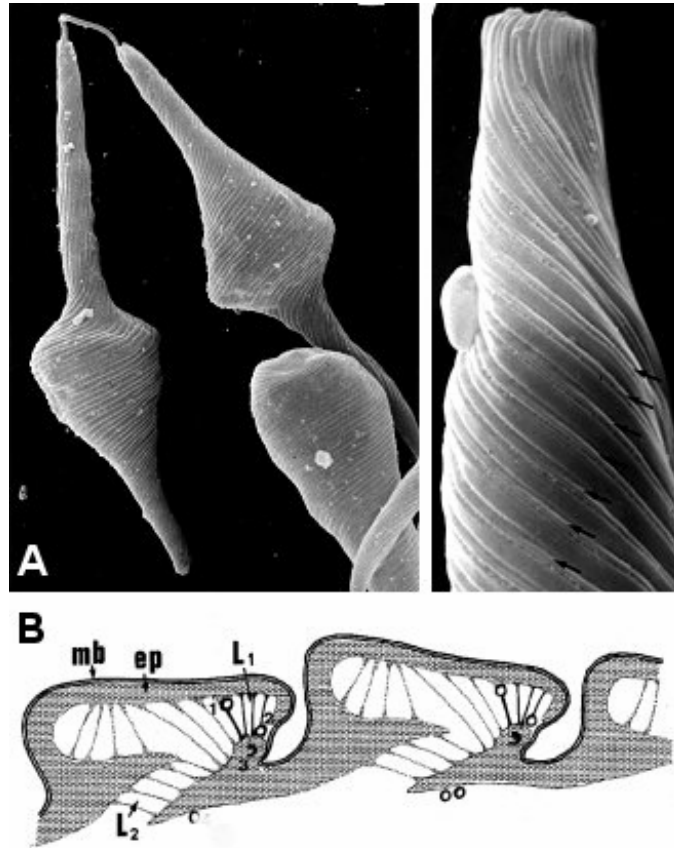


Fig. 26 : Organisation de la surface et du cortex des euglènes.

A : Observation au microscope électronique à balayage de l'euglène, *Cyclidopsis acus*.

A gauche: déformation caractéristique due au déplacement de la cellule.

A droite: fort grossissement: sillons et crêtes caractéristiques du complexe de surface (flèches).

B: Représentation schématique d'une coupe longitudinale du cortex des Euglènes.

Les sections circulaires représentent les microtubules. **mb** = membrane plasmique, **ep** = épiplasm, **L1** et **L2** = liens épiplasmiques.

Noter la répétition caractéristique des domaines structuraux en crêtes et sillons.

D'après Mignot et al., 1987.

Chez la paramécie, des protéines de 23 à 24 kDa possédant chacune 4 domaines EF-hand permettant de fixer le Ca^{2+} ont été caractérisées et l'analyse de la séquence nucléique de l'un de ces composants, ICL1a, a montré que ce gène appartenait à la famille des centrines (Madeddu et al., 1996). Trois autres gènes homologues (ICL1b, ICL1c et ICL1d) ont été identifiés et se co-expriment avec ICL1a (Vayssié et al., 1997). Les centrines ont aussi été localisées dans les corps basaux, dans la corde cytotomale et dans un réseau à mailles filamenteuses localisé dans la région profonde du cortex et appelé réseau infracilaire ou "infraciliary lattice" (Klotz et al., 1997).

D. Le squelette membranaire chez les modèles ***Pseudomicrothorax, Euplotes, Tetrahymena et Paramecium***

Chez la plupart des protozoaires ciliés, la cellule est délimitée par un système membranaire complexe comprenant la membrane plasmique et deux membranes sous-jacentes qui sont continues et forment un système clos appelé l'alvéole. La structure cytosquelettique corticale majeure, l'épiplasme, est une strate fibrogranulaire qui sous-tend la membrane alvéolaire interne et assure le rôle de squelette membranaire. Il existe également des liens structuraux étroits entre l'épiplasme et les différentes fibres issues des cinétosomes (racines ciliaires). L'épiplasme est présent chez la plupart des protozoaires ciliés mais aussi dans certains organismes flagellés comme les dinoflagellés ou les euglènes. Sa structure et sa composition varient d'une espèce à l'autre. Jusqu'ici les constituants du squelette membranaire (protéines épiplasmiques) n'avaient été caractérisés au plan moléculaire que chez les trois espèces *Pseudomicrothorax*, *Euplotes* et *Tetrahymena*.

1. L'épiplasme de *Pseudomicrothorax* : une structure majoritairement composée d'articulines

Les articulines sont des protéines identifiées à l'origine dans le cytosquelette sous-membranaire des euglènes. L'organisation corticale des euglènes est caractérisée par une succession de crêtes et de sillons formant une structure ondulante à la surface de la cellule (Fig. 26). Dans ces organismes dépourvus d'alvéoles, la membrane plasmique est directement en association avec l'épiplasme qui est renforcé par un réseau de microtubules longitudinaux. Chez *E.*

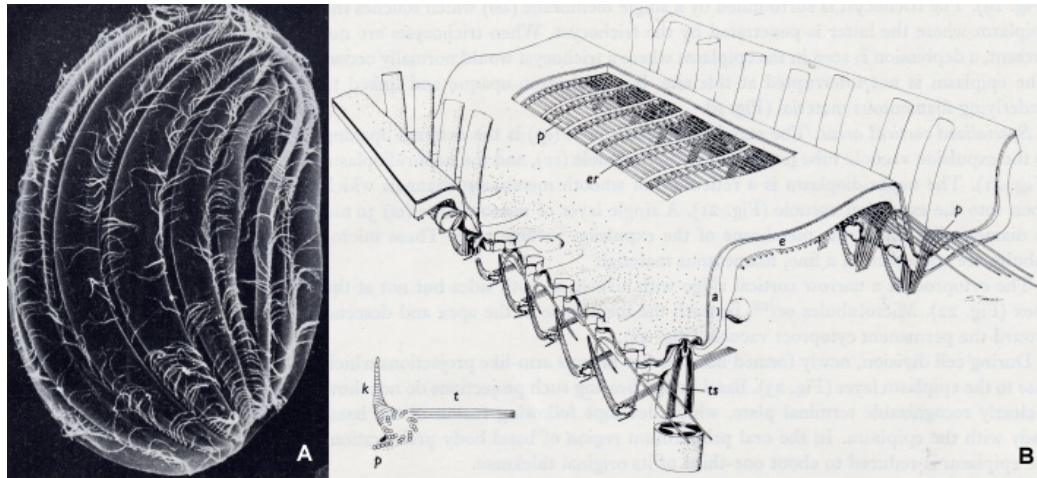


Fig. 27 : Organisation de la surface et du cortex de *Pseudomicrothorax*.

A : Observation en microscopie électronique à balayage.

B : Représentation en perspective du cortex de *Pseudomicrothorax*.

a : alvéole ; **e :** épiplasma ; **er :** rayons épiplasmiques ; **k :** fibre cinétodesmale ; **p :** microtubules post-ciliaires ; **t :** microtubules transverses ; **ts :** trichocystes.

D'après Peck, 1977.

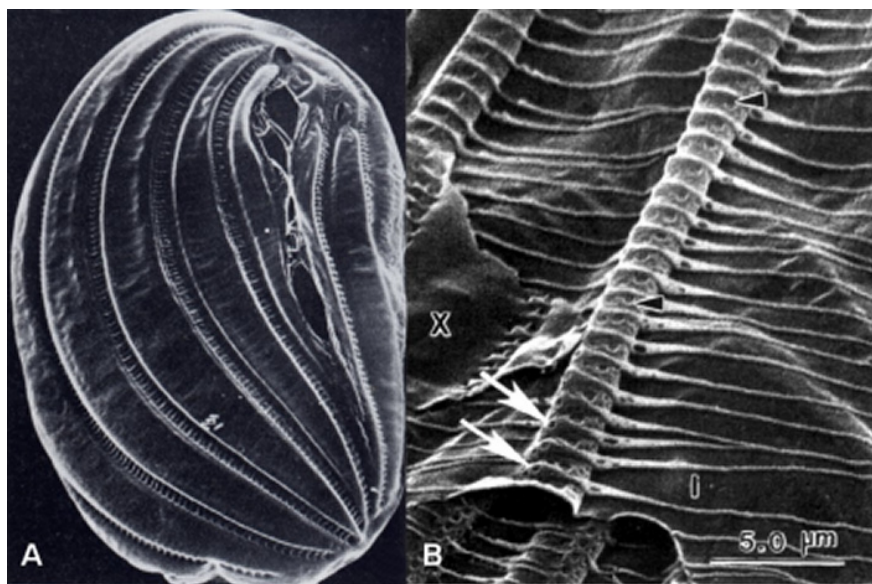


Fig. 28 : Observations en microscopie électronique à balayage du squelette membranaire de *Pseudomicrothorax* à faible grossissement (A) et vu de l'intérieur de la cellule à fort grossissement (B).

Noter la présence des lignes d'implantation des cinétosomes (flèches blanches) et des trichocystes (têtes de flèches noires). Les surfaces interne (I) et externe (X) sont également mises en évidence.

D'après Peck, 1977 ; Peck et al., 1991.

gracilis, les articulines ont des poids moléculaires (PM) de 80 et 86 kDa et figurent en quantité équimolaire dans la cellule. Elles représentent 60% de la composition du squelette membranaire de cet organisme. La caractérisation de leur séquence nucléique a montré l'existence d'un long domaine central formé de 33 répétitions de 12 acides aminés comportant le motif VPVP (Marrs et Bouck, 1992). En dehors du domaine central, un autre domaine répété a été identifié avec le motif APVTYGA en C-terminal de la p80 et en N-terminal de la p86. Des expériences de radiomarquages réalisées par Fazio et al. (1995) ont montré que ces protéines étaient phosphorylables *in vivo* par une activité sérine/thréonine kinase endogène. Le PM attendu de ces protéines (environ 72 kDa) est beaucoup plus faible que le PM apparent en SDS-PAGE. Cette caractéristique, retrouvée pour les articulines du cilié *Pseudomicrothorax dubius*, a été discutée par Huttenlauch et al. (1998a).

Le squelette membranaire (épiplasma) de *Pseudomicrothorax* est une structure continue (Peck, 1977 ; Peck et al., 1991 ; Fig. 27 et 28). Il est constitué de deux groupes de protéines majeures, 78-80 kDa et 11-18 kDa, ainsi que d'une série de composants mineurs dont les PM sont compris entre 18 et 62 kDa comprenant une protéine de 60 kDa appelée p60 (Huttenlauch et Peck, 1991). Des expériences biochimiques de marquages par des lectines et de déglycosylations, ont montré que les protéines épiplasmiques majeures de *Pseudomicrothorax* (78-80 kDa) ne sont pas glycosylées (Huttenlauch et Peck, 1991). Ces protéines ne semblent pas non plus être phosphorylées. Cette conclusion est basée sur deux observations : les protéines de 78-80kDa ne sont pas marquées après incubation des cellules dans un milieu radiomarké par l'élément [³²P] (Peck et al., 1991) et un traitement par la phosphatase ne modifie pas leur migration dans un gel bidimensionnel (Huttenlauch et al., 1998a). En électrophorèse bidimensionnelle, les protéines de 78-80 kDa se séparent en 6 spots: les spots 1 et 4, qui représentent des polypeptides distincts, sont majoritaires quantitativement. Les spots 2 et 3, quant à eux, sont des variants isoélectriques du spot 1 (Peck et al., 1991). Tout comme les articulines d'euglènes ces protéines présentent une migration aberrante en SDS-PAGE. En effet, le PM attendu des polypeptides 1 et 4 est respectivement de 70 et 60 kDa au lieu de 78-80 kDa. Ce retard de migration ne semble pas être dû à des modifications post-traductionnelles mais plutôt à des propriétés intrinsèques de ces protéines (Huttenlauch et al., 1998a). Seule la protéine p60 a un PM attendu correspondant au PM apparent de 60 kDa (Huttenlauch et al., 1995).

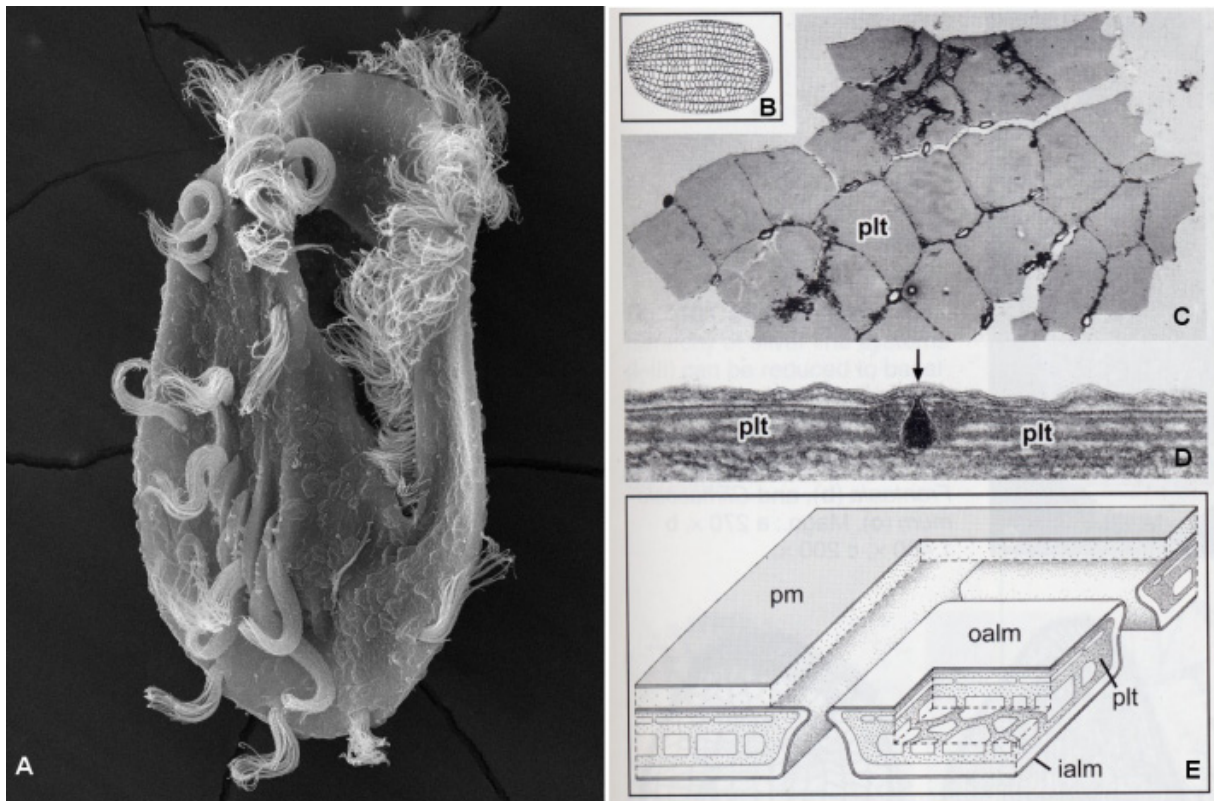


Fig. 29 : Organisation de la surface et du cortex d'Euplotes.

A : Observation en microscopie électronique à balayage de la face ventrale.

B : Observation de l'argyrome à la suite d'une coloration à l'argent.

C : Plaques alvéolaires isolées (**plt**).

D : Section de plaques localisées dans 2 alvéoles contigües et séparées au niveau de la flèche.

E : Représentation tridimensionnelle de la région alvéolaire. **ialm** : membrane alvéolaire interne ; **oalm** : membrane alvéolaire externe ; **pm** : membrane plasmique.

D'après <http://research.plattsburgh.edu/Ciliates/permitted.asp?QueryType=Euplotes> et Hausmann et Kaiser, 1979.

La séquence des polypeptides 1 et 4 présente un domaine en C-terminal contenant une série d'hexapeptides dont les motifs (GhQNhA pour l'articuline 1 et GhQGVQ pour l'articuline 4, où h est un acide aminé hydrophobe) se distinguent de ceux retrouvés en N- ou C-terminal dans les articulines d'euglènes. Cependant ces protéines, référencées articulines 1 et 4, comptent respectivement 30 et 31 répétitions de 12 résidus riches en valine et proline dont les motifs VPVP sont similaires aux articulines d'euglènes. Cette signature est également évidente dans la séquence de la protéine p60 qui présente 29 répétitions de ce motif (Huttenlauch et al., 1995 ; Huttenlauch et al., 1998a). Les articulines forment donc une famille de protéines présente dans des organismes variés allant des ciliés aux flagellés. Récemment plusieurs protéines homologues aux articulines ont été identifiées chez l'euplote.

2. Le squelette membranaire d'*Euplotes* : une structure composée de protéines homologues aux articulines

Chez les euplotes, l'organisation cytosquelettique corticale est intra-alvéolaire sous la forme de plaques et non pas sous-alvéolaire comme dans la plupart des ciliés (Fig. 29). L'ensemble d'unités plaque/alvéole est intégré dans un réseau contigu qui se compose d'un matériel fibreux, nommé "argyrome" (Fig. 29B). Deux protéines de 116 et 110 kDa composant les plaques alvéolaires ont été découvertes chez *E. eurytomus* (Williams et al., 1989). L'électrophorèse bidimensionnelle révèle la présence de trois polypeptides distincts et analogues à trois protéines de *E. aediculatus* révélées à l'aide d'anticorps monoclonaux (Williams, 1991 ; Kloetzel, 1991) et nommées platéines α (125 kDa), β (99 kDa) et γ (95-97 kDa). La séquence nucléique des platéines a récemment été caractérisée à partir de microséquences de protéines purifiées révélant la présence d'un gène codant pour la β/γ -platéine et de deux gènes, $\alpha 1$ et $\alpha 2$, codant pour la forme α (Kloetzel et al., 2003a ; Kloetzel et al., 2003b). Ces protéines présentent à leur extrémité N-terminale une séquence canonique hydrophobe d'adressage et de transport membranaire (peptide signal) en accord avec la localisation intra-alvéolaire des platéines. En outre, les platéines sont composées d'un domaine primaire, en position centrale, présentant des motifs répétés de 12 acides aminés riches en valine et proline (27 pour la β/γ -, 28 pour la $\alpha 1$ - et 24 pour la $\alpha 2$ -platéine). Elles présentent également un domaine secondaire, situé en N-terminal des α -platéines et en C-terminal de la β/γ platéine, riche en proline avec des motifs plus courts et moins nombreux.

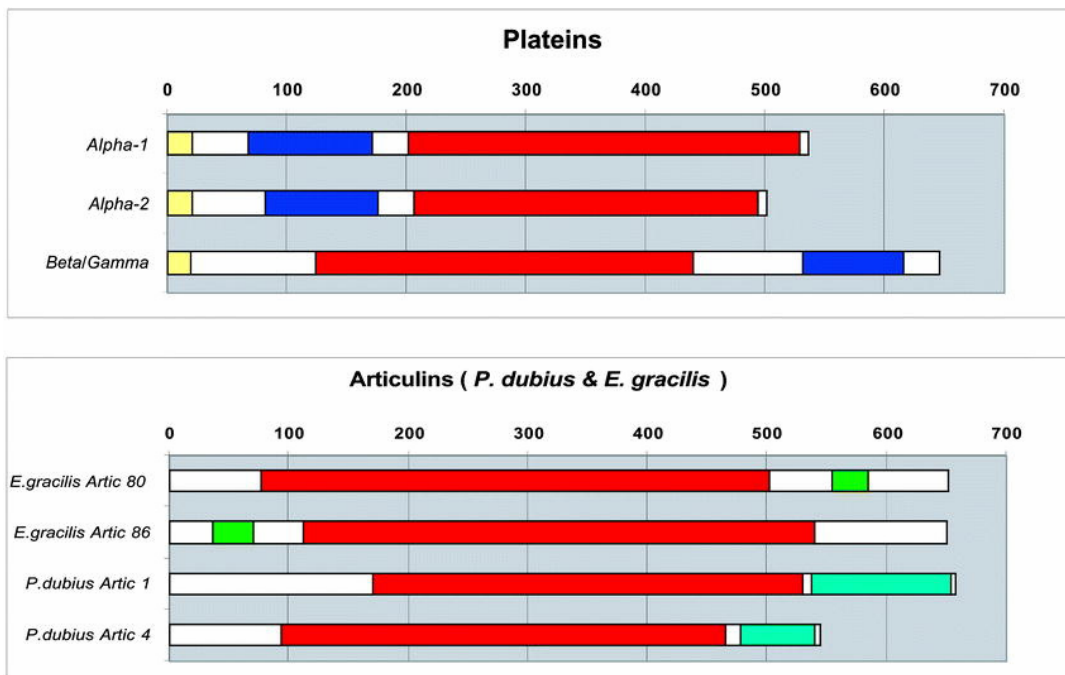


Fig. 30 : Modèle d'architecture moléculaire des platéines (haut) et des articulines d'*Euglena* et de *Pseudomicrothorax* (bas).

Le domaine primaire, présentant les motifs VPVP (12-mères) sont indiqués en rouge. En bleu et vert sont représentés les domaines secondaires dont les compositions diffèrent entre les espèces. Le peptide signal en N-terminal, unique aux platéines, est représenté en jaune.

D'après Kloetzel et al., 2003a.

L'analyse des séquences protéiques a révélé l'appartenance des platéines avec la famille des articulines en raison d'une forte identité entre le domaine primaire des platéines et les répétitions VPVP qui sont la signature des articulines (Fig. 30). Comme les articulines, les platéines présentent une migration retardée en SDS-PAGE : l' α -platéine migre à 125 kDa alors que les PM attendus des formes α 1 et α 2 sont respectivement de 61 kDa et 56 kDa. La β/γ -platéine, quant à elle, migre à 95-99 kDa et son PM attendu est seulement de 73 kDa (Kloetzel et al., 2003b). Les auteurs expliquent ce retard de migration électrophorétique par l'abondance et l'espacement régulier des résidus proline sur la protéine et/ou par d'abondantes modifications post-traductionnelles.

3. L'épiplasme de *Tetrahymena* : une première entorse au concept "tout-articuline"

Chez *Tetrahymena*, l'épiplasme forme un ensemble quasi-continu semblable à celui décrit chez *Pseudomicrothorax* (Fig. 31 et 32). Dans cet organisme, l'analyse des protéines épiplasmiques en SDS-PAGE montre la présence de 3 bandes majeures A, B et C (Vaudaux, 1976 ; Williams et al., 1979). Une analyse comparative de différentes espèces de *Tetrahymena* (Williams et al., 1984), a montré une conservation de la bande A (235 kDa) et une variabilité du PM des bandes B (135 kDa pour *T. pyriformis* et 130 kDa pour *T. thermophila*) et C (125 kDa pour *T. pyriformis* et 110 kDa pour *T. thermophila*). A l'aide d'anticorps polyclonaux, des parentés antigéniques ont été caractérisées entre les protéines A, B et C (Williams et al., 1987). Parmi ces protéines, la bande C semble être prédominante (Williams et al., 1995 ; Fig. 32). Chez *T. pyriformis*, la protéine constituant la bande C présente des propriétés antigéniques avec la GFAP qui est une protéine de filament intermédiaires chez les astrocytes et les cellules d'origine gliale (Bouchard et al., 1998).

La caractérisation moléculaire de cette protéine, nommée épiplasmine C (EpiC), a montré l'existence de 25 domaines de 40 à 50 résidus présentant une homologie avec un sous-domaine de 6 heptades présent dans le coil-1B des lamines, caractéristique des filaments intermédiaires nucléaires (Bouchard et al., 2001 ; Fig 33). Chez *T. thermophila*, une séquence partielle du gène *EPC1* a été obtenue à partir de microséquences de la protéine épiplasmique C (Williams, 2004). Dans cette séquence, une région de 533 pb présente 81% d'identité avec le gène *EpiC* de *T. pyriformis*. Des expériences de "knockout" (KO) utilisant une cassette

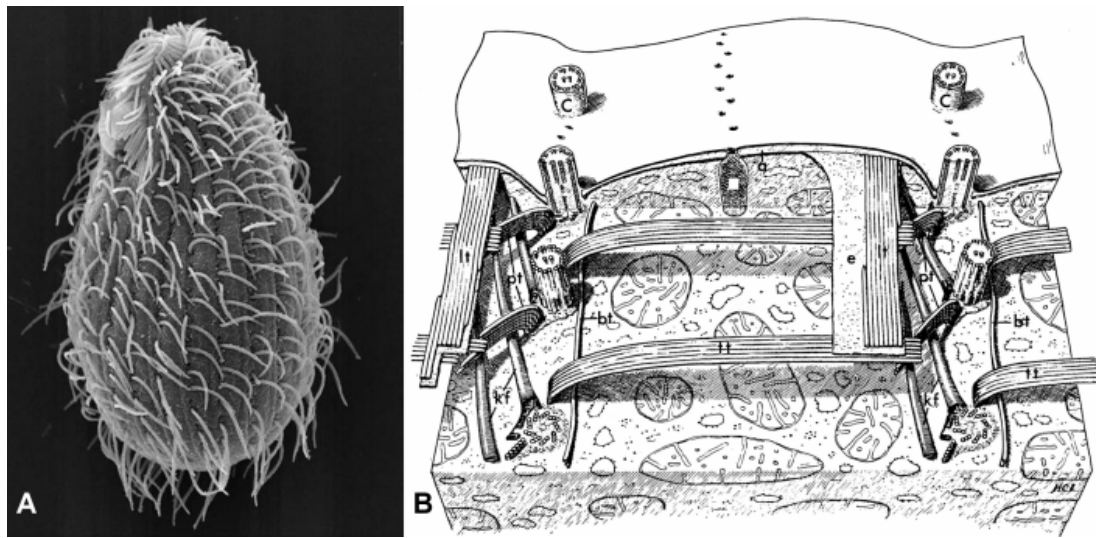


Fig. 31 : Organisation de la surface et du cortex de *Tetrahymena*.

A : Observation en microscopie électronique à balayage.

B : Représentation tridimensionnelle du cortex de *Tetrahymena*. Epiplasma : **e** ; cil : **C** ; fibres microtubulaires basales (**bt**) longitudinales (**lt**) post-ciliaires (**pt**) et transversales (**tt**) ; fibres cinétodesmales (**kf**) ; alvéole sous-membranaire (**a**).

D'après <http://www.aecom.yu.edu/satir/projects/tetrahymena/> et Allen, 1967.

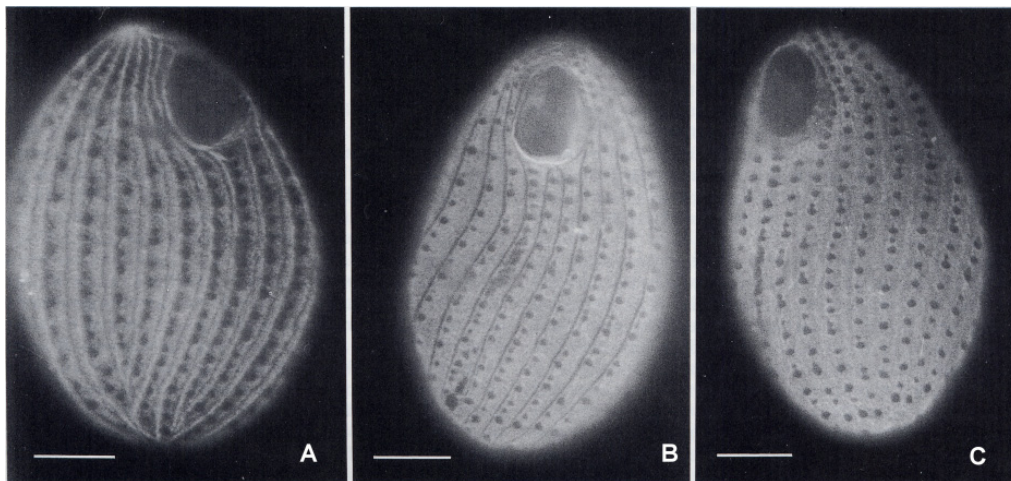


Fig. 32 : Immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps monoclonaux marquant les protéines épiplasmiques A (A), B (B) et C (C).

D'après Williams et al., 1995.

neo3 inductible par le cadmium (Shang et al., 2002a) intégrée dans le gène *EPCI* et inhibant son expression, ont montré que la protéine Epc1p intervient dans le maintien de la forme de la cellule et de l'organisation corticale (nombre de cinéties et position des vacuoles contractiles).

La conjugaison entre une cellule sauvage et une cellule "KO" suggère que cette protéine est capable de migrer et de s'assembler dans le cortex de la cellule "KO" pour former une structure épiplasmique en respectant une série d'évènements morphogénétiques précisément définis (Williams, 2004). A partir d'extraits protéiques enrichis en Epc1p, Honts et Williams (2003) ont montré que cette protéine se désassemble durant la division cellulaire et passe d'un état insoluble cytosquelettique à un état soluble cytosolique. Des expériences de blot overlay ont montré qu'une protéine de 87 kDa, analogue aux tétrines (voir paragraphe II. Cytosquelette du cortex oral chez les modèles *Tetrahymena* et *Paramecium*), les protéines épiplasmiques C, B, A et une protéine de 23 kDa, analogue à TCBP-23 (*Tetrahymena* Calcium Binding Protein), sont capables d'interagir entre elles, les deux dernières précipitant avec la protéine Epc1p de façon Ca^{2+} -dépendante (Fig. 34). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Numata et al. (2000) montrant que TCBP-23 s'associe avec des protéines dont le PM est voisin des protéines épiplasmiques B et C. Des expériences d'immunofluorescence ont montré que TCBP-23 est localisée dans l'ensemble du cortex, à l'exception de la périphérie des cinétosomes, suggérant une association étroite avec la strate épiplasmique (Hanyu et al., 1996). Cette protéine de 23 kDa présente 35% d'homologie avec une protéine de 25 kDa, nommée TCBP-25. Cette dernière affiche une localisation comparable à celle de TCBP-23 au niveau épiplasmique (Hanyu et al., 1995). Les protéines TCBP-23 et TCBP-25 sont capables de fixer le Ca^{2+} et possèdent chacune 4 domaines EF-hand qui les apparente aux centrines et aux calmodulines (Takemasa et al., 1989 ; Takemasa et al., 1990).

4. Le squelette membranaire de *Paramecium*

Le cortex de la paramécie présente une architecture particulière. Il se sub-divise en centaines d'unités corticales délimitées par un réseau filamenteux à mailles hexagonales qui lui est propre, appelé réseau externe ou "outer lattice" (Allen, 1971 ; Fig. 35 et 36). Le territoire défini par chaque maille du réseau externe est une unité corticale. Chaque unité corticale est centrée autour d'un appareil ciliaire et renferme une entité épiplasmique, appelée écaille, en

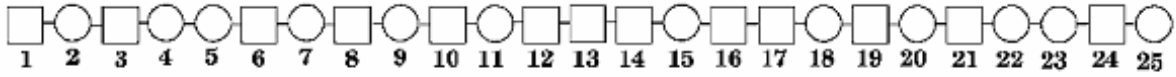


Fig. 33 : Représentation schématique des domaines répétés de EpiC.

Les carrés représentent les domaines de type I et les cercles les domaines de type II révélés par l'analyse HCA (Hydrophobic Cluster Analysis).

D'après Bouchard et al., 2001.

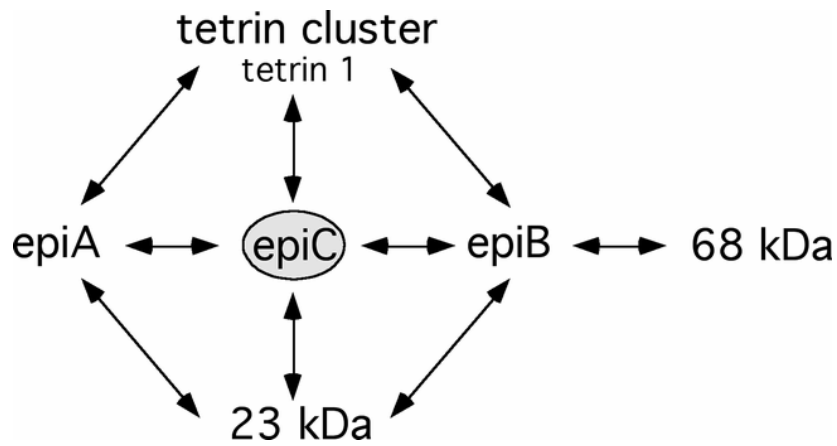


Fig. 34 : Bilan des interactions entre protéines corticales chez *Tetrahymena*

D'après Honts et Williams, 2003.

forme de coupelle associée à un sac alvéolaire. L'ensemble écailles épiplasmiques/outer lattice forme un continuum qui assure la fonction de squelette membranaire chez la paramécie.

En raison de sa coïncidence avec les reliefs de la surface cellulaire (crêtes corticales) et de son étroite association avec les écailles épiplasmiques, le rôle de l'outer lattice serait de stabiliser l'organisation corticale de la cellule. Un anticorps monoclonal (CC212), dirigé contre les myosines cytoplasmiques de cellules ciliées d'oviducte de caille et marquant l'outer lattice, a permis de mettre en évidence deux composants protéiques de 130 et 50 kDa en Western blot. Cependant, aucune certitude n'a pu être établie concernant la parenté de ces protéines avec les myosines (Cohen et al., 1987).

Un anticorps monoclonal (I3D3), obtenu à partir de préparations enrichies en matériel cortical utilisé comme immunogène, révèle en immunofluorescence l'outer lattice mais aussi des structures au niveau oral (Jeanmaire-Wolf et al., 1993). La présence d'épitopes communs entre les composants de ces deux structures (outer lattice et appareil oral) a été confirmée à l'aide de l'anticorps monoclonal OFP50 dirigé contre des préparations enrichies en appareils oraux (Clérot et al., 2001).

Les écailles épiplasmiques et leur détournement par les mailles de l'outer lattice confèrent une architecture en nid d'abeille au squelette membranaire de la paramécie. Cette organisation a été mise en évidence en microscopie classique, en immunofluorescence et en immunocytochimie ultrastructurale à l'aide de nombreux anticorps monoclonaux dirigés contre des fractions de cortex purifiés de paramécie (Nahon et al., 1993 ; Jeanmaire-Wolf et al., 1993 ; Fig. 37). Parmi ces anticorps, l'anticorps I4B7 décore à la fois les écailles épiplasmiques et l'appareil oral révélant des épitopes communs aux composants des régions somatiques et orales. Les anticorps CTS, et particulièrement l'anticorps CTS-32, ont permis de mettre en évidence une famille complexe de protéines immunologiquement apparentées, nommées épiplasmines, comprenant un grand nombre de polypeptides (15 à 20 bandes en SDS-PAGE et plus de 40 spots en gels bidimensionnels) dont les PM sont compris entre 30 et 50 kDa. Une étude biochimique de ces composants protéiques, réalisée par Coffe et al. (1996), a permis de déterminer les conditions de solubilisation de ces protéines ainsi que celles nécessaires à leur réassemblage *in vitro* en agrégats filamenteux. En fonction de leurs propriétés d'assemblage et d'hydrophobicité, les épiplasmines de paramécie se sub-divisent en trois groupes correspondant à des groupes de mobilité électrophorétique distincts : les LMW



Fig. 35 : Observation en microscopie électronique à balayage de la surface de *Paramecium*

A : Cellule en interphase.

B : Cellule en division.

C : Organisation de la surface cellulaire en unités corticales chacune centrée sur un appareil ciliaire. Les flèches blanches représentent les appareils oraux et les têtes de flèches noires les corps basaux.

D'après Adoutte et Fleury, 1996, <http://www.sunynassau.edu/webpages/biology/EMGallery.htm> et Paulin, 1996.

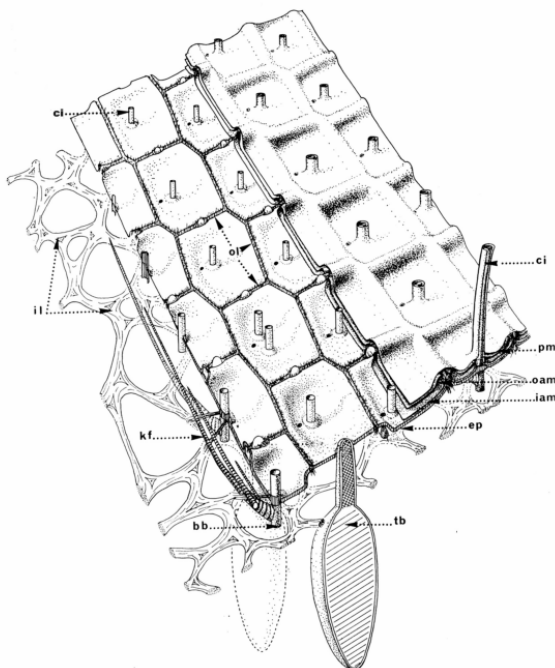


Fig. 36 : Représentation tridimensionnelle du cortex de *Paramecium*.

Les principales structures cytosquelettiques sont l'épiplasma (**ep**) associé à la membrane alvéolaire interne (**iam**) et le réseau infraciliaire (**il**) localisé dans le plan des cinétosomes (**bb**). Cil (**ci**), réseau externe (**ol**), trichocystes (**tb**), fibre cinétodesmale (**kf**), membranes plasmique (**pm**) et alvéolaire externe (**oam**).

D'après Keryer et al., 1990.

(Low Molecular Weight), les MMW (Middle Molecular Weight) et les HMW (High Molecular Weight). Des microséquences protéiques de fragments d'épiplasmines purifiées révèlent l'abondance de résidus Q, P et V. Au moyen d'approches PCR utilisant des sondes dégénérées, trois classes de microséquences de plus longues tailles ont été obtenues (Coffe et al., 1996), chacune présentant des répétitions en heptades avec le motif récurrent QPVQ-h- (où h est un résidu hydrophobe). Ces répétitions QPVQ-h- ont la propriété de former des structures coiled-coil qui contribueraient à l'auto-assemblage des épiplasmines de cet organisme.

5. Analogies de composition entre les épiplasmes

Un anticorps polyclonal, dirigé contre les articulines de *P. dubius* et nommé "sérum 018", a été sous-fractionné par immuno-affinité vis-à-vis d'extraits épiplasmiques de *Paramecium* ou de polypeptides présentant le domaine VPVP des articulines. Ces fractions ont été utilisées avec des anticorps monoclonaux reconnaissant les articulines de *Pseudomicrothorax* (4B5F3) ou les épiplasmines de *Paramecium* (CTS-32) dans le but de caractériser l'existence d'immunoanalogues de ces deux protéines chez les quatre protozoaires ciliés *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Euplotes* et *Pseudomicrothorax* (Huttenlauch et al., 1998b ; Huttenlauch et Stick, 2003). En dépit d'une absence de signal avec l'anticorps CTS-32 sur les protéines corticales de *Tetrahymena* (Nahon et al., 1993), les anticorps anti-épiplasmines et anti-articulines reconnaissent des bandes protéiques distinctes en Western blot dans l'ensemble des organismes étudiés par Huttenlauch et al. (1998b). Dans un cas particulier, un constituant épiplasmique de *P. dubius*, l'articuline 1, a été identifié réagissant à la fois avec les anticorps anti-épiplasmines et anti-articulines. Cependant, chez cette protéine, l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 4B5F3 est situé en N-terminal du domaine VPVP, dans une région distincte de la queue C-terminale qui contient l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal CTS-32. Par ailleurs, chez les ciliés *Euplotes*, les anticorps monoclonaux 4B5F3 (Curtenaz et al., 1994) et CTS-32 (Nahon et al., 1993) décoorent les plaques alvéolaires en immunofluorescence. Ces résultats montrent qu'en dépit de la prédominance systématique d'une des deux familles chez un modèle donné, les articulines et les épiplasmines peuvent coexister chez un même cilié.

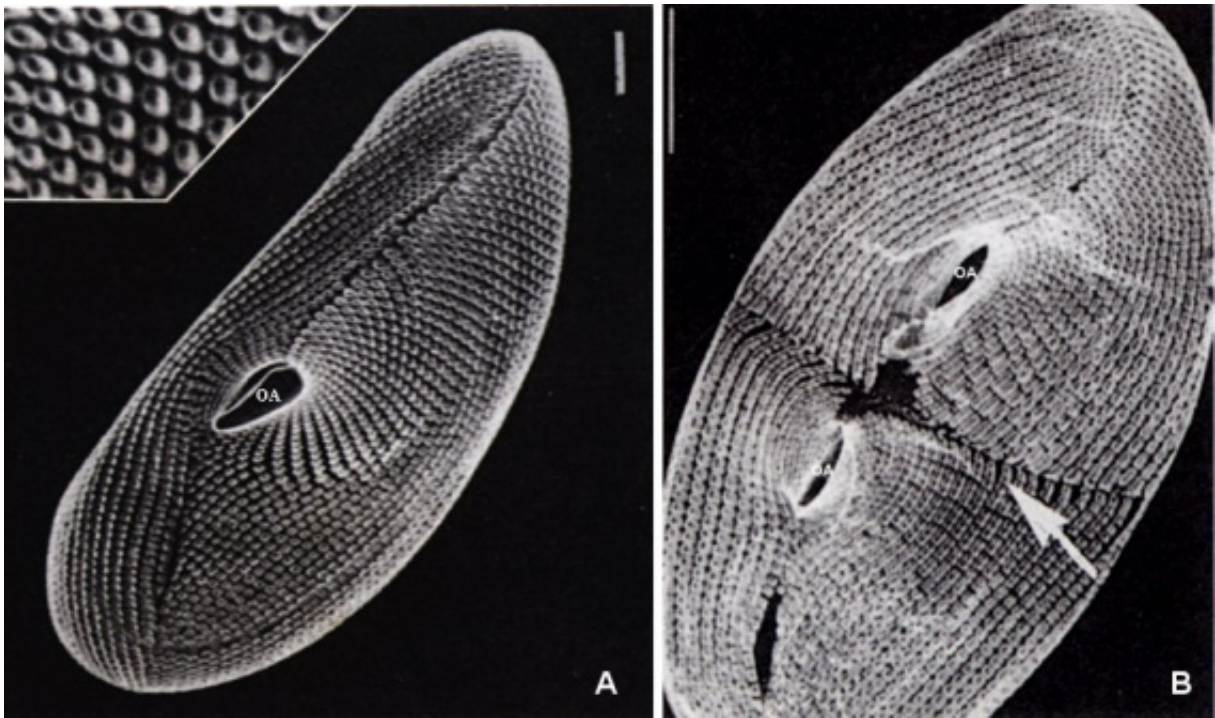


Fig. 37 : Immunofluorescence de l'épithélium chez la paramécie en interphase (A) et en division (B) à l'aide de l'anticorps monoclonal CTS-32.

La flèche montre le sillon de division qui apparaît en négatif dans le plan équatorial de la cellule.

OA : appareil oral.

D'après Jeanmaire-Wolf et al., 1993 et Adoutte et Fleury, 1996.

II. Cytosquelette du cortex oral chez les modèles *Tetrahymena* et *Paramecium*

La région orale est constituée, pour l'essentiel, d'unités ciliaires identiques à celles de la région somatique mais organisées en membranelles (groupe de cils). Le schéma montré figure 38 montre les différentes structures de l'appareil oral de *Tetrahymena*. L'organisation particulière de cette région corticale est corrélée à la présence de protéines spécifiques. Deux exemples types sont la protéine p49 et les tétrines chez *Tetrahymena*.

La protéine p49 (49 kDa), capable de former des filaments de 14 nm *in vitro*, a été localisée dans la zone τ , ou barbe, située en position postérieure de l'appareil oral (Numata, 1996). Cette protéine permettrait au primordium oral immature de devenir fonctionnel et jouerait donc un rôle essentiel dans la stomatogenèse chez *Tetrahymena*.

A l'aide d'approches immunologiques, Honts et Williams (1990) ont identifié une famille de 4 protéines (entre 79 et 89 kDa) chez *Tetrahymena pyriformis*, appelées tétrines. Plusieurs anticorps dirigés contre ces protéines reconnaissent une protéine de 67 kDa localisée au niveau du centrosome humain (Honts et Williams, 2003). En immunofluorescence, l'affaiblissement considérable du marquage des tétrines pendant une courte période de la division est corrélée à une accumulation de ces protéines dans les fractions solubles d'extraits protéiques suggérant un désassemblage des tétrines de façon dépendante du cycle cellulaire. Les séquences des gènes codant pour les tétrines ont été déterminées à partir d'expériences de RT-PCR et RACE-PCR (Brimmer et Weber, 2000). Les tétrines sont constituées d'un domaine globulaire en N-terminal de 60 à 100 résidus et d'un long domaine de 620 à 640 résidus, dépourvu de proline, capable de former des structures coiled-coil présentant de faibles similarités avec la myosine, la tropomyosine et la spectrine. Plusieurs variants iso-électriques de la tétrine A ont été mis en évidence par électrophorèse bidimensionnelle suggérant des modifications post-traductionnelles dues à des phosphorylations des résidus sérine et thréonine de la région N-terminale de la protéine.

Une étude réalisée par McLaughlin et Buhse Jr. (2004) a permis de confirmer la localisation des tétrines dans l'appareil oral de *Tetrahymena vorax*, ainsi que celle d'autres protéines cytosquelettiques communes aux proto- et métazoaires telles que l'actine et la centrine. La

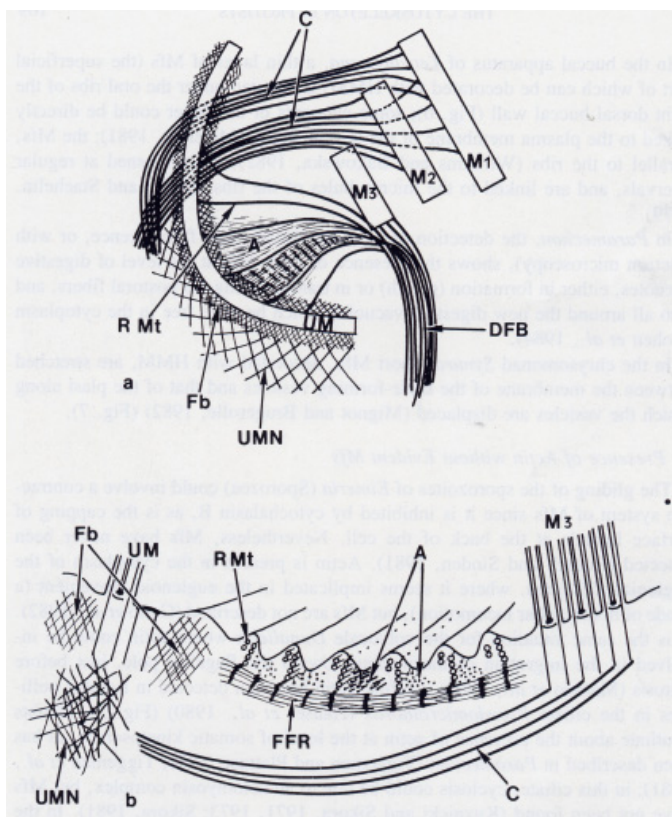


Fig. 38 : Organisation de l'appareil oral chez *Tetrahymena*.

a : organisation générale. **b** : section transversale ; **UM** : parorale ; **M1-3** : membranelles adorales de la base desquelles sont issues diverses formations microtubulaires, les connectifs (**C**), les microtubules des crêtes (**R Mt**), le tractus profond ou "ribbed wall" (**DFB**). **A** : microfilaments d'actine. La nature du reticulum filamenteux fin (**FFR**), du réseau paroral (**UMN**) et des filaments proches de l'UM (**Fb**) est inconnue.

D'après De Puytorac et al., 1987.

formation des vacuoles digestives induites par l'ajout de calcium et la localisation des centrines dans une structure en forme de croissant entourant le cytostome, appelée reticulum filamenteux fin ou FFR, suggèrent un rôle de cette calciprotéine dans la fermeture du cytostome. Les protéines de type tétrine et actine sont co-localisées dans les connectifs permettant l'ancrage des membranelles. L'actine est aussi localisée dans la région profonde de l'appareil oral, appelé "cytoplasme spécialisé", impliqué dans la fermeture du cytostome. De plus, Hirono et al. (1987) ont montré que l'actine, dont la séquence protéique est très divergente chez *Tetrahymena* par rapport aux autres espèces, est également localisée à la périphérie des vacuoles digestives ainsi que dans le cytoprocte.

Des expériences d'immunofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines de l'appareil oral de *Tetrahymena* et purifiés sur une colonne d'affinité contenant la chaîne lourde ou la chaîne légère de myosine ont permis de mettre en évidence la présence de cette protéine dans les corps basaux et les fibres associées de l'appareil oral (Garcés et al., 1995). Des études récentes ont montré qu'une myosine non-conventionnelle, appelée *MYO1*, a un rôle dans la formation et le mouvement des vacuoles digestives dans la cellule ainsi que dans l'élongation du macronoyau pendant la division (Williams et al., 2000 ; Hosein et al., 2005). Treize gènes de myosine ont été récemment identifiés chez *Tetrahymena* (Williams et Gavin, 2005). Douze d'entre eux codent pour des myosines non-conventionnelles et forment une nouvelle classe au sein de ces protéines.

Les différentes structures de l'appareil oral de *Paramecium* sont représentées figure 39. Les anticorps monoclonaux OFP42, OFP45, OFP50 et OFP57, dirigés contre des fractions de protéines orales de la paramécie réagissent contre des protéines de 70, 75 et 83 kDa qui sont des immunoanalogues de tétrines de *Tetrahymena* (Clérot et al., 2001). D'autre part, ces auteurs ont montré que les tétrines de *Tetrahymena* et ses immunoanalogues chez *Paramecium* réagissent également avec l'anticorps monoclonal CTR210 dirigé contre les centrosomes humains. Les immunoanalogues des tétrines chez la paramécie sont des composants mineurs de l'appareil oral. Les anticorps OFP42, OFP45, OFP50 et OFP57, reconnaissant un ou plusieurs de ces composants, marquent en immunofluorescence un réseau de filaments fins dans l'appareil oral.

L'actine serait présente au niveau oral chez la paramécie ainsi qu'au niveau des vacuoles digestives (Kissmehl et al., 2004). Elle est également localisée au niveau du cytoprocte,

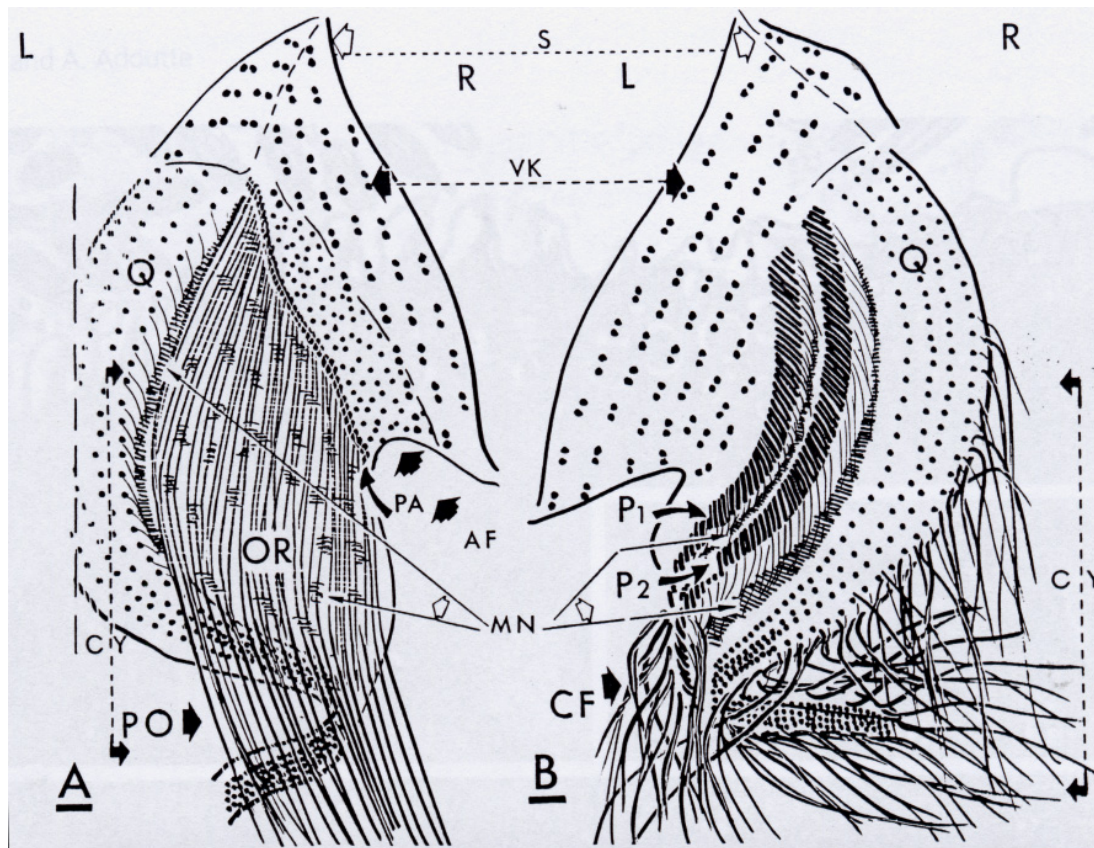


Fig. 39 : Représentation des faces latérales de l'appareil oral chez *Paramecium* vu de l'intérieur de la cellule.

L et R : parties gauche et droite de l'observateur (**L et R** extérieurs) et de l'appareil oral (**L et R** intérieurs).

A : infraciliature de la partie droite parorale qui est formée des cinéties vestibulaires (**VK**), d'un champ anarchique de corps basaux (**AF**) et des cinéties parorales (**PA**). Associé aux "oral ribs" (**OR**), le rideau de microtubules post-ciliaire venant de la **PA** forme un réseau de fibres post-orales (**PO**). Une partie du quadrulus dorsal (**Q**) est visible. La suture antérieure (**S**) divise l'appareil oral en 2 zones inégales le long de la zone cytostomale.

B : infraciliature de la partie gauche adorale qui est formée des cinéties vestibulaires (**VK**), de 2 peniculi (**P1** et **P2**), d'un quadrulus (**Q**), composés chacun de 4 rangées de corps basaux, et d'un long réseau de microtubules flexibles appelé fibre cytopharyngienne (**CF**) provenant de **P1**, **P2** et **Q**. Un réseau compact microfilamenteux (**MN**), également présent sous la région parorale où il prend un aspect réticulé, est associé aux microtubules post-ciliaires venant des corps basaux des organelles **P1**, **P2** et **Q**. La zone cytostomale (**CY**) s'étend entre les parties droite et gauche de l'appareil oral, sur la partie dorsale du quadrulus où les vacuoles se forment et glissent le long des microtubules post-oraux (les structures montrées par les flèches courbées sont ciliées, l'**AF** n'est pas cilié).

D'après Iftode et al., 1997.

autour des trichocystes et des corps basaux ainsi qu'au niveau des crêtes à la surface de la cellule.

III. Cytosquelette et morphogenèse cellulaire chez les modèles *Tetrahymena* et *Paramecium*

A. Stomatogenèse

Chez *Tetrahymena*, le primordium oral apparaît en position postérieure de la région équatoriale alors que l'ancien appareil oral, placé dans la future cellule fille antérieure, subit une désorganisation partielle. Le nouvel appareil oral se développe à partir d'un champ anarchique de corps basaux qui s'organisent en 3 complexes de 3 rangées constituant chacun les membranelles M1, M2 et M3 (Bakowska et al., 1982). La membrane ondulante, également nommée parorale, apparaît ensuite sur le côté droit du primordium oral. Un réseau de microtubules, appelé "ribbed wall" (également nommé DFB Fig. 38), s'organise alors à partir de la rangée interne de corps basaux de la parorale et convergent vers le cytostome (Fig. 40). Parallèlement, l'ancien appareil oral renouvelle sa parorale et son ribbed wall de façon synchronisée avec le primordium oral.

Chez la paramécie, le primordium oral se forme à proximité de l'ancien et est hérité par la cellule fille postérieure alors que l'ancien est conservé par la cellule antérieure. Le nouveau primordium oral est formé à partir d'un champ anarchique de corps basaux ayant proliféré depuis de l'ancien appareil oral (Iftode et al. 1997). Deux vagues de duplication de corps basaux, parallèles et en avance par rapport aux vagues de duplication observées au niveau somatique, permettent d'initier la stomatogenèse chez la paramécie, suggérant l'implication de nombreuses cascades de réactions biochimiques dont l'appareil oral serait l'épicentre initial (Iftode et al., 1989 ; voir paragraphe III. B. Morphogenèse du cortex somatique). La prolifération initiale des corps basaux se produit à proximité de la parorale qui reste invariante et semble dicter le modelage de l'ébauche orale. Le nombre de corps basaux dans le champ anarchique est déterminé pendant la formation du primordium oral. Pendant ce processus, une légère rotation corticale est observée autour de l'axe antéro-postérieur de la cellule. Une

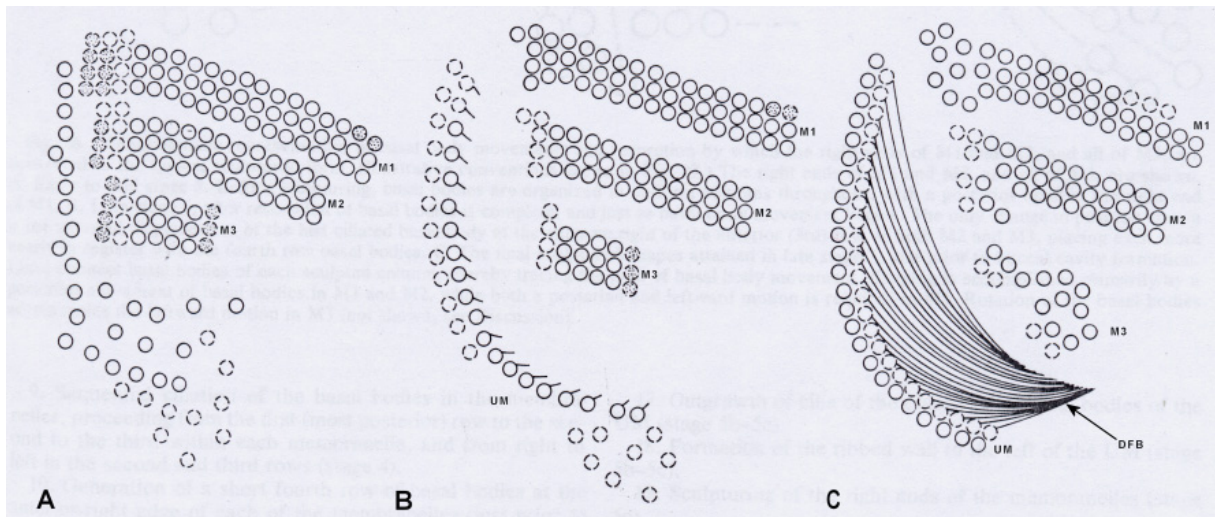


Fig. 40 : Représentation schématique de la formation du primordium oral chez *Tetrahymena thermophila*.

M1-3 : membranelles adorales ; **UM** : parorale ; **DFB** : "ribbed wall" ou tractus profond

D'après Bakowska et al., 1982

asymétrie gauche-droite, constatée sur la base de la disposition des corps basaux, est progressivement mise en place au cours de la stomatogenèse et caractérise l'assemblage morphogénétique complet de l'appareil oral chez la paramécie.

L'incubation des cellules en présence de 6-DMAP (6-diméthylaminopurine ; inhibiteur d'activité sérine-thréonine kinase) a montré que la phosphorylation a un rôle essentiel dans la stomatogenèse chez la paramécie (Kaczanowska et al., 1996). Le 6-DMAP engendre des anomalies dans la migration et l'organisation de la ciliature et des réseaux filamenteux des parties droite et gauche du nouveau primordium oral. Des anomalies sont également observées dans la partie droite de l'ancien appareil oral au niveau de la parorale et des "oral ribs".

B. Morphogenèse du cortex somatique

Les protozoaires ciliés sont des modèles de choix pour étudier les mécanismes de morphogenèse cellulaire en raison leur organisation corticale complexe caractérisée par la répétition d'organelles (corps basaux, extrusomes, etc...) ou la présence de structures différenciées (vacuoles contractiles et appareil oral) leur conférant une asymétrie antéro-postérieure et dorso-ventrale. En raison de cette asymétrie, la cellule doit, au cours de la division, réorganiser son cortex afin de former deux individus identiques : elle élabore notamment un nouvel appareil oral puis grandit par allongement des cinéties et met en place le sillon de division qui est le site de constriction permettant de séparer les deux cellules filles nommées proter (antérieur) et opisthe (postérieur). Lors de la division, la reconstruction de l'architecture corticale et de la forme de la cellule est le résultat d'un programme développemental complexe faisant intervenir à la fois des évènements morphogénétiques locaux imposés par une organisation pré-existante, mais aussi des signaux intracellulaires dont les effets semblent varier en fonction du territoire ciblé (Jerka-Dziadosz et Beisson, 1990).

Chez *Tetrahymena*, la première manifestation visible du processus de morphogenèse somatique est la duplication des corps basaux. Le nouveau corps basal se forme à l'extrémité proximale de l'ancien et perpendiculaire à son axe. En début de division, il est constitué d'un cylindre court de 9 microtubules uniques, formant le corps pro-basal. Ces microtubules

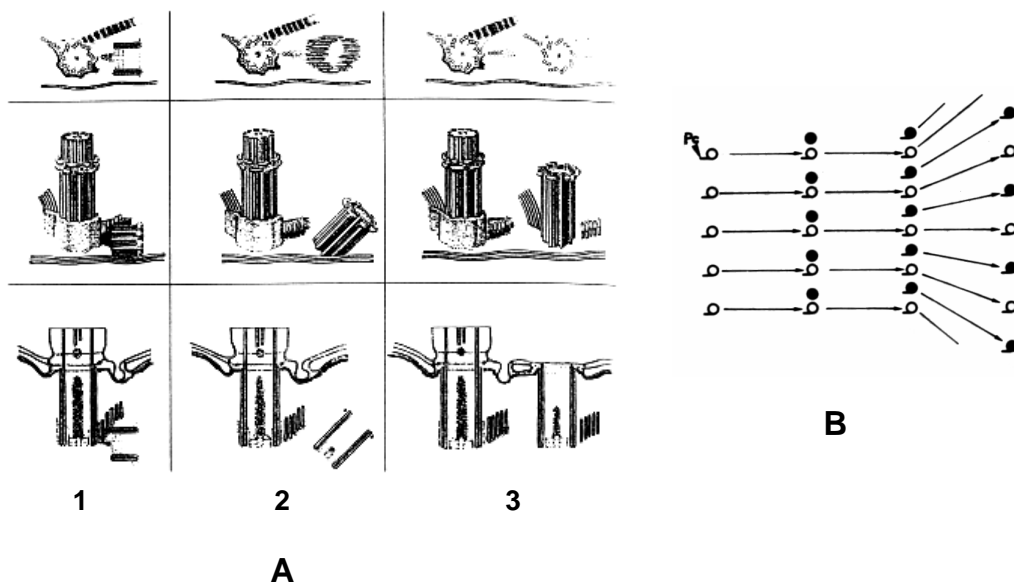


Fig. 41 : Duplication et positionnement des nouveaux cinétosomes chez *Tetrahymena pyriformis*.

A : Représentations résumant en trois étapes de la formation des nouveaux cinétosomes chez *Tetrahymena* : vue de dessus (haut), représentation tridimensionnelle (milieu) et coupe longitudinale (bas) du procinétosome (1), du redressement du nouveau cinétosome (2) et du positionnement définitif avec l'apparition des fibres associées (3).

B : Représentation illustrant la duplication des cinétosomes chez *Tetrahymena* au niveau somatique jusqu'à la phase finale d'écartement. En noir sont représentés les nouveaux cinétosomes et en blanc les anciens.

D'après Allen, 1969 et De Puytorac et al., 1987.

uniques deviennent ensuite un triplet qui s'allonge et s'incline vers la surface de la cellule. L'élongation terminée, le nouveau corps basal rentre alors en contact avec l'épithélium en adoptant une orientation parallèle à l'ancien corps basal. Une destabilisation du cortex est alors observée au niveau du site d'implantation des futurs cinétosomes permettant ainsi de les implanter à la surface de la cellule. Chaque nouveau cinétosome apparaît aligné en position antérieure par rapport à l'ancien. Corrélativement, la strate épithéliale s'allonge par addition intussusceptive de matériel et sépare ainsi les cinétosomes adjacents (Allen, 1969 ; De Puytorac et al., 1987 ; Fig. 41). Ces données ont été confirmées par Williams et al., (1990) à l'aide de marquages par l'anticorps monoclonal 424A8. En immunofluorescence cet anticorps décore une région en forme d'anneau délimitant le pourtour des cinétosomes correspondant à un territoire exclus de celui marqué par les anticorps anti-épithélium de *Tetrahymena*. Les protéines reconnues par l'anticorps 424A8, appelées antigènes "K" (39-44 kDa), sont aussi localisées à la périphérie des membranelles dans l'appareil oral. La distribution des antigènes K autour des cinétosomes matures est asymétrique contribuant ainsi à la polarité de la cellule. Lors de la division, les antigènes K remplacent localement le matériel épithélial formant ainsi le site d'ancrage du nouveau cinétosome à la surface cellulaire. Le marquage par l'anticorps 424A8 a permis de mettre en évidence l'apparition du nouveau cinétosome en position antérieure de l'ancien, l'anneau péricinétosomal du nouveau corps basal étant plus petit que celui de l'ancien. Les antigènes K constituent ainsi des marqueurs de la différenciation corticale chez *Tetrahymena*.

L'anticorps monoclonal MPM2, dirigé contre des protéines phosphorylées sur les résidus sérine et thréonine, a été utilisé afin de suivre la distribution des phosphoprotéines chez *Tetrahymena* (Kaczanowska et al., 1999). Pendant la division, un marquage se développe dans les corps basaux de façon asymétrique avec une amplification du signal au pôle apical et en position postérieure par rapport à la ligne de fission coïncidant à un déclin local des protéines épithéliennes. Un marquage est également observé dans les appareils oraux mais uniquement pendant les stades précoces de division. Ces résultats montrent l'implication de l'asymétrie du sillon de division dans la génération d'une métamérie dans le cortex de *T. pyriformis*. Par ailleurs, l'ajout de 6-DMAP dans le milieu de culture de cellules de *T. pyriformis* synchronisées, à différents stades de division, provoque soit des anomalies de la cytokinèse (sillon de division déplacé ou partiellement formé) soit son inhibition soit la formation de cellules filles présentant une réorganisation incomplète de l'appareil oral. La phosphorylation des protéines serait donc un mécanisme indispensable à l'entrée, la

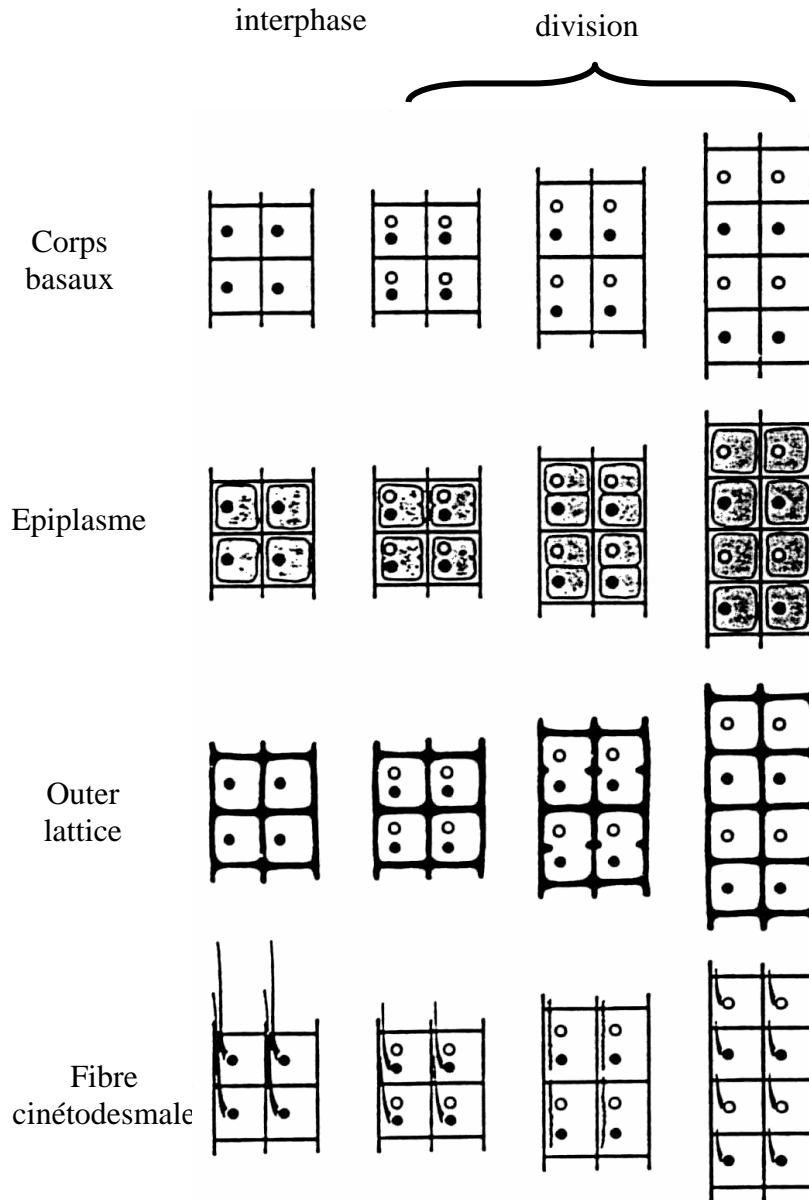


Fig. 42 : Événements de morphogénèse corticale chez la paramécie.
 Ce schéma montre la succession des événements que subissent les constituants d'une unité corticale pendant la division de la cellule.

D'après Ifode et al., 1989.

progression et l'achèvement de la cytokinèse ainsi qu'à la maturation de certains complexes organellaires comme l'appareil oral chez *Tetrahymena*. Plus récemment, des études menées par Kaczanowska et al. (2003) ont montré que le 6-DMAP augmente la fréquence des cellules morphogénétiquement actives et, en plus du blocage de la division, induit une réorganisation de l'appareil oral dans une sous-population de cellules. Cependant, les primordia oraux formés sont instables et de plus grande taille. Le 6-DMAP inhiberait donc des kinases impliquées dans la transition entre un état morphogénétiquement actif et un état morphostatique qui est nécessaire à l'aboutissement de la réorganisation de l'appareil oral et de la division chez *Tetrahymena*.

En Western blot, un anticorps monoclonal (3A7), reconnaît une protéine de 64 kDa, appelée fenestrine, qui s'accumule dans les cellules traitées au 6-DMAP. Pendant la division, la fenestrine apparaît, de manière concomitante à un retrait local des protéines épiplasmiques B, dans le champ anarchique du nouvel appareil oral. Par ailleurs, dans les cinéties, les corps basaux en prolifération sont entourés d'un anneau de fenestrine apparaissant ainsi comme un marqueur de polarité des cinétosomes et donc également de la polarité cellulaire globale. A des stades avancés de cytokinèse et juste après la séparation des cellules filles, la présence de fenestrine apparaît également comme un caractère du pôle antérieur des cellules, associé à une résorption locale des protéines épiplasmiques B. Le marquage au pôle apical dans les cellules traitées par le 6-DMAP suggère que l'établissement de l'axe antéro-postérieur précède la stabilisation de la morphogénèse orale (état morphostatique) au cours de la réorganisation de l'appareil oral et de la cytokinèse chez *Tetrahymena* (Kaczanowska et al., 2003).

Chez la paramécie, la division est précédée par la duplication des vacuoles contractiles et l'initiation du nouvel appareil oral qui se développe à la droite de l'ancien. Lors de la division, le nouvel appareil oral s'intègre dans la partie postérieure du sillon de division et s'en éloigne témoignant ainsi de l'allongement de la cellule (Iftode et al., 1989). Au niveau cortical, lors de la duplication des corps basaux, les écailles épiplasmiques s'accroissent par addition intussusceptive de matériel provoquant ainsi un allongement longitudinal de l'outer lattice. Cet allongement est suivi d'une segmentation de la couche épiplasmique et de l'outer lattice conduisant à l'individualisation de deux nouvelles unités corticales. Une régression partielle des fibres cinétodesmales est également observée à la suite de la duplication des corps basaux (Fig. 42). D'autre part, pendant la division, des réseaux de microtubules longitudinaux se



Fig. 43 : Représentation schématique des zones corticales chez la paramécie.

D'après Iftode et al., 1989.

mettent en place pour former un cytofuseau dont le rôle serait de maintenir l'organisation des rangées ciliaires pendant la croissance de la cellule.

Le cortex de la paramécie se divise en 5 zones en fonction du nombre de corps basaux par unité corticale et de la duplication ou non de ces unités au cours de la division (Fig. 43). Dans certaines zones du cortex (zones invariantes 3 et 4), représentant 10% des unités corticales de la cellule, aucune duplication de corps basal n'est observée, contrairement aux autres zones qui présentent une multiplication active des cinétosomes, celle-ci se réalisant en une ou deux étapes. Une première vague de duplication permettant de doubler le nombre d'unités corticales s'effectue en deux temps : tout d'abord dans l'ensemble des unités corticales des zones 1 et 5 puis uniquement dans la zone 1, dans une région centrale en position ventrale et dans une fine bande équatoriale en position dorsale. Cette première vague de duplication est suivie par une deuxième, dans les zones 1, 2 et 5, pendant laquelle un second corps basal apparaît dans chaque unité corticale.

L'appareil oral apparaît comme un épicycle initial relayé par le sillon de division à partir desquels progressent des vagues morphogénétiques vers les pôles antérieur et postérieur de la cellule. Chez la paramécie, il existe deux facteurs majeurs dans ce programme développemental : 1) les signaux transcellulaires qui induisent la réorganisation, l'assemblage et la duplication des structures ; 2) les réponses différentielles des territoires à la propagation du signal. Ce dernier facteur peut être interprété à l'aide de deux concepts :

- les différents territoires sont structurellement identiques et leur répartition dépend de la distribution des signaux morphogénétiques.
- la différenciation des territoires est pré-établie et héritée de la division précédente ; les signaux morphogénétiques se propagent de manière homogène dans la cellule.

Cette dernière hypothèse serait soutenue par le fait que le cortex de la paramécie est formé de différentes aires qui présentent des propriétés physico-chimiques distinctes.

Préalablement à chaque vague de duplication, les corps basaux s'individualisent dans les unités corticales en formant leurs propres racines ciliaires (Iftode et Fleury-Aubusson, 2003). Ces auteurs ont montré que le modèle de duplication des corps basaux proposé par Allen (1969) chez *Tetrahymena* est également applicable à *Paramecium*. Tout comme chez *Tetrahymena*, la polarité des corps basaux et de leurs fibres associées serait contrôlée par les anciennes structures (parentales) pré-existantes. Chez *Paramecium*, il a été également mis en évidence une migration du nouveau corps basal le long de la fibre cinétodesmale de l'ancien.

D'autre part, la polymérisation des tubules B et C se ferait dans l'axe proximo-distal du nouveau corps basal à partir de son extrémité proximale (Iftode et Fleury-Aubusson, 2003).

Le mutation *crochul* provoque une hyperduplication des corps basaux et une altération des microtubules (Jerka-Dziadosz et al., 1998). L'instabilité des microtubules, normalement accrue pendant la division, persiste pendant l'interphase de ce mutant et produit un signal constitutif de duplication des corps basaux. D'autre part, une mutation thermosensible dans le gène *KIN241* provoque une importante désorganisation du cortex chez la paramécie (Jerka-Dziadosz et al., 1992). Plusieurs anomalies sont observées au niveau des corps basaux chez ce mutant : microtubules supplémentaires ou nucléation d'une seconde fibre cinétodesmale ou orientation anormale des corps basaux néoformés. Cette dernière altération semble être à l'origine de la formation de rangées ciliaires inversées. Le second effet majeur de cette mutation concerne la réorganisation spatio-temporelle du cortex durant la division. Un excès de prolifération des corps basaux est observé en corrélation avec une modification de la limite de certaines zones corticales. Cette mutation ne semblerait altérer ni la nature des signaux morphogénétiques ni la capacité des structures cytosquelettiques à répondre à ces signaux mais affecterait plutôt l'interprétation locale de ces signaux. La protéine codée par le gène *KIN241* a récemment été identifiée. Elle appartient à une nouvelle famille de protéines, appelée CRIP (Cyclophillin-RNA Interacting Protein), retrouvée dans de nombreux organismes de la levure à l'homme (Krzywicka et al., 2001). Cette protéine semblerait être impliquée dans la maturation de certains ARNm impliqués dans la morphogenèse chez la paramécie.

En immunofluorescence, à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-fibres cinétodesmales et de l'anticorps MPM2 dirigé contre les phosphoprotéines, Sperling et al. (1991) ont montré qu'un des signaux morphogénétiques qui se propage lors de la division de la paramécie correspond à une vague de phosphorylations qui se superpose à la réorganisation spatiale des fibres cinétodesmales. Des analyses bidimensionnelles en Western blot accompagnées de traitements à la phosphatase alcaline ont montré que 3 des 5 protéines de 30 à 36 kDa composant les fibres cinétodesmales sont des phosphoprotéines. Ces trois composants, phosphorylés à l'interphase, sont hyperphosphorylés lors du désassemblage des fibres pendant la division. Chez la paramécie, l'anticorps monoclonal MPM2 marque les fibres cinétodesmales uniquement pendant la mitose (Keryer et al., 1987). Cet anticorps réagit également avec des protéines de 60, 63 et 116 kDa qui sont des composants présents à la fois

dans les fractions protéiques de cortex et d'appareils oraux. Le marquage observé en immunofluorescence ainsi que l'immunoréactivité de ces protéines disparaissent après un traitement à la phosphatase alcaline. Ces résultats indiquent que le processus de phosphorylation chez la paramécie est impliqué dans une dynamique de structures corticales dépendante du cycle cellulaire.

Pendant la transition à l'interphase, le traitement par le 6-DMAP altère l'interaction des corps basaux avec divers éléments cytosquelettiques tels que les fibres cinétodesmales, l'épiplasma ou le réseau infraciliaire (Kaczanowska et al., 1996). Le réseau infraciliaire (ICL) est un réseau contractile qui se désorganise au cours de la division cellulaire. La contractilité ainsi que le cycle d'assemblage/désassemblage de cette structure sont dépendants des concentrations cytosoliques en Ca^{2+} ainsi que de phosphorylations (Garreau de Loubresse et al., 1988 ; Garreau de Loubresse et al., 1991). Par ailleurs, en immunocytochimie ultrastructurale, une protéine à activité phosphatase, la calcineurine, a été localisée dans l'ICL et pourrait donc intervenir dans un mécanisme de déphosphorylation (Momayezi et al., 2000). Le réassemblage de l'ICL lors de la division s'effectuerait à partir d'un centre organisateur de réseau infraciliaire (ICLOC) qui est proche des corps basaux et qui se distingue des centres organisateurs des racines ciliaires microtubulaires (MTOC1 et MTOC2) ou cinétodesmales (CROC ; Beisson et al., 2001). Les centrines localisées dans ce réseau (voir paragraphe I. C. Les réseaux de centrines chez les modèles *Tetrahymena* et *Paramecium*) sont associées avec des protéines de fort poids moléculaires de 220 et 350 kDa. Cette dernière, remplacée par un doublet de plus faible poids moléculaire (200 kDa) dans le mutant "démaillé" (*dem1*), est essentielle à la biogenèse de l'ICL (Klotz et al., 1997). Les gènes *ICL1a* et *ICL1b* ont été les premiers utilisés, avec des gènes liés à l'exocytose des trichocystes (*T1b* et *T4a* de la famille des TMP ou *ND7*), lors d'expériences de "gene silencing" chez la paramécie (Ruiz et al., 1998). Les études utilisant cette approche sont couramment développées chez la paramécie et permettent d'analyser de manière dépendante de l'homologie de séquence la fonction d'un gène chez cet organisme. Actuellement, chez la paramécie, deux méthodes permettent d'induire ce mécanisme : la microinjection d'ADN ou d'ARN double-brins ou l'ingestion de bactéries produisant des ARN double brins, appelée méthode de "feeding".

PARTIE III

**L'interférence ARN : un processus conservé chez
de nombreux organismes**

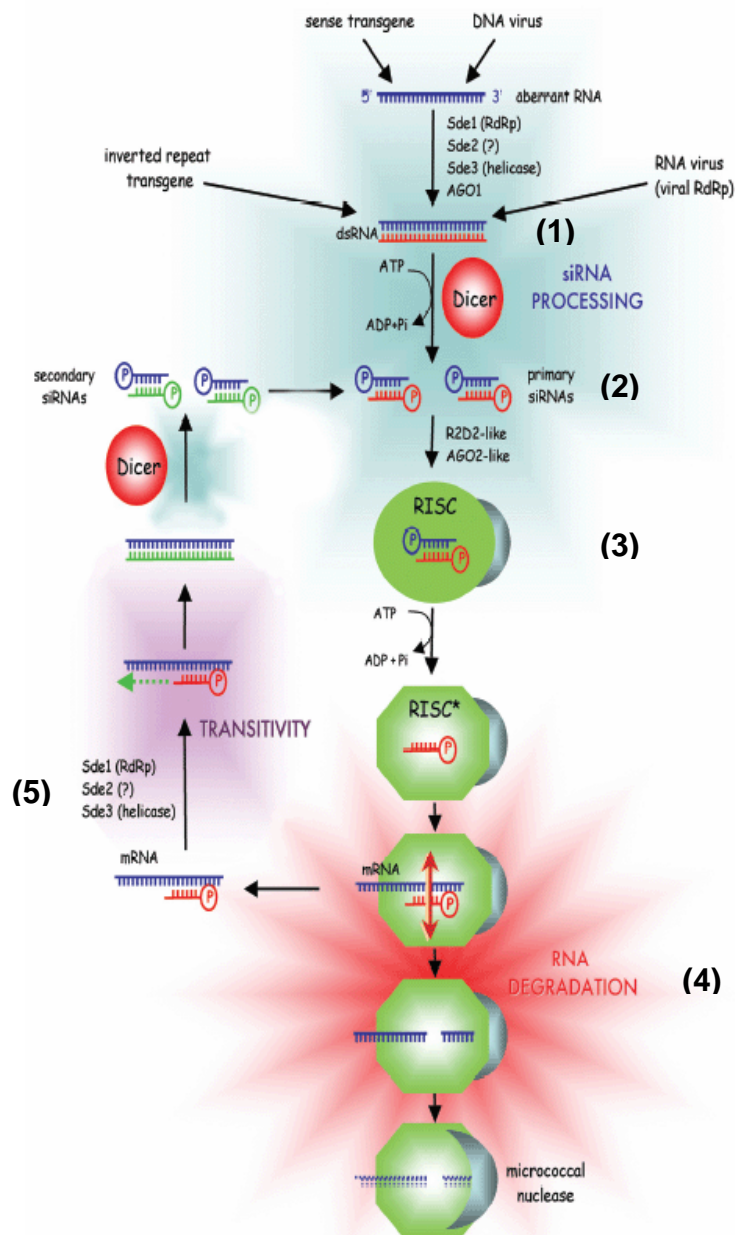


Fig. 44 : Représentation schématique regroupant les étapes principales du mécanisme de RNA silencing

- (1) Production de dsRNA.
- (2) Formation des siRNA.
- (3) Incorporation des siRNA dans le complexe RISC.
- (4) Dégradation de l'ARNm.
- (5) Amplification du signal grâce à l'activité RdRP.

D'après Lecellier et Voinnet, 2004.

L'interférence ARN : un processus conservé chez de nombreux organismes

Un phénomène permettant d'inactiver l'expression d'un gène de façon spécifique à sa séquence a initialement été découvert en 1990 chez le pétunia suite à l'introduction d'un transgène homologue à un gène endogène et nommé "co-suppression". Par la suite, l'existence de ce mécanisme a été mise en évidence chez les champignons et le nématode *C. elegans* où il a été respectivement qualifié de "quelling" et "RNAi" (RNA interference). L'ensemble des processus de co-suppression, quelling et RNAi représentent différentes formes d'un mécanisme ancestral conservé et sont désormais regroupés sous le terme d'interférence ARN. L'induction de l'interférence ARN nécessite la production de molécules d'ARN double brins (dsRNA) qui sont prises en charge par une enzyme de type RNase III, nommée Dicer, pour former des ARN double brins de petite taille d'environ 20 à 25 nucléotides (nt). Ces petits ARN, appelés siRNA (small interfering RNA), sont incorporés sous forme simple brin dans un complexe multiprotéique appelé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) et sont ensuite appariés de façon séquence-spécifique à l'ARNm du gène cible. Deux alternatives sont alors possibles : (1) soit les siRNA servent d'amorces pour la synthèse d'un nouveau dsRNA à partir d'une activité RNA-dépendante RNA polymérase (RdRP) permettant alors d'amplifier le signal d'interférence ARN ; (2) soit l'ARNm apparié au siRNA est dégradé par le complexe RISC (Fig. 44). L'interférence ARN est un processus physiologique nécessaire à une grande variété d'organismes eucaryotes pour leur défense contre les virus ou l'invasion du génome par des éléments transposables, la régulation de l'expression de gènes au cours du développement ou la maintenance ou l'élimination de séquences hétérochromatiques. Actuellement, plusieurs approches techniques (injection de dsRNA, de transgènes ou de virus ou ingestion de bactéries produisant des dsRNA) permettent d'induire ce mécanisme dans de nombreux organismes dans le but d'étudier la fonction d'un gène d'intérêt. L'interférence ARN est également utilisable dans un but thérapeutique ou à l'échelle du génome d'un organisme pour l'analyse de la fonction de gènes de façon systématique. Dans cette partie nous présentons l'avancée des connaissances sur le mécanisme d'interférence ARN, sur ses applications et sur son utilisation en tant qu'outil d'analyse fonctionnelle.

I. Découverte du phénomène d'interférence ARN chez les plantes, les champignons et le nématode *C. elegans* (voir pour revue Montgomery, 2004)

Le mécanisme de co-suppression a été découvert chez les plantes de façon inattendue lors d'expériences visant à surexprimer, à l'aide du promoteur fort 35S, les gènes de chalcone synthase (*chsA*) ou de dihydroflavonol-4-réductase (*dfr*) impliqués dans la pigmentation pourpre des pétales chez le pétunia. Parmi les transformants, une diminution voire une disparition de la pigmentation des pétales est observée. Cette diminution est corrélée avec la perte d'activité à la fois du gène endogène et du transgène. Par la suite, des expériences de run-on ont montré que le processus de co-suppression agit au niveau post-transcriptionnel et résulte d'une dégradation spécifique des ARNm. A la suite de ces travaux, ce processus a également été appelé PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing).

Un phénomène similaire de silencing post-transcriptionnel, nommé "quelling", a été également observé chez le champignon *Neurospora crassa* à la suite de la transformation du transgène *albino-1* ou *al-1*. Il a ainsi été montré qu'une séquence transgénique doit contenir au moins 132 pb homologues à la séquence codante du gène endogène pour réduire le taux de son ARNm dans la cellule. Dans des souches hétérocaryoniques présentant un noyau transgénique et un noyau sauvage, l'extinction génique est dominante. Ce résultat montre qu'une molécule signal est capable de diffuser vers le cytoplasme et/ou vers le noyau et d'agir en *trans* pour inactiver l'expression d'un gène endogène. D'autre part, le phénomène de quelling est fréquemment associé à la présence de répétitions en tandem du transgène dans le génome.

Des études menées chez le ver *C. elegans* ont montré que l'ARN antisens produit par un transgène ou directement injecté dans les gonades est capable de cibler spécifiquement l'ARN sens et d'induire un phénotype correspondant à un mutant "perte de fonction" (Fire et al., 1991). Cependant ces auteurs ont montré que l'injection d'ARN sens a curieusement le même effet. En réalité, une faible proportion d'ARN double brins (dsRNA) serait produite lors de la synthèse *in vitro* des ARN antisens et serait responsable de l'effet observé (Fire et al., 1998). L'injection de dsRNA correspondant à la séquence codante de gène endogène entraîne une perte de fonction de ce gène concordant à une élimination de son ARNm (Fire et al., 1998). Il

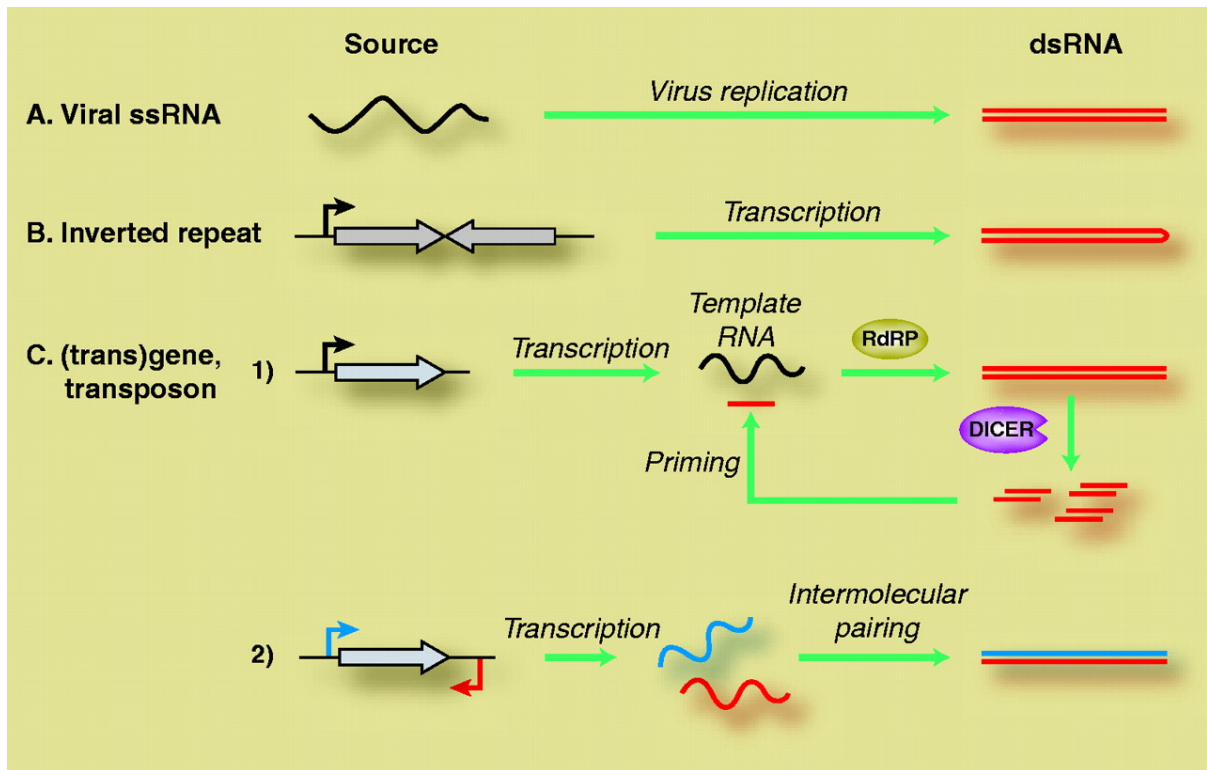


Fig. 45 : Mécanisme de formation des dsRNA chez les plantes.

Les dsRNA peuvent être générés suite à la réplication de virus (A) ou la transcription de répétitions inversées (B). Ils peuvent également se former à partir de gènes endogènes ou de transposons dont les transcrits deviennent les substrats de la RNA-dépendante RNA polymérase (RdRP ; C). Les ARN double brins peuvent également être formés à partir de la transcription de promoteurs en orientations inversées.

D'après Mathieu et Bender, 2004.

a été montré dans ce travail que d'abondantes quantités d'ARN sens ou antisens hautement purifiés sont nécessaires pour observer un effet sur le phénotype alors qu'une faible dose de dsRNA est suffisante pour induire une interférence sur un pool d'ARNm endogène et produire un phénotype pendant plusieurs générations. Ce résultat semble réfuter l'idée d'une interférence stoechiométrique des ARNm endogènes mais indique plutôt que le phénomène est catalytique ou issu de l'amplification d'un composant. Le site d'injection n'a pas d'influence sur l'apparition du phénotype. D'autre part, aucun effet n'est observé à la suite de l'injection d'une séquence intronique. Une étude menée par Montgomery et al. (1998) a montré que ce phénomène, appelé RNA interference (RNAi), pouvait cibler de façon spécifique la séquence d'un gène dans un opéron sans affecter l'activité des gènes voisins. Par conséquent, le RNAi n'affecte pas l'initiation ou l'élongation de la transcription mais intervient au niveau post-transcriptionnel. Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré une disparition du signal des transcrits cytoplasmiques alors que la quantité de transcrits naissant dans le noyau ne semble pas varier, confirmant ainsi que la molécule ciblée dans ce mécanisme est l'ARNm. Le séquençage des gènes ciblés par les dsRNA n'a révélé aucune altération ou mutation montrant ainsi que l'interférence n'atteint pas la séquence du gène. Par la suite, le mécanisme d'interférence ARN a été mis en évidence dans de nombreux organismes eucaryotes allant des protozoaires aux métazoaires (voir paragraphe IV : L'interférence ARN : un outil d'analyse fonctionnelle applicable à un grand nombre d'organismes).

II. Le mécanisme d'interférence ARN

A. Un intermédiaire commun : l'ARN double-brins (dsRNA)

Chez les plantes, l'interférence ARN peut être induit suite à l'insertion d'un transgène en copie unique ou en répétition inversée (IR) ou une infection virale (Fig. 45). Ces différents événements conduisent à la synthèse d'un intermédiaire commun, le dsRNA, qui est clivé par l'enzyme Dicer afin de produire les effecteurs du mécanisme d'interférence ARN : les siRNA (Fig. 44, étape 1).

B. Synthèse des siRNA : la protéine Dicer (Fig. 44, étape 2 ; voir pour revue Agrawal et al., 2003 ; Kim, 2005)

Cette protéine est une enzyme à activité RNase III, identifiée chez la drosophile, capable de cliver des dsRNA et de produire des fragments de 22 bp similaires aux siRNA (Bernstein et al., 2001 ; voir ci-dessous). Elle possède 4 domaines de fonctions distinctes : un domaine hélicase en N-terminal, deux domaines RNase III, un domaine de liaison aux dsRNA et un domaine PAZ de 110 acides aminés caractéristique de la famille des protéines Argonaute impliquées dans le processus d'interférence ARN (voir paragraphe II. D. Mode d'action des siRNA: le complexe RISC).

La nucléase Dicer est retrouvée dans de nombreux organismes comme la levure *S. pombe*, le ver *C. elegans*, les plantes ou les mammifères. Dans le génome de ces organismes, Dicer est présent en un (levure, ver, homme), deux (*DCR1* et *DCR2* chez la drosophile) ou quatre exemplaires (*DCL1*, *DCL2*, *DCL3*, *DCL4* chez *A. thaliana*). Chez la drosophile, la majeure partie des siRNA serait produite à partir d'un hétérodimère associant Dicer avec le facteur R2D2 qui est composé de deux domaines de liaison aux ARN double brins. La protéine R2D2 est essentielle à l'incorporation du siRNA dans un complexe ribonucléoprotéique intervenant dans la dégradation des ARNm de façon séquence-spécifique appelé RISC (RNA-Induced Silencing Complex).

C. Effecteurs de l'interférence ARN : les siRNA (Fig. 44, étape 2 ; voir pour revue Agrawal et al., 2003)

Suite aux premiers résultats mettant en évidence l'interférence ARN, il a été suggéré que des molécules d'ARN antisens spécifiques et de même longueur que l'ARN ciblé seraient impliquées dans ce mécanisme. Or, aucune technique classique de détection d'ARN n'a permis de mettre en évidence de telles molécules. Ces ARN antisens étaient, en fait, trop petits pour pouvoir être détectés au niveau méthodologique. Les travaux de Hamilton et Baulcombe (1999) ont alors confirmé cette hypothèse en caractérisant des ARN de 25 nt, d'orientation sens et antisens, homologues à l'ARN ciblé et associés à tous les types d'interférence ARN rencontrés chez les plantes : insertion d'un transgène ou infection virale. Par ailleurs, ces ARN double brins de petite taille, nommés siRNA, sont également détectés dans des cellules de

drosophile suite à la transfections de dsRNA d'une longueur supérieure à 500pb (Hammond et al., 2000).

Chez les mammifères, la transfection de siRNA permet également d'induire le mécanisme d'interférence ARN (Calegari et al., 2002 ; Chiu et Rana, 2002). Cependant, la transfection de dsRNA d'une taille supérieure à 30 nt déclenche une inactivation de l'expression de gènes de façon non-spécifique à leur séquence dans le cadre de la réponse immunitaire interféron-dépendante. Cette voie est caractérisée par l'activation d'une protéine kinase (PKR) qui inhibe l'initiation de la traduction dans la cellule et d'une 2', 5' oligoadénylate synthétase (2', 5' OAS) stimulant une activité RNase L qui dégrade les ARN cellulaires (Stark et al., 1998).

Des travaux réalisés par Elbashir et al. (2001a) ont montré que les siRNA sont générés par une coupure enzymatique de type RNase III : chacun des brins présente un groupement phosphate en 5' et hydroxyl en 3' et possède 2 à 3 nucléotides sortants à l'extrémité 3'. La substitution d'un seul nucléotide sur le siRNA peut inactiver l'interférence ARN (Elbashir et al., 2001b). Les siRNA peuvent non seulement limiter l'expression du gène cible mais aussi de gènes possédant une identité partielle avec ces molécules (Jackson et al., 2003). Ces auteurs avaient suggéré que l'utilisation de différentes combinaisons de siRNA spécifiques d'un gène cible était en mesure d'augmenter l'efficacité du processus de silencing. Cette hypothèse a été confirmée par les travaux réalisés par Ji et al. (2003) montrant que l'utilisation d'un pool de siRNA spécifiques d'un gène cible augmente l'effet de l'interférence ARN.

D. Mode d'action des siRNA : le complexe RISC (RNA-Induced

Silencing Complex) (Fig. 44, étapes 3 et 4 ; voir pour revue, Tomari et Zamore, 2005)

L'activité du complexe RISC peut être distinguée de celle responsable de la coupure des dsRNA suggérant ainsi l'existence de deux étapes distinctes assurées par deux enzymes différentes dans le processus d'interférence ARN (Bernstein et al., 2001). A partir de centrifugations différentielles de lysats de cellules S2 de drosophiles transfectées par des dsRNA, un complexe protéique associé à des ribosomes a été isolé (Hammond et al., 2000). Un traitement à haute force ionique a permis d'écarter les ribosomes et de co-purifier un complexe protéique avec des ARN de 25 nt. Ce complexe ribonucléoprotéique, nommé RISC,

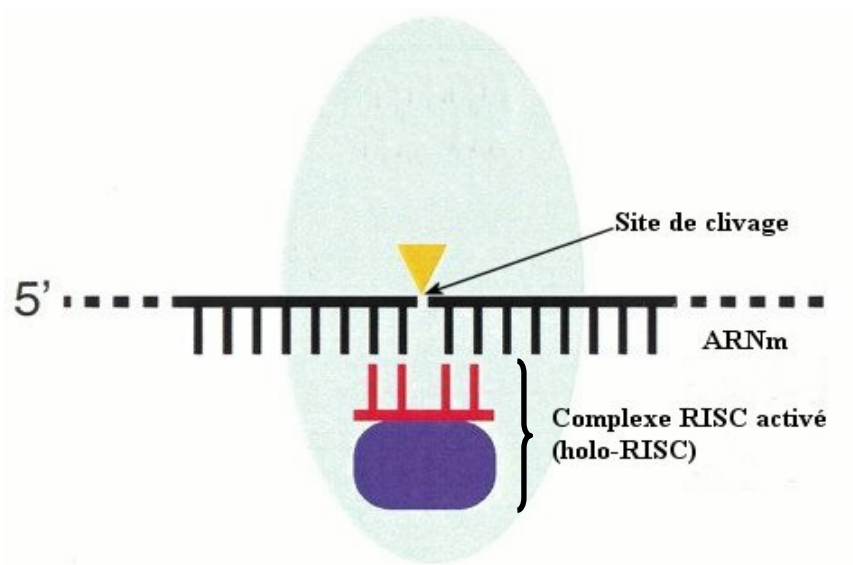


Fig. 46 : Clivage de l'ARNm par le complexe RISC.

Le site de clivage est situé sur l'ARN ciblé à proximité du centre du siRNA.

D'après Elbashir et al., 2001a.

possède une activité nucléase qui dégrade spécifiquement les transcrits homologues aux dsRNA transfectés. Ainsi, le complexe RISC servirait de guide aux siRNA pour cibler les ARNm homologues. L'analyse biochimique a permis d'identifier un composant protéique de la fraction active du complexe RISC (taille globale 500 kDa ; voir e.g. Hammond et al., 2001). Cette protéine de 130 kDa, nommée Argonaute2 (AGO2), contient un domaine PAZ, caractéristique de la famille Argonaute. L'analyse de mutants de protéines apparentées chez *C. elegans* (*rde1*), *A. thaliana* (*ago1*) et *N. crassa* (*qde2*) montre que les membres de la famille Argonaute sont conservés au cours de l'évolution et sont nécessaires dans le processus d'interférence ARN. En dépit de son rôle présumé dans l'interaction entre protéines de la même famille qui permettrait notamment l'incorporation de Dicer dans le complexe RISC, des études récentes ont montré que le domaine PAZ interagirait plutôt avec l'extrémité 3' simple brin des siRNA. L'association entre Dicer et le complexe RISC ne nécessite pas le domaine PAZ mais résulte en réalité d'une interaction entre le domaine RNase III de Dicer et un domaine caractéristique d'une sous-classe de la famille des protéines Argonaute, nommé PIWI. Ce dernier est également un homologue structural de la RNase H, une endoribonucléase clivant l'ARN dans les duplex ARN-ADN, et serait responsable de l'activité nucléase du complexe RISC. A la différence de la RNase H, le complexe RISC coupe le brin de l'ARN cible à environ 11 nucléotides de l'extrémité 5' du siRNA, à proximité de son centre (Fig. 46). Ce site de clivage serait déterminé par l'extrémité 5' du brin antisens du siRNA. Par ailleurs, des études de cristallographie ont montré que le domaine PIWI interagit avec le groupement phosphate de l'extrémité 5' du brin antisens des siRNA.

Par la suite, deux protéines de liaison à l'ARN, nommées VIG (Vasa Intronic Gene) et dFMRP (*Drosophila* Fragile X Mental Retardation Protein) ont été mises en évidence dans le complexe RISC. Dans cet assemblage multiprotéique, ces deux polypeptides sont également associés à une protéine apparentée aux nucléases micrococcales, nommée Tudor-SN ou TSN (Tudor Staphylococcal Nuclease). Cette dernière, retrouvée chez *Caenorhabditis*, *Drosophila* et les mammifères, dégraderait les ARNm issus du clivage séquence-spécifique médié par les siRNA. La protéine dFMRP s'associe également avec les protéines ribosomales L5 et L11 de l'ARN 5S, les protéines Ago2, Dicer et l'hélicase Dmp68 dont l'activité est nécessaire au mécanisme d'interférence ARN. Ce résultat montre qu'une relation existe entre les voies impliquant les enzymes de l'interférence ARN et la machinerie de traduction. Actuellement, de nombreux composants du complexe RISC restent à identifier. Un schéma général (Fig. 47) résume les principales étapes de l'assemblage du complexe RISC.

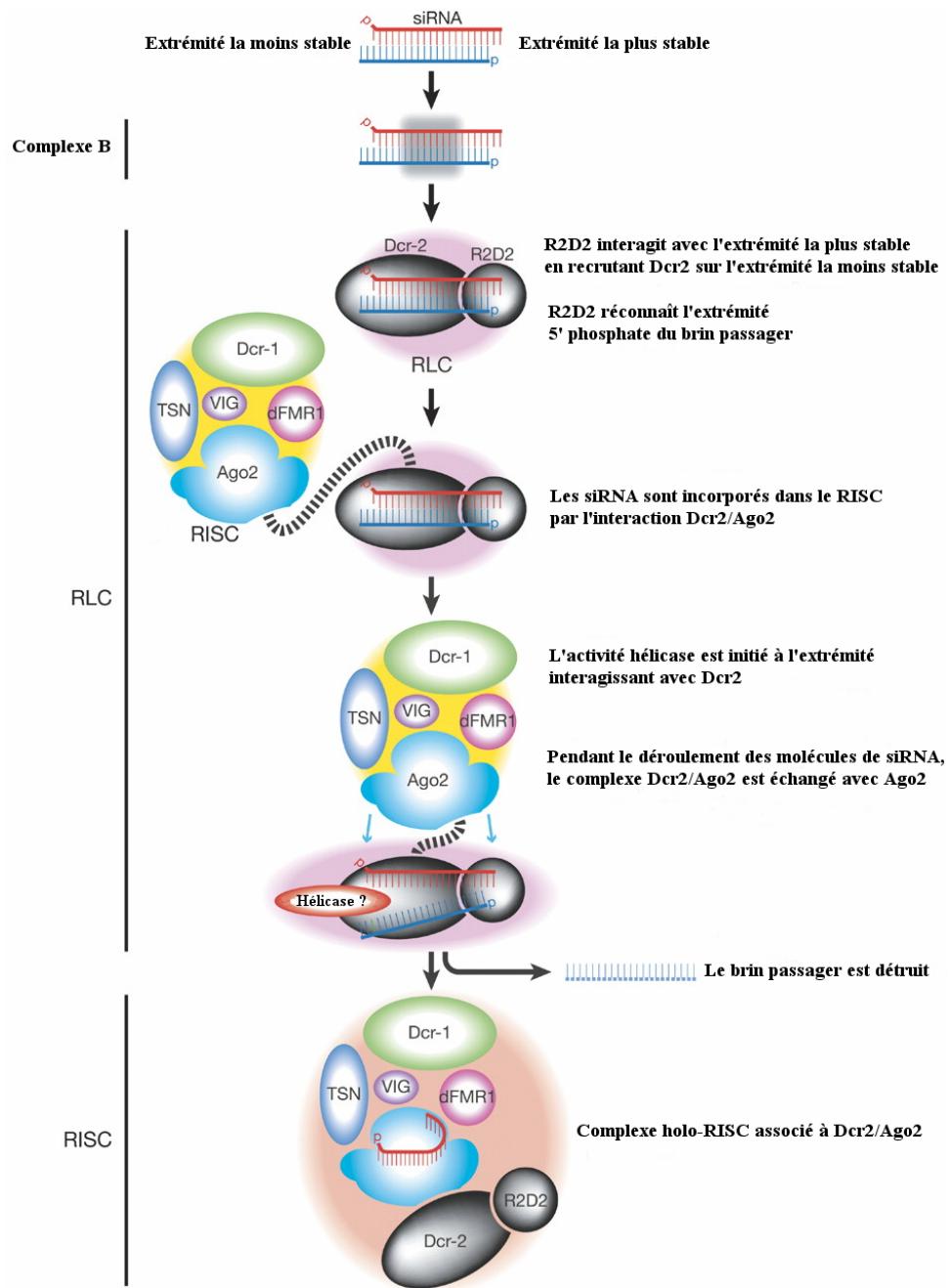


Fig. 47 : Assemblage du complexe RISC chez la drosophile.

D'après Tomari et Zamore, 2005.

E. Amplification du signal : l'ARN Polymérase ARN-Dépendante (RdRP) (Fig. 44 étape 5 ; voir pour revue Vaucheret et al., 2001 ;

Susi et al., 2004)

Suite aux premiers travaux menés sur l'interférence ARN, plusieurs modèles ont été proposés postulant sur la présence d'une enzyme de type RdRP. Ces hypothèses ont été confirmées par la caractérisation de QDE1 chez *Neurospora*, RDR1, RDR2, RDR3, RDR4, RDR5 et RDR6, aussi appelée SDE1/SGS2, chez *Arabidopsis* et EGO1 et RRF1 chez *Caenorhabditis*. Cependant, aucun gène homologue à la RdRP n'a été détecté dans les génomes de *Drosophila* et de l'homme suggérant que l'étape d'amplification du signal n'est pas indispensable au déroulement du mécanisme d'interférence ARN dans ces organismes. Bien que la fonction d'EGO1 se limite aux cellules germinales, une mutation dans la protéine RRF1 entraîne une altération du mécanisme d'interférence ARN dans les cellules somatiques chez *C. elegans*. Ce résultat montre que la fonction RdRP est présente dans l'ensemble de cet organisme. Deux gènes paralogues à *ego1* et *rrf1* ont également été caractérisés et nommés *rrf2* et *rrf3*. Une mutation dans le gène *rrf2* ne semble pas avoir d'influence sur le RNAi. Cependant, Simmer et al. (2002) ont découvert avec surprise qu'une perte de fonction du gène *rrf3* entraîne une hypersensibilité à ce processus d'extinction génique. Ce travail met alors en évidence l'existence d'un contrôle physiologique négatif du mécanisme d'interférence ARN chez le ver *C. elegans* médié par RRF3 entrant ainsi en compétition avec RRF1 et EGO1.

Des études réalisées chez *C. elegans* et *D. melanogaster* ont montré que les siRNA issus de la dégradation des dsRNA ciblent l'ARNm et sont utilisés comme amorces par une RdRP pour former des dsRNA de longues tailles qui sont ensuite clivés par l'enzyme Dicer. Les siRNA secondaires ainsi formés entreraient dans un nouveau cycle de reconnaissance-élongation-dégradation permettant l'amplification du signal. Chez *C. elegans*, la synthèse du brin antisens se fait seulement dans le sens 5'→3' alors que chez les plantes cette activité semblerait être bi-directionnelle et peut également être indépendante de la présence d'une amorce à de fortes concentrations en ARN cible. Chez *Neurospora*, la protéine QDE1 est également impliquée dans la synthèse *de novo* de l'ARN antisens pour produire deux populations d'ARN : les dsRNA et des ARN de 9 à 21nt simple brin homologues à l'ARN cible (Makeyev et Bamford, 2002). Ces résultats montrent que plusieurs activités distinctes d'une ou de plusieurs RdRP

peuvent être utilisées par la cellule pour induire l'interférence ARN de façon efficace. D'autre part, la RdRP est capable de produire des dsRNA à partir d'ARNm non spécifiques présentant de courtes séquences homologues à un groupe de siRNA et ainsi induire un mécanisme d'interférence ARN en *trans* (van Houdt et al., 2003). Le gène *SDE1/SGS2* est nécessaire à la co-suppression induite par un transgène fortement transcrit rendant donc essentielle la production de dsRNA dans ce mécanisme. Cependant le mutant *sde1/sgs2* ne présente aucune sensibilité particulière à certaines infections virales et peut également induire l'interférence ARN dans le cas de l'insertion d'un transgène en IR. Dans ces circonstances, les dsRNA étant directement produits par le transgène en IR ou par le virus lors de sa réplication, la fonction du gène *SDE1/SGS2* serait redondante.

III. Fonctions naturelles de l'interférence ARN

A. Résistance aux virus (voir pour revue Lecellier et Voinnet, 2004)

Les dsRNA sont des intermédiaires de réplication dans le cycle de vie des virus à ARN (la vaste majorité des virus chez les plantes). Lors de l'infection d'un virus chez les plantes, la présence de dsRNA pourrait activer une enzyme de type Dicer indépendamment de l'homologie de séquence avec le génome de l'hôte et générer des siRNA responsables du processus séquence-spécifique de défense antivirale. Une corrélation, en termes de rapidité et de distribution spatiale, a été mise en évidence entre la migration d'un signal systémique d'extinction génique et l'infection d'un virus. Il a ainsi été postulé que ce signal serait impliqué dans le mécanisme de protection antivirale naturelle chez les plantes.

Chez les plantes, le processus d'interférence ARN se manifeste tout d'abord par l'apparition de spots chlorotiques sur les feuilles infectées qui s'élargissent jusqu'à atteindre les vaisseaux et finalement l'ensemble de la plante. Ce phénomène suggère l'implication d'une molécule signal permettant d'induire l'inactivation d'un gène à distance des tissus initialement affectés. Des expériences de greffes entre une plante ayant subi l'interférence ARN et une plante sauvage ont mis en évidence la transmission du phénomène d'extinction génique avec 100% d'efficacité et de façon unidirectionnelle de la plante transgénique vers la plante sauvage. Ce résultat démontre clairement qu'une molécule signal est capable de migrer sur de longues distances à travers le système vasculaire de la plante et d'induire *de novo* un mécanisme

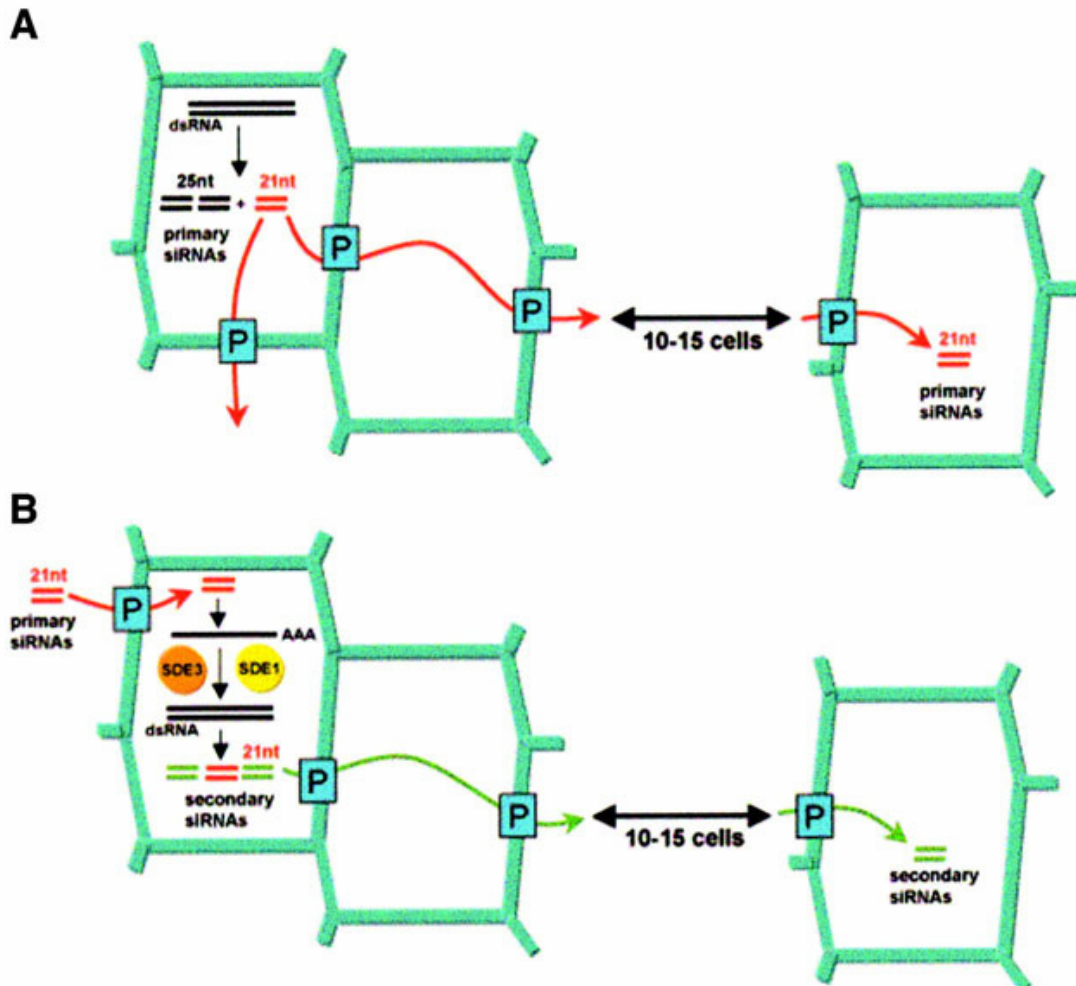


Fig. 48 : Représentation schématique de la mobilité du signal de cellule à cellule.

A. La migration des siRNA primaires de 21-22nt déclenche, en l'absence d'amplification, l'extinction génique d'un nombre constant de 10 à 15 cellules autour de la zone inoculée.

B. La migration extensive de cellule à cellule nécessite la synthèse *de novo* de dsRNA par l'action de SDE1/SGS2 (RdRP) et de SDE3 (hélicase) utilisant l'ARNm comme matrice. Ces enzymes, induites par les siRNA primaires de 21-22nt, sont à l'origine de siRNA secondaires de 21-22 nt migrant dans un rayon constant de 10 à 15 cellules.

P : plasmodesme.

D'après Himber et al., 2003.

d'extinction génique d'un gène homologue dans des tissus non-affectés. La transmission de ce signal nécessitant la présence d'un transgène transcriptionnellement actif, cette molécule serait donc de nature ARN.

Les siRNA constituent deux classes d'oligonucléotides de tailles distinctes (21-22nt et 24-26nt) qui seraient produits par deux enzymes Dicer différentes (Hamilton et al., 2002 ; Tang et al., 2003). Ces deux classes de siRNA seraient à la base de deux processus de migration du signal, à faible et à longue distances (Himber et al., 2003). Les siRNA primaires de 21-22nt migreraient au travers des plasmodesmes à une distance constante de 10 à 15 cellules adjacentes à la zone initiatrice d'extinction génique et seraient responsables de la formation des spots chlorotiques observés lors des premiers stades d'interférence ARN. Ces siRNA peuvent alors initier dans les cellules atteintes la synthèse de siRNA secondaires de même taille à l'aide d'activités RdRP (SDE1/SGS2) et hélicase (SDE3) en utilisant des transcrits homologues comme matrice. De la même façon que les siRNA primaires, les siRNA secondaires ont une action sur un rayon de 10 à 15 cellules avoisinantes dans lesquelles le processus médié par SDE1/SGS2 et SDE3 est également activé. Cette migration de cellule à cellule s'arrête lorsque le transcrit homologue aux siRNA est absent dans la cellule (Fig. 48). Le mécanisme faisant intervenir la RdRP et produisant des siRNA secondaires est qualifié de mécanisme de transitivité.

Alors que la migration de faible amplitude implique exclusivement les siRNA de 21-22nt, les siRNA de 24-26nt agiraient comme un signal d'extinction génique spécifique du phloème et seraient responsables d'une migration à longue distance. Ce signal systémique pourrait alors induire la synthèse *de novo* de siRNA de 21-22nt dans les cellules de vaisseaux de jeunes feuilles par un processus impliquant également les gènes *SDE1/SGS2* et *SDE3*. Une migration de cellule à cellule se mettrait alors en place indépendamment des siRNA de 24-26nt (Fig. 48).

En réponse au mécanisme d'interférence ARN, les virus, comme tout parasite, ont développé différentes stratégies leur permettant de contourner ce mécanisme de défense. En effet, les virus sont capables de produire des protéines inhibant l'effet de l'interférence ARN (Roth et al., 2004). Actuellement, des résultats contradictoires ont été obtenus sur le mode d'action de ces suppresseurs de signal.

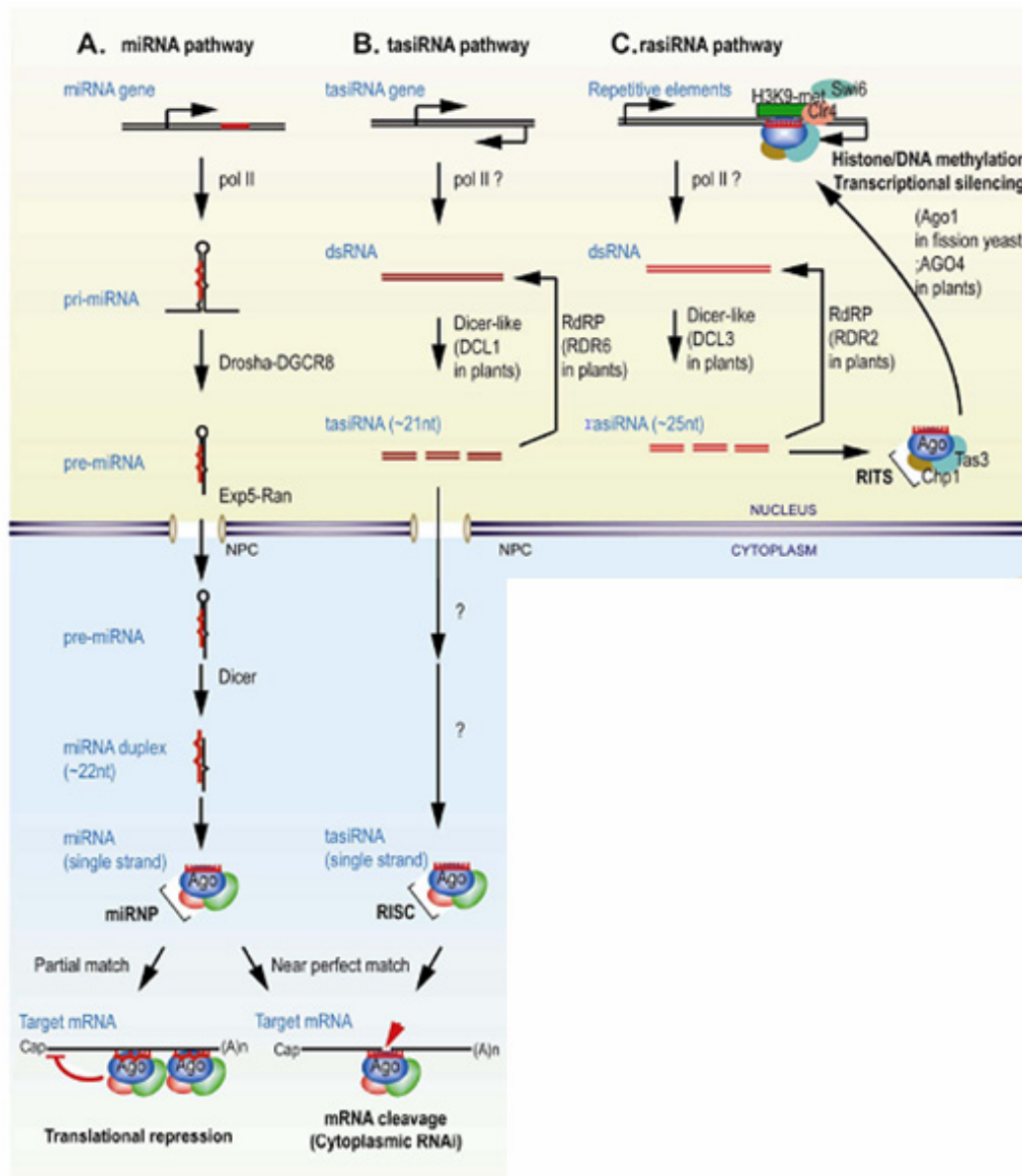


Fig. 49 : Mécanismes impliquant des ARN de petite taille autres que les siRNA.

A. Les miRNA.

B. Les tasiRNA

C. Les rasiRNA

D'après Kim, 2005.

B. Autres ARN de petite taille possédant une fonction naturelle

(voir pour revue Kim et al., 2005)

1. Les miRNA

L'étude de ce type d'ARN a été initiée avec la découverte du produit du gène *lin-4* qui est, non pas une protéine, mais un ARN non-codant de 22nt responsable de la diminution de l'expression de la protéine LIN-14 se déclenchant dans les premiers stades de développement larvaire chez *C. elegans*. Pendant plusieurs années, ce gène a été l'unique exemple d'ARN non-codant endogène de 22nt, appelé microRNA ou miRNA, intervenant dans le développement. Actuellement, les miRNA ont été retrouvés en multiples copies dans de nombreux organismes tels que *C. elegans*, *D. melanogaster*, *D. rerio*, *A. thaliana*, *M. musculus* ou *H. sapiens* (d'après la banque de donnée de miRNA disponible sur le site <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/>). Ce répertoire est régulièrement incrémenté du fait des résultats obtenus suite au séquençage du génome de nombreux organismes.

Les gènes de miRNA sont transcrits par la RNA polymérase II pour former des transcrits primaires, appelés pri-miRNA, qui sont clivés à l'intérieur du noyau pour former un ARN en épingle à cheveu appelé pré-miRNA d'une taille d'environ 70nt. Ce clivage est effectué par une enzyme de type RNase III, homologue à Dicer, appelée Drosha. Cette enzyme forme un complexe avec une protéine d'interaction aux dsRNA essentielle à la maturation des miRNA. Les pré-miRNA sont ensuite transportés dans le cytoplasme grâce à une exportine où ils subissent une seconde digestion par l'enzyme Dicer. Les molécules produites sont des miRNA de 22nt dont l'un des brins est dégradé et l'autre se maintient pour former le miRNA mature simple brin qui sera incorporé dans un complexe miRNP/RISC composé d'hélicases ainsi que du facteur d'initiation de traduction eIF2C2 appartenant à la famille des protéines Argonaute (Fig. 49A ; Hutvagner et Zamore, 2002). Ce mécanisme ne requiert pas la RdRP.

Chez les animaux, les miRNA sont partiellement homologues à leur ARN cible et bloquent la traduction en s'appariant à leur partie 3' non traduite (Hutvagner et Zamore, 2002). De plus, un miRNA est capable d'interagir avec plusieurs ARNm distincts et, inversement, plusieurs miRNA différents peuvent contrôler conjointement la stabilité d'un ARN unique. Ainsi, les

miRNA et leurs cibles semblent constituer un réseau complexe de régulation dans le règne animal. Toutefois, chez les plantes, les miRNA, présentant une plus forte homologie avec leur ARN cible, induisent leur dégradation via un mécanisme apparenté à celui médié par les siRNA (Tang et al., 2003). De la même façon, des siRNA partiellement homologues à leurs cibles sont également capables d'induire de manière séquence-spécifique un blocage de la traduction (Doench et al., 2003). Ce résultat montre que, suivant l'homologie qu'elles présentent avec leur ARN cible, ces deux types de molécules, siRNA et miRNA, sont fonctionnellement interchangeables.

2. Les tasiRNA

Les données concernant ce type d'ARN de petite taille ne sont que très préliminaires. Les tasiRNA (Trans-acting siRNA) sont issus de la transcription d'un gène et agissent en *trans* sur un ARNm endogène distinct. Un type de tasiRNA a récemment été mis en évidence à partir d'un intron d'un gène non-codant chez *Arabidopsis* (Vazquez et al., 2004). La biogenèse de ce type d'ARN dépend de gènes appartenant à plusieurs types de mécanismes d'interférence ARN : AGO1, DCL1 (requis pour la voie des miRNA) et RDR6 (requis pour la voie des siRNA). La fonction des gènes ciblés par les tasiRNA n'a pas encore été identifiée. Le mécanisme engendré par ce type de molécule est montré Fig. 49B.

3. Les rasiRNA (heterochromatin RNA) (voir pour revue Almeida et Allshire, 2005)

L'interférence ARN est également liée à un mécanisme naturel de défense contre la mobilité des éléments transposables. Les rasiRNA (Repeat Associated siRNA) proviennent de dsRNA de longue taille et sont homologues à des séquences d'éléments répétés ou éléments transposables. Leur fonction est liée à la formation de l'hétérochromatine au niveau des éléments répétés entraînant une extinction génique au niveau transcriptionnel de type TGS (Transcriptional Gene Silencing). Les rasiRNA sont retrouvés dans un grand nombre d'organismes comme *S. pombe*, *Trypanosoma brucei*, la drosophile ou les plantes.

Les chromosomes d'organismes eucaryotes sont caractérisés par la présence de régions décondensées et transcriptionnellement actives constituant l'euchromatine. Cette dernière est en opposition avec l'hétérochromatine qui est caractérisée par des régions peu transcrites

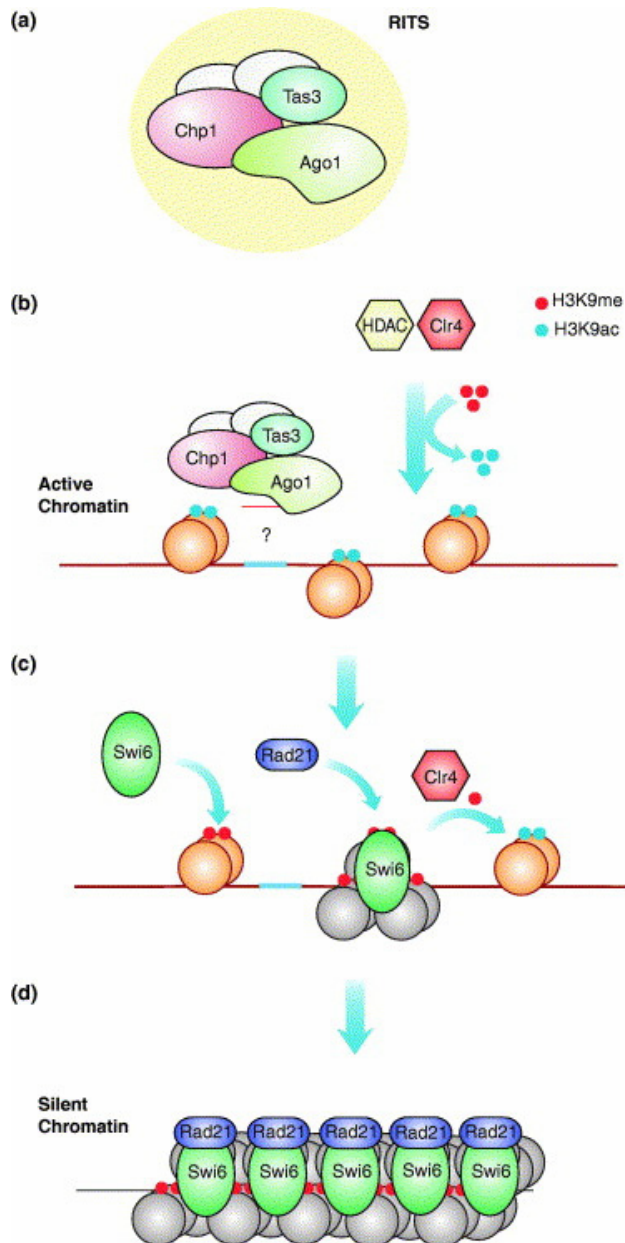


Fig. 50 : Formation de l'hétérochromatine médiée par les rasiRNA chez la levure *S. pombe*.

a. Composition du complexe RITS.

b. Le RITS attire la méthyltransférase Clr4 et une histone déacétylase (HDAC) sur des H3K9 méthylées et déacétylées de l'ADN cible (ligne bleue). H3K9me : Lysine 9 d'histone H3 méthylée ; H3H9ac : Lysine 9 d'histone H3 acétylée.

c. Les nucléosomes portant une méthylation sur les H3K9 interagissent avec Swi6 qui recrute les protéines de l'hétérochromatine, comme la cohésine Rad21, et permet l'extension de la région hétérochromatique en amont et en aval.

d. Cette région de chromatine condensée et riche en protéines Swi6 et Rad21 est alors transcriptionnellement inactive.

D'après Almeida et Allshire, 2005.

présentant une faible quantité de gènes exprimés et une forte densité de transposons. Le mécanisme de formation de l'hétérochromatine à partir des rasiRNA est mieux compris chez la levure *S. pombe*. Dans cet organisme, la région centrale du centromère est flanquée de larges régions en répétitions inversées contenant des éléments transposables inactifs organisés en tandem. Les mutants des gènes *AGO1*, *DCR1* et *RDPI* (codant pour une RdRP chez *S. pombe*) présentent des anomalies de ségrégation de chromosomes pendant la mitose et la méiose (Hall et al., 2003). Dans ces mutants, l'inhibition des éléments transposables est levée parallèlement à la perte du caractère hétérochromatique dans ces régions centromériques (Volpe et al., 2002) : la méthylation sur la lysine 9 des histones H3 (H3K9) ainsi que l'association de la chromatine à la protéine SWI6 (protéine de liaison à la chromatine) sont réduites. Dans la cellule sauvage, ces régions hétérochromatiques sont faiblement transcrites uniquement sur un brin. Ainsi, ce transcrit, produit en faible quantité, serait amplifié par la RdRP pour former des dsRNA. L'enzyme Dicer interviendrait alors pour cliver les dsRNA en rasiRNA qui seraient également amplifiés par la RdRP. Les rasiRNA seraient ensuite pris en charge par la protéine AGO1 qui interagit avec un complexe multiprotéique nommé RITS (RNA-induced Initiation of Transcriptional Silencing). Ce complexe utiliserait ainsi les rasiRNA pour interagir avec les régions hétérochromatiques homologues et initier l'inhibition des éléments transposables (Fig. 49C). Ce processus nécessite l'action de la méthyltransférase Clr4 et d'une HDAC (Histone DéACétylase) encore inconnue. La méthylation des histones H3 sur la lysine 9 forme alors un site d'interaction à la protéine SWI6, à l'origine de la condensation de la chromatine, qui favorise l'élargissement de la région hétérochromatique en recrutant la cohésine Rad21 (Fig. 50).

Chez les plantes, les rasiRNA induisent également une méthylation des H3K9 ainsi que de l'ADN (sur les cytosines) entraînant notamment une inhibition de la mobilité des éléments transposables. La fonction des protéines DCL3, RDR2, AGO4 et SDE4 est nécessaire à ce mécanisme.

4. Les scnRNA (voir pour revue Mochizuki et Gorovsky, 2004)

La plupart des protozoaires ciliés, comme *Tetrahymena thermophila*, sont caractérisés par un dichroïsme nucléaire. Chaque cellule de *Tetrahymena* contient un macronoyau (Mac) et un micronoyau (Mic). Le Mac est polyploïde et transcriptionnellement actif alors que le Mic est diploïde et transcriptionnellement inerte dans les cellules végétatives. Pendant la conjugaison,

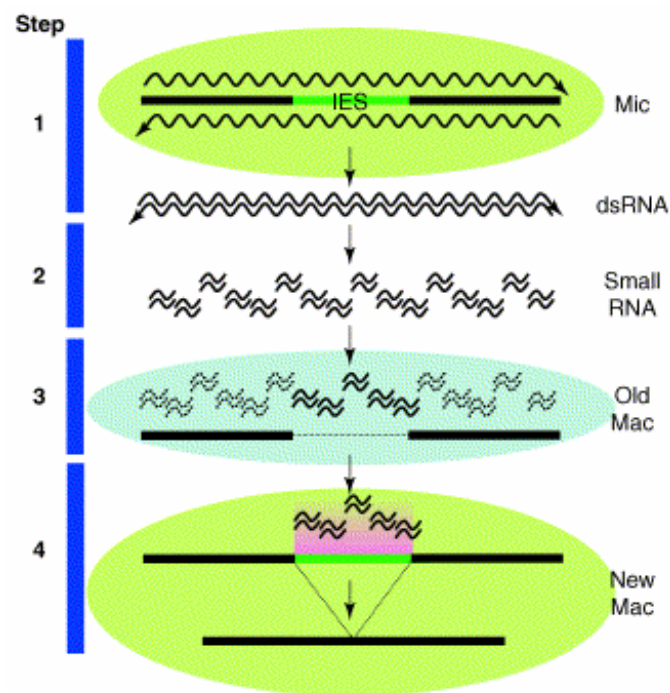


Fig. 51 : Rôle des scnRNA dans l'élimination des IES chez *Tetrahymena*.
 Mic : Micronoyau ; Mac : Macronoyau.

D'après Mochizuki et Gorovsky, 2004.

le Mic effectue une méiose pour former deux pronoyaux haploïdes dont un est échangé avec l'autre cellule conjugante. Les pronoyaux "migrateur" et "stationnaire" fusionnent alors créant un noyau zygotique qui se divise pour produire les nouveaux Mic et Mac. Suite à la formation du nouveau Mac, l'ancien Mac est résorbé. Pendant son développement, le nouveau Mac subit de nombreux réarrangements entraînant une élimination d'environ 15% du génome micronucléaire. Deux types de séquences sont éliminées. Les séquences BES (Breakage-Eliminated Sequence) se composent de régions relativement courtes (< 50 pb) flanquées de régions conservées de 15 pb permettant la coupure du chromosome. Des séquences télomériques sont alors ajoutées au niveau de ces coupures. L'élimination du deuxième type de séquence, appelé IES (Internal-Eliminated Sequence) et dont la taille varie de 0,5 à 20 kb, est suivie d'une "reliation" des séquences destinées au Mac (MDS).

Pendant plusieurs années, le mécanisme d'élimination d'ADN au cours de la différenciation du nouveau Mac est resté énigmatique. Le rôle de l'interférence ARN dans ce mécanisme a récemment été mis en évidence. Pendant la conjugaison, le génome micronucléaire est transcrit sur les deux brins permettant la formation de dsRNA qui sont alors digérés par un processus similaire à l'interférence ARN pour former des scanRNA ou scnRNA d'une taille d'environ 28nt (étape 1 Fig. 51). Les dsRNA ou leurs produits de digestion seraient alors transférés en association avec une protéine à chromodomaines, appelée Pdd1p, dans le cytoplasme (étape 2 Fig. 51) puis dans le Mac parental où ils s'accumulent pendant les stades précoces de la conjugaison. Les scnRNA s'associent ensuite aux séquences homologues de l'ancien Mac qui sont dégradées (étape 3 Fig. 51). Ainsi, seuls les scnRNA homologues aux séquences spécifiques du Mic subsistent et sont transférés dans le nouveau Mac où ils ciblent spécifiquement les IES et BES afin de les éliminer (étape 4 Fig. 51). Lors de cette dernière étape, les scnRNA s'associent avec les protéines à chromodomaines Pdd1p et Pdd3p ainsi qu'avec une protéine de la famille Argonaute possédant les domaines PAZ et PIWI, nommée Twi1p. Cette dernière est essentielle à l'accumulation des scnRNA pendant la conjugaison ainsi qu'à l'élimination des IES et BES. D'autre part, un "knock-out" des gènes *PDD1* et *TWII* provoque une altération de la méthylation H3K9 au niveau des IES qui est également une caractéristique de l'hétérochromatine chez *Tetrahymena*. L'élimination des IES est également affectée lors d'une mutation de la lysine 9 en glutamine dans les histones H3 en dépit d'une accumulation normale des scnRNA. Ainsi la méthylation H3K9 est essentielle à l'élimination des IES. Mochizuki et Gorovsky (2004) ont proposé que lors de leur entrée dans le nouveau Mac, les scnRNA s'associent avec Twi1p et reconnaissent de façon séquence-spécifique les

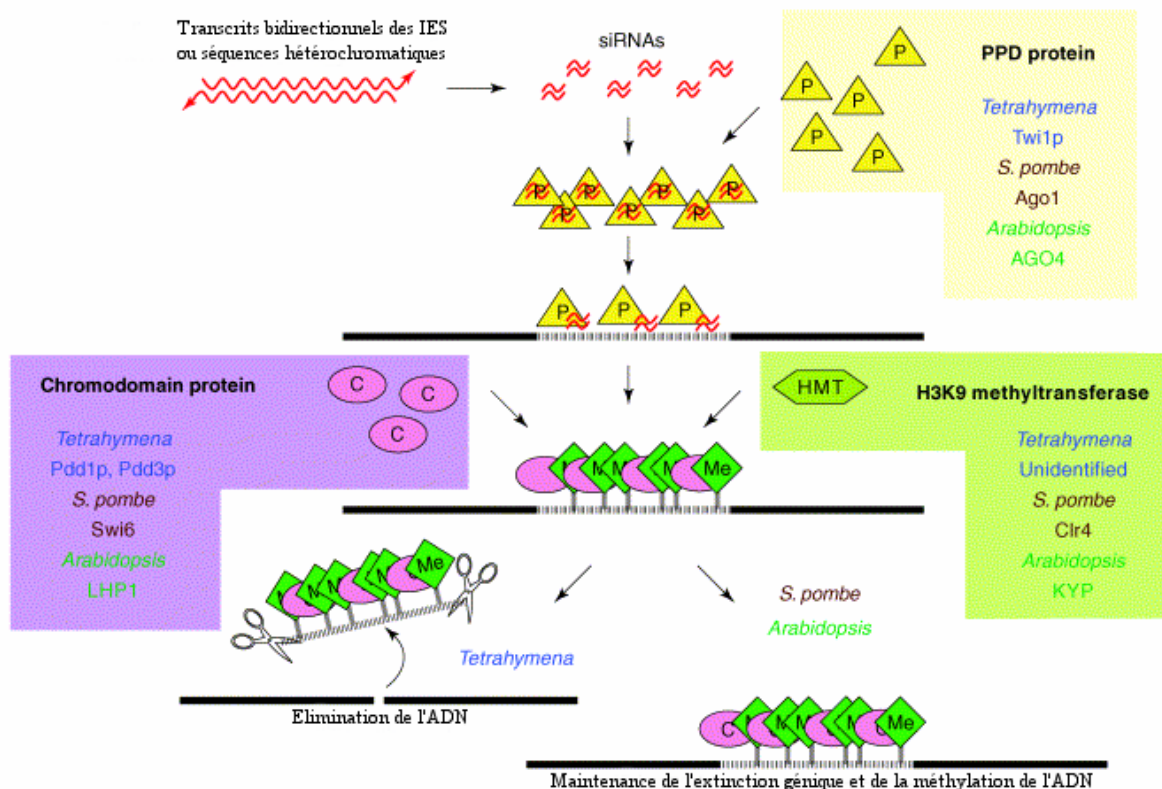


Fig. 52 : Comparaison entre les réarrangements du génome chez *T. thermophila* et la formation de l'hétérochromatine chez *S. pombe* et *A. thaliana*.

Les lignes en pointillé représentent les IES ou les séquences hétérochromatiques. Les lignes pleines représentent les MDS ou séquences non-hétérochromatiques. Les lignes rouges courbées représentent l'ARN.

D'après Mochizuki et Gorovsky, 2004.

IES. Les protéines à chromodomaines Pdd1p et Pdd3p ainsi que des méthyltransférases spécifiques des H3K9 seraient alors activées et permettraient la formation de l'hétérochromatine dans ces régions. Ce mécanisme semble apparenté au processus d'hétérochromatinisation médié par les rasiRNA chez *S. pombe* et *A. thaliana*. Cependant, chez les ciliés, les structures présentant une conformation d'hétérochromatine sont éliminées alors que chez *S. pombe* et *A. thaliana* elles sont maintenues sous une forme transcriptionnellement inactive (Fig. 52).

Le génome de *Tetrahymena* code pour trois protéines apparentées à Dicer (Dcr1p, Dcr2p et Dcl1p). Mochizuki et Gorovsky (2005) ont montré que la protéine Dcl1p est nécessaire à l'élimination des IES. Elle est requise pour l'accumulation de scnRNA, la digestion des transcrits de longue taille du génome micronucléaire ainsi que pour la méthylation des H3K9. Cette protéine aurait également un rôle dans la ségrégation des chromosomes micronucléaires lors des divisions mitotiques et méiotiques.

Nous savons par ailleurs que l'injection de dsRNA homologues à des MDS induit l'élimination de ces séquences pendant la conjugaison. Ce résultat confirme donc l'existence d'un mécanisme apparenté à l'interférence ARN entraînant une élimination d'ADN chez *Tetrahymena*. De la même façon, un transgène d'origine bactérienne inséré dans le génome de *Tetrahymena* est éliminé lors de la conjugaison. Ainsi, un mécanisme de surveillance du génome contre l'invasion de séquences étrangères, comme des transposons, est opérationnel chez *Tetrahymena*. Ces résultats ont récemment été confirmés par Liu et al. (2005). Ces auteurs ont montré que l'élimination des séquences étrangères se ferait par un mécanisme similaire à l'élimination des IES endogènes et que son efficacité augmente avec le nombre de copies de transgènes insérés dans le génome.

Chez la paramécie, la transformation du Mac avec une forte quantité de transgènes homologues à un gène endogène entraîne la délétion de ce gène à la suite d'une autogamie (remplacement du Mac à partir du Mic dans une cellule unique). Une délétion séquence-spécifique est également observée dans des cellules ayant subi une autogamie à la suite de l'ingestion de bactéries produisant des dsRNA homologues à un gène endogène (Garnier et al., 2004). Ce phénomène est corrélé à l'accumulation d'ARN de 22 à 23nt se distinguant des scnRNA de *Tetrahymena* non-seulement par leur taille mais aussi par le fait qu'ils ne sont pas régulés au cours du développement. Ces ARN sont produits par le transgène macronucléaire

dans la cellule végétative et leur quantité ainsi que leur mobilité ne varient pas pendant l'autogamie. Les ARN de 22 à 23nt cibleraient la dégradation d'un ARNm homologue avant la méiose et seraient à l'origine du mécanisme d'interaction ARN-ARN. Lors du développement du Mac chez la paramécie, les scnRNA homologues aux séquences macronucléaires s'associeraient aux transcrits du Mac parental, plutôt qu'à l'ADN, empêchant leur transfert dans le nouveau Mac. Les ARN de 22 à 23nt produits par le transgène dégraderaient alors les transcrits du Mac permettant aux scnRNA homologues de cibler les délétions de façon séquence-spécifique dans le nouveau Mac.

IV. L'interférence ARN : un outil d'analyse fonctionnelle applicable à un grand nombre d'organismes

L'interférence ARN par transfection de dsRNA, de siRNA ou de vecteurs permettant l'expression de ces molécules inductrices est une approche simple et efficace d'analyse fonctionnelle de gènes. Son utilisation a suscité un grand intérêt chez de nombreux organismes. Elle a été appliquée avec succès chez *Trypanosoma* (Ngô et al., 1998 ; Bastin et al., 2001), *Plasmodium* (Malhotra et al., 2002), *Toxoplasma* (Al-Anouti et al., 2003), la drosophile (Kernnerdell et Carthew, 1998), le xénope (Nakano et al., 2000), la souris (Calegari et al., 2002) et l'homme (Chiu et Rana, 2002). Une longueur minimale des dsRNA (150 pb) est nécessaire et suffisante pour induire l'interférence ARN chez *Trypanosoma* et la drosophile (Ngô et al., 1998 ; Tuschl et al., 1999). Tuschl et al. (1999) ont montré que l'utilisation d'ARN simples brins sens ou antisens chez la drosophile n'a pas ou peu d'effet sur la dégradation de l'ARNm homologue.

Chez *C. elegans*, le RNAi peut également être induit en nourrissant le nématode à l'aide de bactéries produisant des dsRNA (technique dite de "feeding" ; Timmons et Fire, 1998) ou plus simplement en les baignant dans une solution de dsRNA (technique dite de "soaking" ; Tabara et al., 1998). Par la suite, la méthode de feeding a été optimisée chez *C. elegans* (Kamath et al., 2000 ; Timmons et al., 2001). L'interférence ARN est désormais un outil particulièrement performant chez les organismes où les mécanismes de recombinaisons homologues ne sont pas encore totalement maîtrisés.

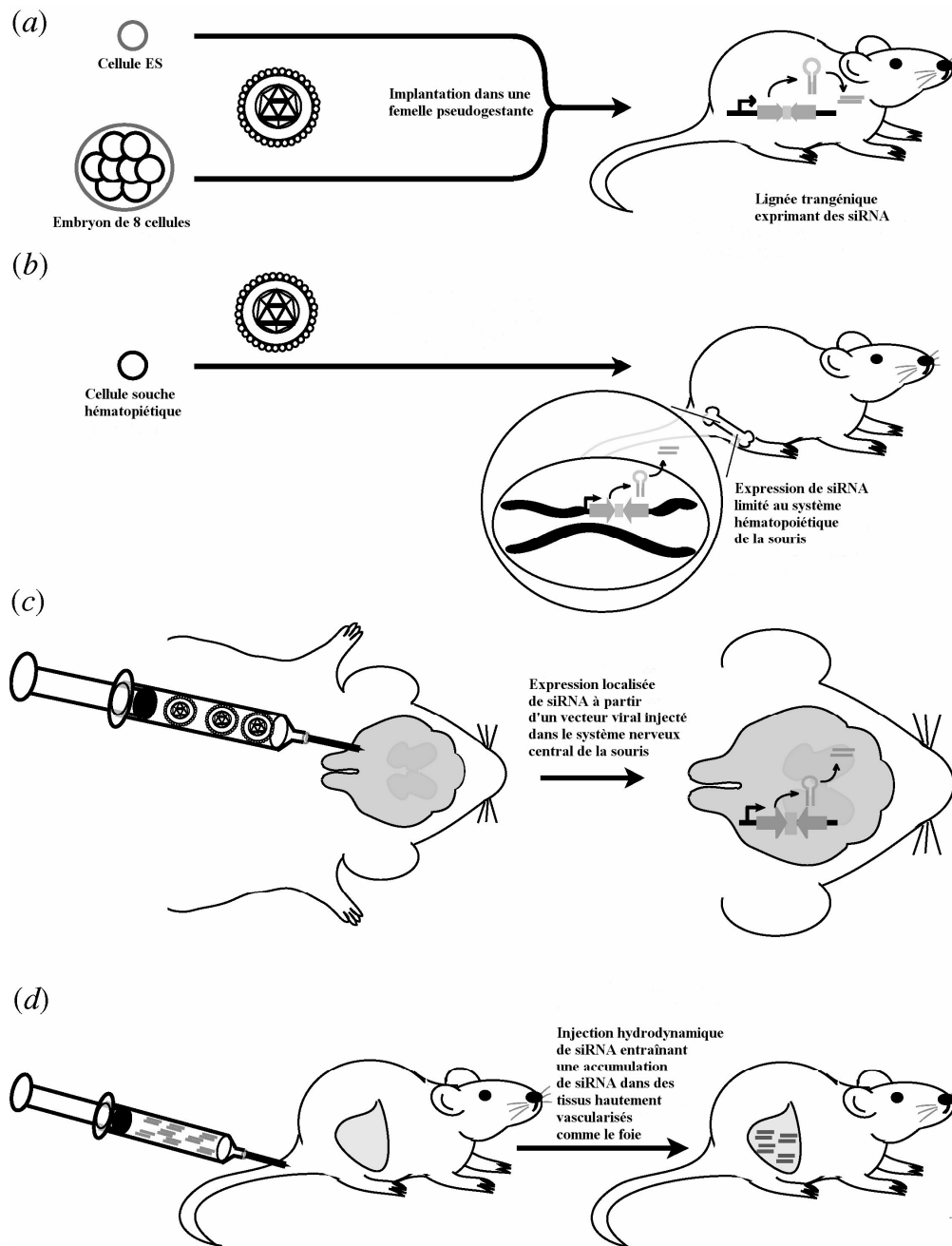


Fig. 53 : Stratégies de RNAi in vivo.

D'après Dykxhoorn et Lieberman, 2005.

V. Applications technologiques du processus d'interférence ARN

A. Un outil thérapeutique (voir pour revue Dykxhoorn et Lieberman, 2005)

Actuellement, quatre stratégies sont utilisées afin de déclencher le processus d'interférence ARN *in vivo* chez la souris (Fig. 53) : (1) la réimplantation dans des souris femelles pseudogestantes de cellules souches embryonnaires ou d'embryons transfectés par des siRNA, (2) la reconstitution du système hématopoïétique de la souris avec des cellules souches exprimant des siRNA, (3) l'injection dans le système nerveux central de la souris de constructions virales exprimant des siRNA sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique, entraînant alors une extinction localisée de gènes, (4) l'injection intraveineuse à forte pression pendant un temps court (injection hydrodynamique) de siRNA. L'utilisation de cette dernière méthode comme outil thérapeutique a notamment permis d'inactiver des séquences du virus de l'hépatite C dans des expériences *in vivo* chez la souris. Bien que la méthode de transfection chez l'homme reste encore problématique, ces résultats sont très encourageants en terme d'utilisation des siRNA comme outil thérapeutique contre diverses maladies humaines.

B. Une méthode d'analyse fonctionnelle à l'échelle du génome

Les projets de séquençages d'organismes variés ont permis d'identifier de nombreux gènes dont la fonction est encore inconnue. L'interférence ARN apparaît comme un outil essentiel pour l'analyse de la fonction de gènes à l'échelle des génomes. Ainsi les fonctions de gènes sur les chromosomes I et III et, plus récemment, sur l'ensemble des gènes du génome de *C. elegans* ont pu être criblées par interférence ARN à l'aide d'une banque de clones bactériens produisant des dsRNA réutilisables, facilitant ainsi l'analyse systématique en particulier lors d'homologies entre séquences (Fraser et al., 2000 ; Gonczy et al., 2000 ; Kamath et al., 2003). L'analyse sur l'ensemble du génome a permis d'inhiber la fonction d'environ 86% des gènes chez *C. elegans* et ainsi d'identifier de nombreux gènes impliqués dans le développement embryonnaire mais aussi dans la morphologie, la mobilité ou la fertilité du nématode. En raison de son faible coût et de sa grande efficacité, l'interférence ARN apparaît désormais comme une méthode de choix pour le criblage systématique de la fonction de gènes à l'échelle du génome.

VI. L'interférence ARN chez les protozoaires parasites (voir pour revue Ullu et al., 2004)

Parmi les protozoaires parasites, *Trypanosoma brucei* est le modèle où le mécanisme d'interférence ARN est le plus étudié (Bastin et al., 2001). Dans cet organisme, le processus d'extinction génique peut être induit de différentes façons :

- de manière transitoire suite à la transfection de dsRNA ou de constructions contenant un fragment de gène entre deux promoteurs T7 en orientation inverse.
- par l'intégration stable dans le génome de vecteurs exprimant des gènes sous le contrôle de promoteurs contenant l'opérateur TetO qui possède une forte affinité pour le suppresseur de la tétracycline (TetR). Ces vecteurs sont transformés dans une souche de *Trypanosoma* exprimant TetR ainsi que la T7 polymérase. L'expression des gènes d'intérêt, bloquée lors de l'interaction entre TetO et TetR, est induite lors de l'introduction dans la cellule de tétracycline qui se lie alors à TetR et lève l'inhibition de transcription. Dans ces expériences, les gènes sont soit insérés en IR sous le contrôle du promoteur PARP soit flanqués de deux promoteurs T7 en orientation inverse permettant, dans les deux cas, la production de dsRNA.

Bien qu'aucun gène homologue à Dicer n'ait été caractérisé dans le génome de *T. brucei*, une activité enzymatique apparentée existe dans cet organisme permettant de dégrader les dsRNA en siRNA. Dix à vingt pour cent des siRNA co-sédimentent avec des polyribosomes ainsi qu'avec des complexes 80S correspondant à des monosomes en cours de traduction. Une dissection biochimique de ces assemblages protéiques a permis d'identifier un complexe protéique associé aux siRNA. Ce complexe contient la protéine AGO1 qui a récemment été caractérisée chez *Trypanosoma* (Shi et al., 2004). Le "knock-out" de cette protéine, dont la fonction est essentielle dans le processus d'interférence ARN chez *T. brucei*, empêche l'accumulation des siRNA homologues à des rétrotransposons corrélable à une augmentation de la transcription de ces éléments transposables. Ces derniers étant généralement associés aux régions hétérochromatiques du génome (voir paragraphe III. B. 3. Les rasiRNA), la machinerie d'interférence ARN aurait un rôle dans le remodelage de la chromatine chez *T. brucei*. Durand-Dubief et Bastin (2003) ont également détecté des anomalies dans la formation des fuseaux mitotiques et la ségrégation des chromosomes lors de la division dans

les cellules *ago1^{-/-}*, en accord avec les phénotypes obtenus suite à la mutation du gène *AGO1* chez la levure *S. pombe* (Hall et al., 2003).

L'induction du phénomène d'interférence ARN a pu être réalisée chez *Toxoplasma gondii* suite à l'introduction à l'état épisomique d'un vecteur contenant le gène cible flanqué de deux promoteurs de l'antigène de surface 1 (*SAG1*) en orientation inverse ou directement de dsRNA (Al-Anouti et al., 2003). Une diminution de l'ARN ciblé a été constatée mais n'a pas pu être corrélée à la production de siRNA. Des gènes putatifs homologues à *AGO*, *Dicer* et *RdRP* ont été caractérisés dans le génome de cet organisme suggérant l'existence du mécanisme d'interférence ARN chez *Toxoplasma*.

Une étude a mis en évidence le fonctionnement d'un mécanisme apparenté à l'interférence ARN chez *Plasmodium* suite à l'injection de dsRNA homologues à un gène cible (Malhotra et al., 2002). La production d'ARN de taille identique aux siRNA (25nt) et homologues au gène ciblé a également été montrée. Cependant, l'étude du génome de cet organisme n'a actuellement permis d'identifier aucun gène (ou protéine) susceptible d'intervenir dans le mécanisme d'interférence ARN.

Des ARN de 20 à 30nt sens et antisens homologues à des rétroposons ont été détectés chez *Giardia intestinalis*. Dans cet organisme, un mécanisme d'interférence ARN, nécessitant une activité RdRP, serait également impliqué dans l'expression des protéines de surface VSPS (Variant-Specific Surface Protein). Un gène apparenté à la famille *AGO* a également été caractérisé dans son génome.

En définitive, l'existence du mécanisme d'interférence ARN et sa mise en œuvre n'ont été démontrées que chez un nombre restreint de protozoaires parasites. L'utilisation de stratégies classiques (transfections transitoires ou stables de vecteurs exprimant un dsRNA ou directement de siRNA) pour induire l'interférence ARN n'a aucun effet chez *Leishmania*. Cet organisme serait naturellement dépourvu de ce mécanisme, tout comme la levure *S. cerevisiae* où aucun gène potentiel d'interférence ARN n'a actuellement été identifié.

VII. *Paramecium* : un modèle tout disposé à l'étude de son génome via l'approche RNAi

La microinjection dans le Mac de la paramécie d'une forte quantité de plasmides contenant la séquence codante d'un gène génère un phénotype correspondant au mutant du gène d'intérêt corrélé à une forte diminution de son taux de transcrits et de protéines dans la cellule (Ruiz et al., 1998). Un minimum de 20 copies du transgène par génome haploïde est nécessaire pour induire un tel phénomène d'extinction génique dépendant de l'homologie de séquences. Ce processus a été observé avec des gènes impliqués dans l'exocytose des trichocystes (*ND7* et famille multigénique des *TMP*) ou dans la morphogenèse (centrines *ICL1a* et *ICL1b*). L'expression des gènes homologues à l'ADN introduit est fortement diminuée. L'analyse des ARN a également montré la présence d'ARN de taille aberrante qui s'hybrident avec des sondes spécifiques du gène d'intérêt ou du plasmide. Ces ARN aberrants proviendraient donc de l'ADN plasmidique microinjecté. A partir d'expériences de run-on, Galvani et Sperling (2001) ont montré un effet au niveau post-transcriptionnel. Dans ce travail, des expériences de Northern blot démontrent que les ARN de taille aberrante sont issus de la transcription des deux brins du transgène. Par ailleurs, la présence de la séquence régulatrice 3' non-codante dans la construction transgénique empêche l'inactivation du gène d'intérêt. Dans ces conditions, le transgène est capable de produire des ARN aberrants sens et antisens. Selon les auteurs, les signaux de régulations présents dans les séquences 3' non-codantes sont responsables de la séquestration des ARN aberrants dans une voie distincte de celle de l'interférence ARN. La technique de microinjection est couramment utilisée pour l'étude de la fonction d'une multitude de gènes chez la paramécie (Ruiz et al., 1999 ; Garreau de Loubresse et al., 2001 ; Beisson et al., 2001 ; Krzywicka et al., 2001). L'analogie de ce phénomène d'extinction génique dépendant de l'homologie de séquence avec l'interférence ARN a été confirmée par les travaux de Garnier et al. (2004) mettant en évidence, dans la cellule végétative, des ARN de 22 à 23 pb homologues au gène ciblé suite à l'injection d'une forte quantité de transgène dans le Mac. Les auteurs ont également confirmé que la séquence régulatrice 3' non-codante a un effet inhibiteur sur l'induction du mécanisme. L'injection de dsRNA dans le Mac provoque également une interférence génétique qui est transitoire et disparaît 48 h après injection (Galvani et Sperling, 2002). Cet effet transitoire pourrait être dû à la dilution des molécules de dsRNA injectées au cours des divisions.

La paramécie étant un protozoaire cilié bactérivore cultivé en présence de *Klebsiella pneumoniae*, la méthode de feeding préalablement établie et optimisée chez le nématode *C. elegans* a pu être adaptée à cet organisme (Galvani et Sperling, 2002). Cette méthode a été mise au point au moyen du vecteur L4440 présentant un double promoteur T7 en orientation inversée, responsable de la formation des dsRNA (Timmons et Fire, 1998), ainsi que de la souche d'*E. coli* HT115(DE3) présentant un gène de T7 polymérase inducible par l'IPTG et une mutation dans le gène de la RNase III de façon à empêcher la dégradation des dsRNA (Timmons et al., 2001). Suite à l'ingestion de bactéries HT115(DE3) produisant des dsRNA, les phénotypes obtenus sont identiques à ceux générés par microinjection. L'introduction d'un plasmide produisant un ARN simple brin sens ou antisens dans les bactéries HT115(DE3) ne produit aucun phénotype montrant ainsi que les dsRNA sont les molécules inductrices. La fonction de nombreux gènes a été étudiée par cette méthode. C'est le cas de plusieurs gènes impliqués dans la sécrétion des trichocystes (TMP4a, ND7, NSF), des gènes de centrines (ICL1a) ou de certains gènes de tubulines (ϵ -tubuline) (Galvani et Sperling, 2002 ; Dupuis-Williams et al., 2002). La technique de feeding présente de nombreux avantages par rapport à la microinjection. Cette approche est beaucoup plus simple à mettre en œuvre dans la mesure où elle ne nécessite pas l'intervention d'un microinjecteur. Elle permet, en une seule expérience, d'éteindre rapidement la fonction d'un gène sur de nombreuses cellules avec un bon rendement (entre 60 et 80%), ce qui n'est pas envisageable dans le cas de la microinjection. Par ailleurs, les souches bactériennes contenant la séquence d'un gène d'intérêt peuvent être congelées à -80°C et ainsi constituer un stock de constructions inducibles réutilisables à volonté. La technique de feeding peut également être utilisée pour l'étude de la réversion d'un phénotype, lorsque les cellules induites sont repiquées sur un milieu contenant des *Klebsiella* non-transformées. De plus, il ne semble pas nécessaire d'utiliser de longs dsRNA recouvrant la totalité de la séquence codante pour obtenir une extinction génique par feeding, contrairement à la microinjection (Dupuis-Williams et al., 2002). Enfin, suite à l'ingestion de bactéries produisant des dsRNA, l'induction du phénotype est continue ce qui permet de s'affranchir des problèmes d'extinctions géniques transitoires observés dans certains cas de microinjections. Actuellement, la technique de feeding est utilisée en routine comme outil d'analyse des séquences annotées dans le génome macronucléaire de la paramécie. C'est cette technique que nous avons utilisée pour induire le RNAi des gènes codant pour les protéines (épiplasmines) étudiées dans ce travail. Les phénotypes (boomerangs ; voir chapitre résultats) se sont avérés totalement reproductibles et viables sur une période de 72 heures.

CHAPITRE II

RESULTATS

Nos résultats se déclinent en trois parties :

- un article accepté pour publication dans la revue PROTIST.
- un article que nous envisageons d'envoyer à cette même revue.
- Et des données beaucoup plus préliminaires présentées sous le même format que les deux parties précédentes dans un souci d'homogénéité de l'ensemble du manuscrit.

PARTIE I

The membrane skeleton in *Paramecium* : molecular characterization of a novel epiplasmin family and preliminary GFP expression results

Title : The membrane skeleton in *Paramecium* : molecular characterization of a novel epiplasmin family and preliminary GFP expression results

Authors : Sébastien Pomel,^{a,*} Marie Diogon,^a Philippe Bouchard, Lydie Pradel, Viviane Ravet, Gérard Coffe and Bernard Viguès*

ADDRESS : Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177, Aubière cedex, France

Running header title : *Paramecium* epiplasmins

* **Corresponding authors :** Bernard Viguès and Sébastien Pomel : Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177, Aubière cedex, France.

E-Mail addresses :

Bernard.Vigues@univ-bpclermont.fr

Sebastien.Pomel@univ-bpclermont.fr

Tel : (33)4-73-40-74-69; (33)4-73-40-51-39

^a : the two first authors contributed equally to the work.

Abstract

Previous attempts to identify the membrane skeleton of *Paramecium* cells have revealed a protein pattern at once complex and specific. The most prominent structural elements, epiplasmic scales, are centered around ciliary units and closely apposed to the cytoplasmic side of the inner alveolar membrane. We sought to characterize epiplasmic scale proteins (epiplasmins) at the molecular level. PCR approaches permitted cloning and sequencing of two closely related genes by amplifications of sequences from a macronuclear genomic library. Using these two genes (*EPI-1* and *EPI-2*) we have contributed to the annotation of *Paramecium tetraurelia* macronuclear genome and identified thirty-nine additional (paralogous) sequences. Two orthologous sequences were found in the *Tetrahymena thermophila* genome. Structural analysis of the 43 sequences indicates that the hallmark of this new multigenic family is a 79 a.a. domain flanked by two Q, P and V-rich stretches of sequence that are much more variable in amino-acid composition. Such features clearly distinguish members of the multigenic family from epiplasmic proteins previously sequenced in other ciliates. The expression of Green Fluorescent Protein (GFP)-tagged epiplasmin showed significant labelling of epiplasmic scales as well as oral structures. We expect that the GFP construct described herein will prove a useful tool for comparative sub-cellular localization of different putative epiplasmins in *Paramecium*.

Keywords : *Paramecium*, membrane skeleton, epiplasmins, multigene family, GFP, morphogenesis.

Introduction

A stabilizing network of plasma membrane-associated proteins has been described in the cortex of many eukaryotic cells. This network, termed the membrane skeleton, was initially characterized in erythrocytes. After these pioneering studies, proteins of the erythrocyte membrane skeleton have been found in a variety of non-erythrocytic cell types. Spectrins, a family of actin-binding proteins, were identified as the major protein components of the membrane skeleton, which comprises several additional proteins linking the spectrin/actin complex to the inner face of the plasma membrane. The growth in sequence information has resulted in the identification of key motifs in protein components of the spectrin-based network which indicate specific interactions and functions of particular interest in the comprehension of cortical dynamics and cell morphogenesis (Bennett and Baines, 2001).

However, a spectrin-based membrane skeletal system does not appear to be a general feature of protozoan cells. An alternative to this system is the epiplasmic membrane skeleton sustaining the membranous complex (cell membrane and underlying alveolar sacks) in ciliated protozoans. Available molecular data indicate that major epiplasmic proteins are structurally unrelated to spectrins and lack key motifs required for interaction with actin-based structures. Ciliate epiplasmic proteins include articulins, plateins and Epc1p characterized respectively in pseudomicrothoracidae, hypotrichs and tetrahymenidae (Bouchard et al. 2001; Huttenlauch et al. 1995; Huttenlauch et al. 1998a; Kloetzel et al. 2003; Williams et al. 2004). They also include a family of poorly-defined proteins, termed the epiplasmins, which are prominent epiplasmic components of *Paramecium*. Epiplasmins were previously identified by cell fractionation, protein biochemistry and immunological techniques (Coffe et al. 1996; Nahon et al. 1993). Strikingly, the data indicate an extremely complex family of antigenically related proteins, comprising up to forty polypeptides with apparent molecular masses ranging from 30 to 50 kDa and showing remarkable *in vitro* reassembly properties consistent with the membrane skeletal function ascribed to the epiplasm in *Paramecium* cells. Attempts at epiplasmin molecular characterization were initiated by direct internal peptide microsequencing and use of deduced DNA primers in PCR amplification experiments (Coffe et al. 1996). However, the data were inconclusive due to the shortness of available sequences. In this study, we have pursued the previous work and obtained, for the first time, the complete sequence of two *Paramecium* epiplasmins. To

elucidate the heterogeneity of epiplasmins indicated by immunological approaches, we also sought homologous genes within DNA supercontigs obtained from sequencing of the *P. tetraurelia* macronuclear genome. Forty-one paralogous genes were identified, establishing that *Paramecium* epiplasmins represent a new multigenic protein family. The results of preliminary attempts to transform *Paramecium* cells using Green Fluorescent Protein (GFP)-tagged epiplasmins are also reported.

```

EPI1 : ATGAGCAATATCCACAATCA-----TAAACAAGCACAACAAGCACCTTAAGCACCACAACCATATTATGGA CAACCCAGCTATGCCATAACCATATGGTGCCTCT : 99
EPI2 : ATGAGCAATATCCACAATCAATAACATCCACAACAAGCACAACAACCCACCTAAGCACCACAACCATATTATGGA CAACCCAGCTATGCCATAACCATATGGTGCCTCT : 108

EPI1 : CTTTCACCATTGAGATATTCTATGCTCCTCCCTGTCGTCCAATAGGTCGTTCCCTTAAACCTATGTACCTCAATAAGTGTTCCTTAAACCTATGTGCCTCAACAAGTT : 207
EPI2 : CTTTCACCATTGAGATATTCTATGCTCCTCCCTGTCGTCCAATAGGTCGTTCCCTTAAACCTATGTACCTCAATAAGTGTTCCTTAAACCTATGTGCCTCAACAAGTT : 216

EPI1 : GTTGCCCAACCAAGTCGTTGCTCAACCAAGTTGTTGCTCAATCTGTTGTTGCATAACCAACAATCAAAGGTGAGAGCAGAATCGAATATGTTCCATA CGAGAAAACCTGTG : 315
EPI2 : GTTGCCCAACCAAGTCGTTGCTCAACCAAGTTGTTGCTCAATCTGTTGTTGCATAACCAACAATCAAAGGTGAGAGCAGAATCGAATATGTTCCATA CGAGAAAACCTGTG : 324

EPI1 : CTTGAATATGAAGAAGTGAGATAAAGAATCTAAGTGCCAAGAGAGAAATATGTTTACCGATTATTACGCAGTTGAATATCAAACCGAATATGTAACCATAGTCTTCTAA : 423
EPI2 : CTTGAATATGAAGAAGTGAGATAAAGAATCTAAGTGCCAAGAGAGAAATATGTTTACCGATTATTACGCAGTTGAATATCAAACCGAATATGTAACCATAGTCTTCTAA : 432

EPI1 : GAAAAATTTACAGGtatgacatttlaaaaatttaaatccagAATAAGTCCAGTTGACAGATATCAAGAAAAGAGTTGATATTAACCCAGTCGAGAGATAAGTCTGTT : 531
EPI2 : GAAAAATTTACAGGtatgacatttlaaaaatttaaatccagAATAAGTCCAGTTGACAGATATCAAGAAAAGAGTTGATATTAACCCAGTCGAGAGATAAGTCTGTT : 540

EPI1 : ATCAACAAAGAGTCTAATAAGTTGTTGCCAACCAAGTCTAATAAGTTGTTCACTCAATCAGTCGTTCAACCAAGTCTAATAAGTCCATAACCAAGTCTAATAAGTCCCAAT : 639
EPI2 : ATCAACAAAGAGTCTAATAAGTTGTTGCCAACCAAGTCTAATAAGTTGTTCACTCAATCAGTCGTTCAACCAAGTCTAATAAGTCCATAACCAAGTCTAATAAGTCCCAAT : 648

EPI1 : AACCAAGTCCAATATCTTCAACCAACCAAGTCTAATAAGTCCCAACCAAGTCTCAATATGCCCCAGCTCCACTTTAAATAAACTTCCTATGTTCCCTGCTCCAGTTGCCAGTC : 747
EPI2 : AACCAAGTCCAATATCTTCAACCAACCAAGTCTAATAAGTCCCAACCAAGTCTCAATATGCCCCAGCTCCACTTTAAATAAACTTCCTATGTTCCCTGCTCCAGTTGCCAGTC : 756

EPI1 : TTCCATTAGCCTAGACTCAATACCAACCAAGAGAGTCCCAATAAGCTAGACCCCAATAACCAATAGACAGAACTAAGTataaacatcttaataaaacagGCTTAAA : 855
EPI2 : TTCCATTAGCCTAGACTCAATACCAACCAAGAGAGTCCCAATAAGCTAGACCCCAATAACCAATAGACAGAACTAAGTatgacatctatcttaataatcaaaagGCTTAAA : 864

EPI1 : ATCCAAGACCAAAACCAACAAGCACCCCAATAACCAACAATAGAAATAAAAAGAGCTTTTGAACAGACTCTTTGATAGAGATTGA : 938
EPI2 : ATCCAAGA-----CCAATAACCAAGCCCAATAACCAACAATAGAAATAAAAAGAGCTTTTGAACAGACTCTTTGATAGAGATTGA : 941

```

Figure 1. Sequence alignment of the *EPI-1* and *EPI-2* genomic sequences using the CLUSTALW (v. 1.8) and the GENEDOC (v. 2.6.02) programs. Black boxes represent identical nucleotides. The two intron sequences (29 and 24 bp) are represented in small red letters. The *Epipara* 7-6 sequence used to screen the indexed macronuclear bank is underlined. Positions of nucleotides are noted to the right of both sequences.

```

EPI1 : MSNIPOS--QQAQQPQPAPQPYQGQPSYAQPYGAPLSPLRYSYAPPVVQQVVPQTYVVPQQVVPQTYVVPQQVV : 70
EPI2 : MSNIPOSQHPQQAQQPQPAPQPYQGQPSYAQPYGAPLSPLRYSYAPPVVQQVVPQTYVVPQQVVPQTYVVPQQVV : 73

EPI1 : AQPVVAQPVVAQSVVAQPTTIKGE SRIE YVPYEKTVLE YEEVRQRIQVPREKYVTDYYAVE YQTEYVVPQVFOEK : 143
EPI2 : AQPVVAQPVVAQSVVAQPTTIKGE SRIE YVPYEKTVLE YEEVRQRIQVPREKFTVTDYYAVE YQTEYVVPQVFOEK : 146

EPI1 : FTEYVVPVD RYQERVEY YPVERQVVHQQVQVQVVAQPVQVQVTSVSVVQPVQYAPQVQYAPQVQYVQVQVQYAPQVQY : 216
EPI2 : FTEYVVPVD RYQERVEY YPVERQVVHQQVQVQVVAQPVQVQVTSVSVVQPVQYAPQVQYVQVQVQYAPQVQYAPQVQY : 219

EPI1 : P QPVQYAPAPLQQTSYVPAPVASLPLAQTOIPTRTVPOARPOQPLDRTQAQNPRPNPQAPQOPOQKQKSFLLDR : 289
EPI2 : S QPVQYAPAPLQQTYYVPAPVASLPLAQTVQVTRTVPOARPOQPLDRTQAQNPR--PQAPQOPOQKQKSFLLDR : 290

EPI1 : LFDRD : 294
EPI2 : LFDRD : 295

```

Figure 2. Sequence alignment of epiplasmin 1 and epiplasmin 2 amino acid sequences using the CLUSTALW (v. 1.8) and the GENEDOC (v. 2.6.02) programs. Black boxes represent identical amino acids. Arrowheads correspond to intron positions. The serine/threonine (casein II) and tyrosine phosphorylation sites are represented in blue and red letters respectively. Italic letters colored in green indicate the QPV-rich regions which present the following motifs: QxVV for the first, where "x" may be a glutamine, a proline or a serine, and QPVQ-h- for the second, where "h" is a hydrophobic residue. Epiplasmin sub-class 1 sequence, previously determined by Coffe et al. (1996), is underlined. Amino acid sequence positions are mentioned at the right of both sequences.

Results

Molecular characterization of epiplasmins 1 and 2 in *P. tetraurelia*

Before this study, preliminary data on *Paramecium* epiplasmin sequences were published in work reported by Coffe and al. (1996). These authors described experimental conditions for solubilization and *in vitro* reassembly of epiplasmins. In the same study, the authors also reported partial characterization of *Paramecium* epiplasmins through internal peptide microsequencing. DNA primers were deduced from these peptide sequences and used for PCR on crude genomic DNA. The sequences obtained (maximal length: 162 bp) were clustered in three distinct groups, which yielded an initial insight on the genetic complexity of *Paramecium* epiplasmins. We used these data to synthesize new primers to obtain more extended amplification products. *Paramecium* macronuclear genomic DNA cloned in an EMBL3 λ phage bank was used as a template for new series of PCR experiments. Primers Para-992 and Para-QPVsens allowed us to amplify Epipara 7-6, a 401 bp fragment then cloned and sequenced. Analysis of the Epipara 7-6 sequence confirmed the presence of some heptad repeats (QPVQ-h-, in which "h" is a hydrophobic residue) revealed by Coffe et al. (1996) and previously considered as a possible hallmark of *Paramecium* epiplasmins (see discussion). The fragment size was unexpected: 401 bp versus 54 bp due to the fact that the Para-QPVsens primer annealed to a matching sequence localized 347 bp upstream of the expected target. Screening of EMBL3 λ bank using Epipara 7-6 probe revealed several positive plates. However, for an unknown reason, selected clones displayed unusual instability preventing sub-cloning or sequencing of DNA of interest. This prompted us to screen another macronuclear genomic DNA library, the *P. tetraurelia* macronuclear genomic DNA indexed library constructed in the plasmid pBluescript II KS- (Keller and Cohen, 2000). This library is composed of 61440 clones containing \approx 10 kb inserts from the macronuclear genome. Initial screening consisted of probing a replica of 160 polyclonal "mother wells", each corresponding to a mix of 384 clones. For each positive response, a second screening is performed to identify the clone(s) of interest among the 384. The Epipara 7-6 probe was used to screen this indexed genomic DNA library. Strong signals were observed for 40p22 and 103h9 clones. Plasmid DNA was purified from both clones and seven distinct restriction maps (BglIII, EcoRI, EcoRV, HindIII, NdeI, NsiI and SspI) were hybridized with Epipara 7-6 probe. NdeI restriction fragments, 1.5 kb for 40p22 and 700 bp for 103h9, were strongly reactive for

Gene names	Protein names	Isoelectric points (pI)	Molecular masses (kDa)	Epiplasmin groups
<i>EPI-12</i>	Epiplasmin 12	6,59	32,6	I
<i>EPI-13</i>	Epiplasmin 13	6,44	32,9	I
<i>EPI-22</i>	Epiplasmin 22	5,92	30,9	I
<i>EPI-23</i>	Epiplasmin 23	6,08	33,3	I
<i>EPI-28</i>	Epiplasmin 28	6,31	30,8	I
<i>EPI-29</i>	Epiplasmin 29	6,08	32,5	I
<i>EPI-32</i>	Epiplasmin 32	6,30	31,1	I
<i>EPI-33</i>	Epiplasmin 33	6,30	31,2	I
<i>EPI-36</i>	Epiplasmin 36	5,50	28,2	I
<i>EPI-37</i>	Epiplasmin 37	5,27	30,6	I
<i>EPI-41</i>	Epiplasmin 41	6,08	32,3	I
<i>EPI-1</i>	Epiplasmin 1	6,62 *	33,7	II
<i>EPI-2</i>	Epiplasmin 2	6,75 *	33,8	II
<i>EPI-5</i>	Epiplasmin 5	9,00 *	30,3	II
<i>EPI-6</i>	Epiplasmin 6	9,01 *	28,9	II
<i>EPI-18</i>	Epiplasmin 18	6,75 *	36,4	II
<i>EPI-19</i>	Epiplasmin 19	6,32	35,8	II
<i>EPI-20</i>	Epiplasmin 20	8,54 *	31,9	II
<i>EPI-21</i>	Epiplasmin 21	7,79 *	34,9	II
<i>EPI-34</i>	Epiplasmin 34	8,99 *	30,2	II
<i>EPI-35</i>	Epiplasmin 35	9,05 *	31,1	II
<i>EPI-38</i>	Epiplasmin 38	5,89	30,7	II
<i>EPI-7</i>	Epiplasmin 7	6,34	25,3	III
<i>EPI-14</i>	Epiplasmin 14	6,33	21,9	III
<i>EPI-15</i>	Epiplasmin 15	7,70 *	21,3	III
<i>EPI-16</i>	Epiplasmin 16	6,32	19,6	III
<i>EPI-17</i>	Epiplasmin 17	6,59	19,5	III
<i>EPI-24</i>	Epiplasmin 24	6,33	27,9	III
<i>EPI-25</i>	Epiplasmin 25	6,33	26,3	III
<i>EPI-26</i>	Epiplasmin 26	5,26	23,2	III
<i>EPI-27</i>	Epiplasmin 27	5,26	24,1	III
<i>EPI-30</i>	Epiplasmin 30	6,33	21,8	III
<i>EPI-31</i>	Epiplasmin 31	6,33	21,7	III
<i>EPI-3</i>	Epiplasmin 3	5,62	51,2	IV
<i>EPI-4</i>	Epiplasmin 4	5,42	52,2	IV
<i>EPI-8</i>	Epiplasmin 8	9,06 *	47,5	IV
<i>EPI-9</i>	Epiplasmin 9	9,06 *	48,2	IV
<i>EPI-10</i>	Epiplasmin 10	5,51	35,9	IV
<i>EPI-11</i>	Epiplasmin 11	5,25	36,1	IV
<i>EPI-39</i>	Epiplasmin 39	5,25	37,1	IV
<i>EPI-40</i>	Epiplasmin 40	5,66	48,8	IV
<i>EPItetra 1</i>	Epitetra 1	5,87	32,8	-
<i>EPItetra 2</i>	Epitetra 2	5,22	32,4	-

Table 1. Epiplasmin multigenic family. The table indicates calculated isoelectric points (pI) and molecular masses (kDa) of the 41 paralogous epiplasmins disclosed in *P. tetraurelia* and of the two orthologous proteins (Epitetra 1 and 2) identified in *T. thermophila*. (*) Note that most of neutral and basic epiplasmins (pI > 6.6) are clustered in group II.

both clones (data not shown). These fragments were subcloned in the pGEMT vector and sequenced using the chromosome walking strategy. These sequences have been recorded in the EMBL database : accession numbers AJ865833 (40p22 clone) and AJ865834 (103h9 clone).

The nucleotide sequences of *EPI-1* (40p22 clone) and *EPI-2* (103h9 clone) are shown in Fig. 1. They were determined by translation of DNA sequences in all possible reading frames starting from an ATG codon considering codon usage in *Paramecium*, and the A/T percentage calculated upstream and downstream of the initiation and termination signals. The two nucleotide sequences show 91.1% identity. The coding sequences of both genes contain 63 non-identical nucleotides including 12 nucleotides leading to a non conservative change and 37 nucleotides located at the wobble codon position (third codon base). Two nucleotide insertions were observed between positions 864 to 869 and positions 22 to 30 in *EPI-1* and *EPI-2*, respectively. Two introns (24 and 29 bp) were identified in each sequence (Fig. 1). In the case of *EPI-1*, they are localized from position 437 to 465 and from position 824 to 847. Their boundaries are 5'-GTA...AG-3', as expected for *Paramecium* intron sequences (Sperling et al. 2002). The *EPI-1* and *EPI-2* coding sequences are 885 and 888 nucleotides long, respectively. The translation products, namely epiplasmin 1 (294 amino acids) and epiplasmin 2 (295 amino acids) display calculated molecular masses of 33.7 and 33.8 kDa and calculated isoelectric points of 6.62 and 6.75 respectively. Amino acid sequences of both proteins are presented in Fig. 2. They show 94.3% identity. Both sequences are valine ($\approx 16\%$), glutamine ($\approx 21.5\%$) and proline ($\approx 15\%$)-rich. These three amino acid residues are particularly abundant in two stretches of sequence shown in bold type in the figure. In the case of *EPI-1*, the first stretch is between positions 47 to 89 and is characterized by QxVV repeated motifs in which "x" may be a glutamine, a proline or a serine. The second is between positions 169 to 226 and contains the QPVQ-h- heptad repeats previously described by Coffe and coworkers (1996). These stretches are located on both sides of a tyrosine-rich domain of 79 amino acid residues referred to as the "central domain" in this text. Two putative phosphorylation sites were identified in the central domain, close to its junction with QxVV and QPVQ-h- flanking repeats. These sites are potential targets for serine/threonine (casein II) and tyrosine kinases respectively. The consensus amino acid sequence of epiplasmins subclass 1 previously determined by Coffe et al. (1996), which was the longest sequence stretch obtained by these authors, is integrally observed in epiplasmin 2 (positions 159-208) and also, with only 2 amino acid substitutions, in epiplasmin 1.

```

EPIPLASM33      87: IKGESRIEYVVPYQKAVVEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 165
EPIPLASM32      90: IKGESRIEYVVPYQKAVVEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 168
EPIPLASM41     107: IKGESRIEYVVPYQKAVMEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 185
EPIPLASM23     111: IKGESRIEYIPYQKAVMEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 189
EPIPLASM22      97: IKGESRIEYIPYQKAVMEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 175
EPIPLASM28      98: IKGESRIEYIPYQKAVVEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 176
EPIPLASM29      96: IKGESRIEYIPYQKAVVEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 174
EPIPLASM13      95: IKGESRIEYVVPYQKAVVEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 173
EPIPLASM12      95: IKGESRIEYVVPYQKAVVEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 173
EPIPLASM36      91: IKGESRIEYIPYQKAVVEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 169
EPIPLASM37      86: IKGESRIEYIPYQKAVVEYEEQEVVQYVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 164
EPIPLASM6       77: IKGESRIEYIPYKESVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 155
EPIPLASM5       82: IKGESRIEYIPYKESVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 160
EPIPLASM34      79: IKGESRIEYIPYKESVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 157
EPIPLASM35      85: IKGESRIEYIPYKESVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 163
EPIPLASM38      96: IKGESRIEYIPYKESVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 174
EPIPLASM2       93: IKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 171
EPIPLASM1       90: IKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 168
EPIPLASM18     122: IQCESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 200
EPIPLASM19     123: IQCESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 201
EPIPLASM20     101: IKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 179
EPIPLASM21     116: IKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 194
EPIPLASM31      59: IRGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 137
EPIPLASM30      59: IRGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 137
EPIPLASM15      59: VRGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 137
EPIPLASM14      53: IRGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 131
EPIPLASM17      53: IKGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 129
EPIPLASM16      53: IKGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 129
EPIPLASM24      80: IKGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 158
EPIPLASM25      73: IKGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 151
EPIPLASM7       86: IKGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 164
EPIPLASM27      77: IKGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 155
EPIPLASM26      77: IKGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 155
EPIPLASM4      111: VKGQSRIEYIPYKESVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 189
EPIPLASM3       109: VKGQSRIEYIPYKESVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 187
EPIPLASM40      105: VKGQSRIEYIPYKESVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 183
EPIPLASM8       110: IKGESRVEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 188
EPIPLASM9       108: IKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 186
EPIPLASM10      91: IKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 169
EPIPLASM11      91: IKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 169
EPIPLASM39      90: IKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 168
EPItetra1       90: VKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 168
EPItetra2       99: VKGESRIEYVVPYKAVVEYEEVRRQIQVPRERKVTDDYAVEYQTEYVPOVFOEKYTEVVPVDRYQERVEYYPVERQVVH : 177
platein         196: YQTVDEVEYVPHVDVPEVQHRTRSEV---NEP-----EWRIRYQTVVEPEYRIRVETVDEYEBRVRVYTVD----- 260
articul86      213: RVQVVPVRLVKEKVVQVHRQVFPV---VRVEVVPHEVIRTVDPVPEHEVVRQDVPVPEQVVERVQVPEVQV--- 284
articul80      162: -IQVVPVPHAVVREVIRHEYPVVTKEVTRQVPEVPREVVRQVVDVPEVQVPEVPEKVVVHRQVPEVPEK--- 235

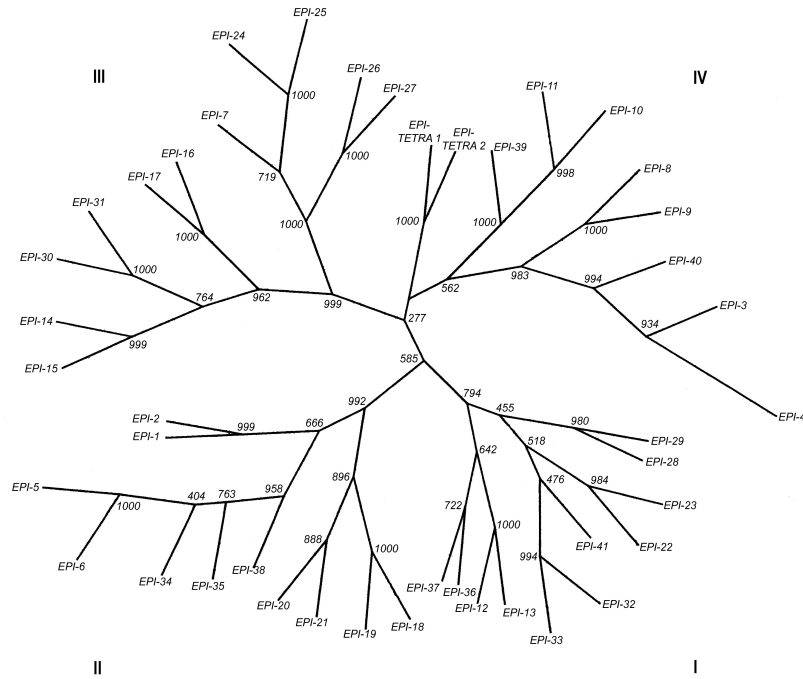
```

Figure 3. Sequence alignment of highly conserved central domain amino acid sequences (79 amino acids) of the 41 paralogous *Paramecium* epiplasmins (EPIPLASM1 to 41) and orthologous sequences identified in *Tetrahymena* (EPItetra1 and 2). Box colors indicate the conservation percentage of amino acids : black for more than 70%, dark gray for values between 50 and 70% and pale gray for values between 30 and 50%. The serine/threonine (casein II) and the tyrosine phosphorylation sites are represented in blue and red italic letters respectively. The position of the conserved central domain in each epiplasmin sequence is mentioned in N and C-terminal of sequences shown in the alignment. Stretches of β/γ platein and *Euglena* articulatin (articul80 and 86) sequences which matched, albeit with a low score, the central domain, according to the BLASTP program, were included in the alignment.

***EPI-1* and *EPI-2* homologous genes within the *Paramecium* and *Tetrahymena* macronuclear genomes**

Using the TBLASTN program and *EPI-1* / *EPI-2* sequences as queries, we found 39 additional paralogous genes in the *P. tetraurelia* macronuclear genome, which we submitted to the EMBL database (*EPI-3-EPI-11*, accession numbers CR932750-CR932758; *EPI-12*, accession number CR933350; *EPI-13-EPI-41*, accession numbers CR932748-CR932720). The presence of epiplasmin sub-classes 2 and 3 sequences, previously determined by Coffe et al. (1996), was entirely retrieved in epiplasmins 28 and 21, respectively. Calculated molecular masses and isoelectric points of the putative proteins are presented in Table 1. We note that all the proteins fall in a molecular mass range of 20-50 kDa similar to that of polypeptide bands attributed to *Paramecium* epiplasm on the basis of Western-blot analysis (compare for instance with Fig. 1 in Nahon et al. 1993). Alignment of the 41 complete amino acid sequences (data not shown) reveals remarkable conservation of the central domain (see below). It also reveals important and unexpected variability in the flanking domains comprising QxVV and QPVQ-h- repeats (not shown). Alignment of epiplasmin conserved central domains (79 amino acids long) is shown in Fig. 3. No database indexed motif was found in this domain other than the two putative phosphorylation sites. We note an enrichment in valine ($\approx 17\%$) and tyrosine ($\approx 14\%$). Glutamic acid is also over-represented ($\approx 17\%$) as compared to other acidic amino acids such as aspartic acid ($\approx 2.5\%$). Using the same strategy, two orthologous sequences (*Epitetra 1* and *2*) were identified in the *Tetrahymena thermophila* genome. Both sequences comprise a highly conserved version of epiplasmin central domain, while QxVV and QPVQ-h- repeats were not found in the flanking regions (not shown).

Finally, we also used BLASTP program and amino acid sequences of epiplasmin central domains as queries to address the question of similarities between *Paramecium* epiplasmins and epiplasmic proteins such as articulins, plateins and Epc1p previously characterized in other ciliates and protists in general. The central domain was not found in any of these three proteins. The "best" matching stretches were found in two euglenoid articulins (80 and 86 kDa) and in one ciliate platein (β/γ platein). These three sequences have been included to the alignment shown in Fig. 3. Likewise, BLASTP analysis using whole amino acid sequences of



_ 100

Figure 4. Comparative analysis of *Paramecium* epiplasmins using DNA sequence alignment of the 41 conserved central domains. Four groups of epiplasmins (I, II, III and IV) were distinguished, based on node strength. Note that, for most, sequences are arranged by pair in the four epiplasmin groups. *Epitetra 1* and *2* were used as an outgroup to root the tree.

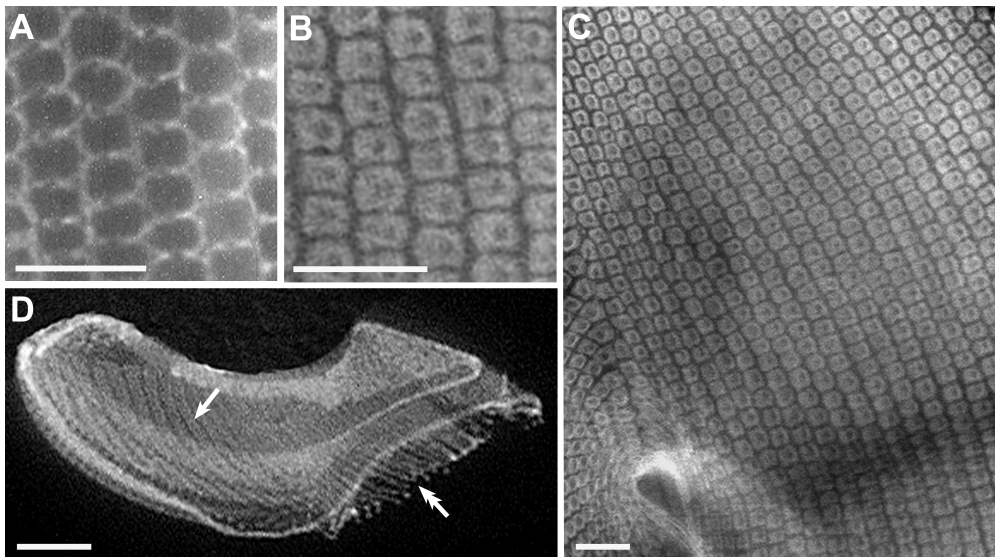


Figure 5. Organization of *Paramecium* membrane skeleton visualized by immunofluorescence microscopy. Outer lattice hexagonal filamentous meshes (A; mAb I3D3) and epiplasmic scales (B; mAb CTS-32) are complementary structures that form a structural continuum that insures the function of membrane skeleton in *Paramecium* somatic cortex. Epiplasmic scales are centered on unstained dot-like structures which are regions occupied by basal bodies (centrioles) of each somatic ciliary apparatus (C). MAb CTS-32 used to visualize epiplasmic scales also stains oral structures (D) including cortical parallel strips of epiplasmins (arrow) and digitations (double arrow) projecting from the cytostome to inner regions of the cytoplasm. Bars A-C: 5 μ m, Bar D: 2.5 μ m.

the 41 *Paramecium* putative epiplasmins as queries failed to evidence significant homology scores (< 35%) with plateins, articulins and Epc1p proteins. Clearly, epiplasmins identified in the present study belong to a novel family of membrane skeletal proteins in ciliated protozoans.

Using DNA alignment of the conserved central domain of *Paramecium* and *Tetrahymena* epiplasmin sequences, a phylogenetic tree was constructed (Fig. 4). To root the tree, sequences of *Epitetra 1* and *2* were used as an outgroup. Based on node strength, four groups of epiplasmins can be distinguished among this family (Fig. 4). Most of these proteins are arranged in pairs all along the tree. The casein II phosphorylation site, determined in *EPI-1* and *EPI-2*, is present in all sequences, but the tyrosine phosphorylation site is segregated in groups I and II and also in five sequences of group IV (*EPI-3*, *EPI-4*, *EPI-8*, *EPI-9* and *EPI-40*). This site is strictly conserved in most (18) sequences of groups I and II proteins. Moreover, we also observed that our analysis splits *Paramecium* epiplasmins according to their calculated molecular mass : 28 to 36 kDa for groups I and II, 20 to 28 kDa for group III and 36 to 52 kDa for group IV.

Distribution of epiplasmin 1 in *Paramecium* membrane skeleton

The cell cortex of *Paramecium* is sub-divided into hundreds of cortical units delimited by hexagonal meshes of a filamentous network called the "outer lattice" (see e.g. Allen, 1971). Each unit is centered on one ciliary apparatus and contains an alveolar sack sustained by an underlying cytoskeletal structure, the epiplasmic scale, which is in close contact with the inner alveolar membrane. Epiplasmic scales are cup-shaped entities which confer a honeycomb-like architecture to the *Paramecium* cell surface. The two systems (epiplasmic scales and outer lattice) form a continuum which insures the function of the membrane skeleton in the *Paramecium* cortex. Immunofluorescence pictures shown in Fig. 5A-C illustrate this remarkable organization. The antibody used to visualize epiplasmic scales was CTS-32, a pan-specific mAb raised against *Paramecium* epiplasmic proteins (Nahon et al. 1993). It is noteworthy that, in our hands, CTS-32 also detects epiplasmin immunoanalogs in the oral apparatus (Fig. 5D). This observation was rarely commented on previous studies (see however Jeanmaire-Wolf et al. 1993), probably because the authors primarily focussed on epiplasmin-based somatic structures rather than oral structures.

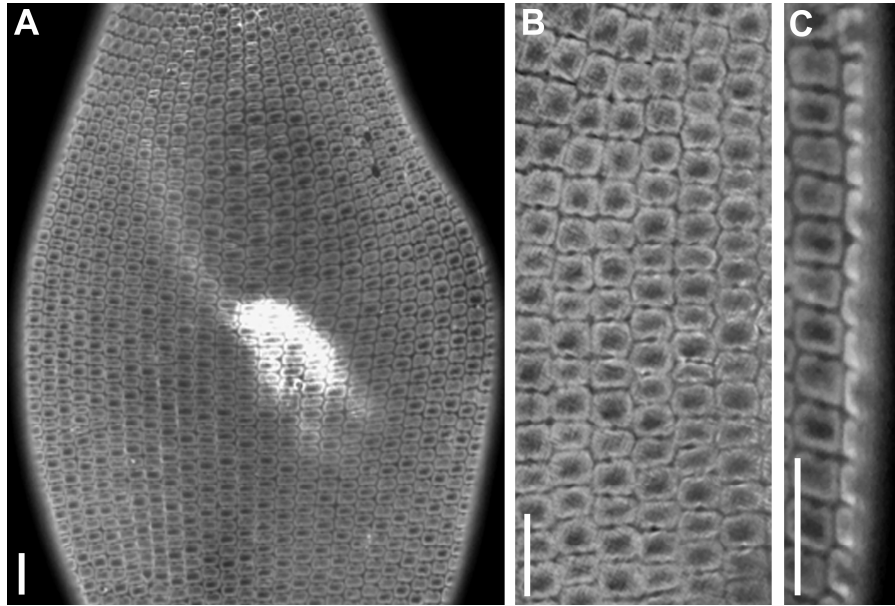


Figure 6. GFP-mediated fluorescence. *Paramecium* cells shown in this figure were transfected with pGFP-*EPI-1*. Clearly, the chimeric protein integrates into epiplasmic scales (A). As mentioned in the text, scales are cup-shaped structures. Pictures obtained at high magnification (B and C) show that the fluorescence is mainly concentrated in peripheral (incurved) regions of epiplasmic scales. Bars, 5 μ m.

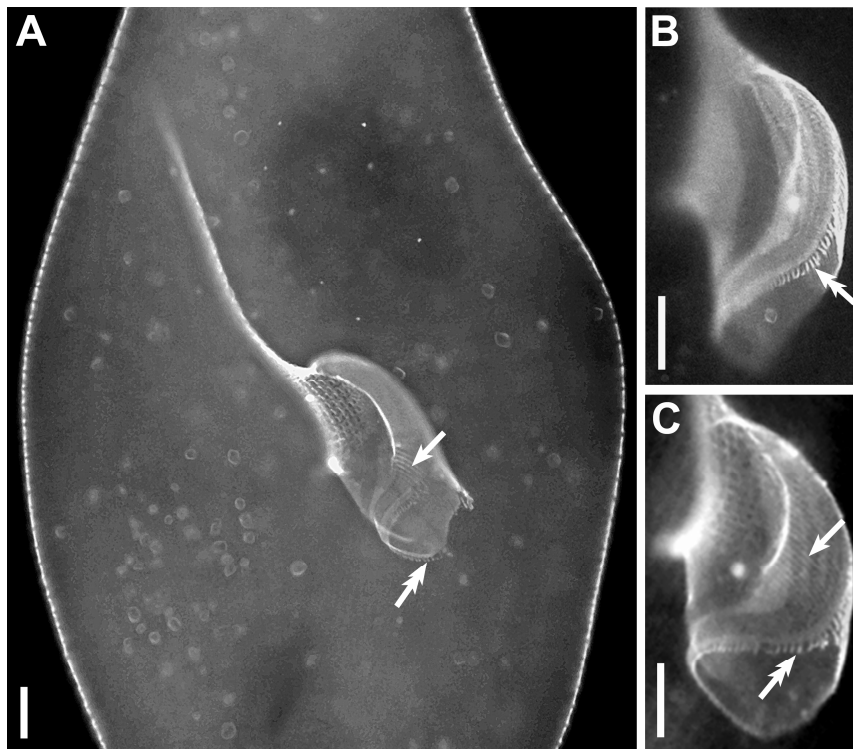


Figure 7. Distribution of GFP-tagged epiplasmin 1 in *Paramecium* oral apparatus. Labelled structures are similar to observed in immunofluorescence microscopy using CTS-32 monoclonal antibody (see Fig. 5D). These include cortical material occurring in the oral cavity (arrow) and digitations (double arrow) capping

Given the genetic complexity of the *Paramecium* epiplasmins family, we developed a GFP approach to investigate the questions of expression and contingent preferential localization of these proteins. Many GFP-tagged proteins have been expressed successfully in *Paramecium* (Froissard et al. 2004; Hauser et al. 2000a; Hauser et al. 2000b). To insure that this approach was applicable to a more detailed study of epiplasmins, *Paramecium* cells were transfected using a pGFP-*EPI-1* construct. In this construct, a short stretch of nucleotides was inserted between the 5'end of *EPI-1* and the 3'end of *gfp* to generate a flexible arm between the two proteins in order to facilitate the folding of epiplasmin 1 and to overcome constraints due to direct fusion of both proteins in the chimeric construct. Fig. 6 A-C shows in situ localization of GFP-tagged epiplasmin 1 in the somatic cortex. Clearly, the chimeric protein integrates into epiplasmic scales. However, the GFP-mediated fluorescence does not exactly reproduce the pattern provided by mAb CTS-32 anti-epiplasmin monoclonal antibody (compare e.g. Fig. 5C and 6A). As mentioned above, epiplasmic scales are cup-shaped structures. GFP-mediated fluorescence was mainly localized in peripheral regions of the scale while mAb CTS-32 labels the entire structure. The central (pericentriolar) regions of scales were devoid of GFP-mediated fluorescent labelling. The GFP tag also revealed oral structures similar to those labelled by mAb CTS-32. Oral epiplasmin-based structures include parallel strips forming a cortical corset in the oral cavity, and digitations that project from the cytostome to cytopharyngeal regions (Fig. 7 A-C). The GFP-tag of these structures indicates that they are composed of *bona fide* epiplasmins rather than mere immunoanalogs of these proteins.

Discussion

In this study, we have determined the entire sequences of two *Paramecium* epiplasmins. The data demonstrate a specific structural organization and remarkable isotypic polymorphism indicated by our contribution to the annotation of *P. tetraurelia* macronuclear genome.

Our molecular characterization of epiplasmins 1 and 2 was performed independently of the "*Paramecium* Genomics" project. For this, we took advantage of previous work by Coffe et al. (1996), which furnished partial sequences of protein components purified from *Paramecium* epiplasm-enriched preparations. Despite the limited number and brevity of available sequences, these authors demonstrated similar stretches of amino acid sequences comprising repeats of QPVQ-h- motifs. Molecular data reported in the present paper show that these repeats are confined to short regions of epiplasmin sequences. This observation explains the difficulties encountered by Coffe and co-workers (1996) in generating long PCR products and their inability to obtain complete sequences of these proteins. Before we began this study, additional internal sequences were obtained (G. Coffe, personal communications) which allowed us to test new primer pairs for PCR experiments and to amplify the EpiPara 7-6 probe used for the molecular characterization of *EPI-1* and *EPI-2* which display a 91.1% sequence identity.

The use of *EPI-1* and *EPI-2* as queries to contribute to the annotation of *P. tetraurelia* macronuclear genome allowed us to identify 39 additional paralogous sequences. Such genetic multiplicity could be expected, considering the multiple bands and spots observed on one- and two-dimensional protein gels of *Paramecium* epiplasm-enriched preparations and the cross-reactivity of these polypeptides with anti-epiplasm antibodies such as mAb CTS-32 (Coffe et al. 1996; Nahon et al. 1993). Analysis of this new multigenic family and of its putative gene translation products shows that QPVQ-h- repeated heptads are lacking in several sequences. Thus, and even though it is yet not known whether the 41 *EPI* genes are all expressed in *Paramecium* cells, it seems unlikely that these repeats represent the main hallmarks of the family. The most remarkable feature of the family is the 237 bp DNA stretch, the central domain, which is highly conserved in all *EPI-n* paralogous sequences and in two orthologous sequences found in the macronuclear genome of *Tetrahymena thermophila*. This central domain is absent from epiplasmic proteins previously characterized in other protozoa

such as *Euglena articulins* (Marrs and Bouck, 1992), *Pseudomicrothorax articulins* (Huttenlauch et al. 1995; Huttenlauch et al. 1998a), *Euplotes plateins* (Kloetzel et al. 2003) and *Tetrahymena Epc1p* protein (Bouchard et al. 2001; Williams, 2004).

Our similarity tree built from comparative analysis of nucleic sequences of the central domain divides the 41 *Paramecium* epiplasmins into four groups. In each group, most sequences are arranged by pair, which suggests a duplication of the entire macronuclear genome. Furthermore, the groups disclosed using this analysis fit with those previously characterized by Coffe et al. (1996) on the basis of biochemical and "mechanical" criteria such as solubility properties of epiplasmins and their ability to spontaneously reassociate *in vitro* into structures with specific configurations. Three groups were characterized by these authors, who also showed that these groups, with different reassociation properties, are equally groups with differing electrophoretic mobilities. Interestingly, groups I and II disclosed in the present paper correspond to the Middle Molecular Weight Group (MMW) defined by Coffe et al. (1996), group III corresponds to the Low Molecular Weight Group (LMW) and group IV to the High Molecular Weight Group (HMW).

From studies performed on intermediate filaments (IF), one of the main class of cytoskeletal elements in metazoan cells, it is clear that there are several unexpected and often unexplained differences between the seemingly straightforward, orderly polymerization of protein subunits *in vitro* and their dynamic behaviour *in vivo* (see e.g. Shoeman and Traub, 1995; Traub and Shoeman, 1994, for a review). *In vitro* reassembly experiments suggest that the process of *Paramecium* epiplasmins interactions is based on the remarkable self-aggregation properties of these proteins, due to the tendency of QPVQ-h- heptads to form coiled-coil structures (Coffe et al., 1996). Accordingly, we would propose that these properties are primarily a function of sequence stretches which are located upstream and downstream of the central domain and which distinguish *Paramecium* epiplasmins with respect to their apparent molecular mass. No canonical domain were identified in the central domain but the fact that groups I-IV fit with those previously proposed by Coffe et al. (1996) suggests that information necessary for epiplasmin interactions is also present in this highly conserved region. In this regard, we have shown that one of the two putative phosphorylation sites identified in this domain, namely the tyrosine kinase site, is modified in group IV and absent in group III. It would be therefore of great interest to determine whether these two sites are actually phosphorylated *in vivo*. The morphogenesis-dependent reorganization of many

Paramecium cortical networks is regulated by phosphorylation processes (see e.g., Garreau de Loubresse et al. 1988; Iftode et al. 1989). A prominent example is that of basal body-associated striated rootlets (kinetodesmal fibers), whose disassembly / reassembly cycle correlates with changes in the phosphorylation state of their constitutive proteins (Sperling et al. 1991). In contrast to striated rootlets which are transiently resorbed before cell division, epiplasmic scales are permanent structures throughout the cell cycle of *Paramecium*. The proposed mechanism for duplication of epiplasmic scales and growth of daughter structures suggests an intussusceptive addition of new protein material (see e.g. Adoutte and Fleury 1996 for a review). It is not known, however, under which configuration (mono- or oligomers?) new material integrates into forming scales. Conceivably, phosphorylation of the central domain may play an important role in higher-order interactions, modulating epiplasmic scale reorganization beyond intrinsic self-aggregation properties of *Paramecium* epiplasmins. In this context, it is interesting that preliminary RNAi of *EPI-1* and *EPI-2* genes induces a phenotype characterized by morphogenetic and cell division defects (Pomel, unpublished data) similar to those generated by Kaczanowska et al. (1996) using the protein kinase inhibitor 6-DMAP. Detailed immunological analysis of the RNAi-induced phenotype is in progress. Data on phosphorylations of articulins and plateins are also preliminary (see however Fazio et al. 1995). Finally, and whatever the mechanism of *Paramecium* epiplasm assembly, it appears that microheterogeneity is necessary for the function of this organelle. Among the different ways to create such a microheterogeneity (isotypic polymorphism, post-translational modifications, associated proteins) gene duplication and isotypic polymorphism have been retained as the favored strategies.

Furthermore, we show that GFP-tagged epiplasmin 1 integrates into epiplasmic scales and oral material. This means that the *EPI-1* translation product contains the information required for incorporation into the relevant structures. Clearly, the GFP construct used in this study should prove useful in comparing the distribution of the different putative epiplasmins revealed in the macronuclear genome.

Epiplasms of *Paramecium* and *Tetrahymena* are homologous structures probably with identical functions. We have identified two orthologous epiplasmin genes in the genomic database of *Tetrahymena thermophila*. The calculated molecular weights of the putative proteins are similar to those of *Paramecium* epiplasmins of the MMW group, according to the nomenclature proposed by Coffe et al. (1996). It has been established that *Tetrahymena*

epiplasm is mainly composed of very high molecular mass (135-235 kDa) proteins (Frankel, 2000; Williams et al. 1979). A prominent example is Epc1p also termed "epiplasmin-C" which has been molecularly characterized in *T. thermophila* and *T. pyriformis* (Bouchard et al. 2001; Williams et al. 2004). From our data, it may be supposed that *Paramecium* orthologous epiplasmins also occur in the submembranous cytoskeleton of tetrahymenid ciliates, but in a very slight proportion. Primarily used to designate sub-alveolar cytoskeletal proteins, the word "epiplasmin" is considered as a synonym of "epiplasmic proteins". It is therefore important to distinguish between proteins characterized in the present study (epiplasmins) and Epc1p proteins, the latter presently appearing to be specific to the genus *Tetrahymena*. We therefore propose that the term "epiplasmin" be reserved for *Paramecium* epiplasmic proteins and homologous proteins depicted in other species. In this regard, we note that CTS-32 immunoreactive proteins were also detected in the euglenoid *Euglena gracilis* and the dinoflagellate *Amphidinium carterae* (Huttenlauch et al. 1998b). Their molecular characterization would be of great interest in determining their relationship to *Paramecium* epiplasmins and obtaining more exhaustive data concerning the occurrence of these sub-membranous proteins among protists generally.

In conclusion, data obtained from this study are of interest in several respects; they provide evidence for a novel multigenic family in *Paramecium* and open interesting experimental perspectives for its analysis at the cellular level. Expression of GFP-tagged epiplasmins as well as the RNAi approach are now available for functional and discriminative analysis of individual genes. Conceivably, different epiplasmins may have distinct localizations and functions. Further experiments should provide this information.

Methods

Cell culture

The wild type strain, *Paramecium tetraurelia* 8-2B, and *nd7-1* mutants were grown at 28°C in grass infusion medium WGP (Wheat Grass Powder, Pines International, Lawrence, KA), infected with *Klebsiella pneumoniae* the day before use and supplemented with 0.4 µg/ml β-sitosterol, according to Sonneborn (1970).

DNA libraries

Two macronuclear genomic DNA banks were used in this study. The *P. tetraurelia* macronuclear genomic bank made in the EMBL3 λ phage vector was a kind gift of Dr. E. Meyer (Ecole Normale Supérieure, Paris, France). The *P. tetraurelia* macronuclear genomic indexed DNA bank made in the pBluescript II KS- plasmid was kindly provided by Dr. J. Cohen (Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, France). The two banks were constructed using distinct strategies detailed in previous papers (Keller and Cohen, 2000; Meyer and Keller, 1996).

PCR

PCR reactions used to generate the Epipara 7-6 genomic probe were performed using DNA of EMBL3 λ recombinant phages as templates. Phages were grown until confluence as described by Sambrook et al. (1989). They were eluted by gentle soaking for 1 hour in SM buffer (Sodium Magnesium). Phage DNA was purified using the Midi-prep phage kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. The PCR reaction mix (50 µl) contained 1 ng phage DNA, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 30 pmol of each primer and 1U Taq polymerase (Eurobio). The composition of the dNTPs mix was modified to mimic the A/T abundance (2/3 A/T and 1/3 G/C) characteristic of the ciliate macronuclear genome (Wuitschick and Karrer, 1999). The primers used were: 5'-AAGT(TC)GTTGCCCAACCAGTC-3' (Para-QPVsens) and 5'-CTGGTTG(GA)ACGACTGATTGAG-3' (Para-992). They were deduced from direct microsequencing of a subset of *Paramecium* epiplasmic proteins (Coffe et al., 1996; Coffe,

unpublished data). PCR reactions to generate Epipara 7-6 included the three following steps: 1) one cycle of denaturation (94°C for 5 minutes), 2) 30 cycles of denaturation (94°C for 10 seconds) - annealing (60°C for 30 seconds) and extension (72°C for 1 minute), and 3) extension at 72°C for 15 minutes.

PCR reactions (50 µl) used to generate *gfp-EPI-1* chimeric construction were performed using 1 ng of the 40p22 clone obtained from the macronuclear genomic indexed DNA bank, 25 pmol of each primer, 2.5 mM MgCl₂, 0.8 mM of dNTPs and 1 U of Taq polymerase (Eurobio). The amplification used an initial denaturation step for 5 minutes at 95°C, followed by 30 cycles of denaturation for 30 seconds at 95°C, annealing for 30 seconds at 60°C and extension for 1 minute at 72°C. The reaction was completed by a final extension step at 72°C for 15 minutes. The primers used for amplification were: 5'-ATAAAGGATCCATGAGCAATATCCCACAATC-3' (EB5) and 5'-GATTACTGCAGTCAATCTCTATCAAAGAG-3' (EP3).

Screening of DNA banks

Screening of the two banks used in this study was performed as described by Keller and Cohen (2000). Replica filters were prehybridized for 2 hours in Church buffer (10 mM EDTA, 1% BSA, 0.5 M NaHPO₄ pH 7.2, 7% SDS) at 65°C (Church and Gilbert, 1984). Epipara 7-6 probe was labelled with [α -³²P]-dCTP (Amersham, specific activity 110 TBq/mmol) using Euromedex DNA labelling kit, according to the manufacturer's instructions. Hybridization was done overnight at 65°C in the same buffer containing 50 ng of probe. Filters were washed for 1 minute in SSC 2X (Sodium Chloride-Sodium Citrate) and 0.1% SDS at room temperature and 65°C, and in SSC 0.2X and 0.1% SDS for 30 seconds at 65°C. Autoradiography was performed using Kodak X-Omat AR films.

DNA cloning and sequencing

DNA restriction fragments from positive indexed bank clones were hybridized with the Epipara 7-6 probe as described above for screening. Positive restriction fragments were purified by electroelution, dephosphorylated by CIP (Calf Intestinal Phosphatase) treatment and subcloned in pGEMT plasmid (Promega). Plasmids were purified on Qiagen columns

(Mini and Midi-prep) and DNA inserts were sequenced by MWG Biotech (Courtaboeuf, France) using the chromosome walking strategy.

Construction of pGFP-epiplasmin

To fuse DNA sequences coding for GFP and epiplasmin 1, the PCR product of the *EPI-1* genomic sequence was inserted in a pGFP plasmid vector, a kind gift of Dr. E. Meyer (ENS, Paris, France). This plasmid expresses a GFP sequence whose codon usage is adapted to that of *Paramecium* (see Froissard et al. 2004; Meyer and Cohen, personal communication). In the final construct, the expression of GFP-epiplasmin 1 fusion protein is under the control of promotor and terminator sequences of *Paramecium* surface antigen 156G gene (Meyer et al. 1985).

Antibodies

CTS-32 and I3D3 monoclonal antibodies (mAbs) were kind gifts of Dr. A. Fleury (Université Paris XI, Paris, France). The mAb CTS-32 was raised against *Paramecium* cortical preparations treated by the non-ionic detergent Triton X-100. The preparation of cortical fractions used as immunogen and properties of the antibodies have been reported elsewhere (Nahon et al. 1993). The properties of mAb I3D3 have been previously described by Jeanmaire-Wolf et al. (1993). Fluorescently conjugated secondary antibodies were from Sigma.

Microinjection of DNA constructions

Macronuclear microinjections were performed in *P. tetraurelia nd7-1* secretory mutants (gift from Dr. J. Cohen; see Skouri and Cohen 1997), to provide a positive control for cell transformation experiments. pGFP-*EPI-1* constructions and pGEMT plasmids containing the wild type gene *ND7* open reading frame (ORF; gift from Dr. J. Cohen) were purified using the Hispeed plasmid Midi kit (Qiagen). 100 µg of pGFP-*EPI-1* and 18 µg of pGEMT were ethanol co-precipitated. DNA was resuspended in 6 µl of filtered water (Millex GV 0.22 µm). Five divisions after autogamy, cells were transferred to Dryl's buffer (2 mM sodium citrate, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM CaCl₂) supplemented with 0.2% bovine serum

albumin (BSA). Cells were observed under a film of mineral oil (Nujol) using a Nikon inverted phase-contrast microscope. Approximately 5 μ l of DNA was injected in the macronucleus using a Narishige micromanipulator device and an Eppendorf Transjector 5246. One day after microinjection, the rescue of trichocysts exocytosis capacity was tested by picric acid as described by Pollack (1974).

Fluorescence microscopy

For immunofluorescence labelling, cells were permeabilized for 1 minute using 1% Triton X-100 in PHEM buffer (Pipes 60 mM, Hepes 25 mM, EGTA 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, pH 6.9), fixed with 2% formaldehyde and placed on histological glass slides precoated with poly-L-lysine (Sigma). Slides were washed in PBS (0.15 M NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2.5 mM NaH_2PO_4 , pH 7.2) and incubated for 15 minutes in PBS containing 3% BSA to prevent non-specific antibody binding. Primary antibody was applied for 1 hour at 1/20 dilution in PBS containing 0.3% BSA (PBSB). Slides were then washed in PBS and treated for an hour with secondary antibody at 1/100 dilution in PBSB. After three successive washes in PBS, slides were mounted in DABCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane) medium (Sigma) and observed on a Leica DMCR epifluorescence microscope equipped with Leica Q-FISH image acquisition system.

For observation of GFP-tagged epiplasmins, *ND7* complemented cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PHEM buffer containing 0.2% BSA. Cells were washed several times in the same buffer and loaded on histological slides. Slides were mounted using Citifluor medium and observed under a Zeiss epifluorescence microscope equipped with a Roper Coolsnap-CF intensifying camera and Metaview image acquisition system from Metamorph using GFP filters.

DNA and amino-acid sequence analysis

Identity scores between *EPI-1* and *EPI-2* were calculated by the ALIGN program available on the site http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/alignn_in.pl. Identity scores between Epiplasmin 1 and Epiplasmin 2 were calculated by the ALIGN program available on the site http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/alignp_in.pl. Molecular weights

and isoelectric points of putative proteins were determined on the site <http://www.expasy.ch/tools/pi-tool.html>. Phosphorylation sites were displayed using the program Scanprosite from Expasy, available on the site <http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html>. The TBLASTN program was used to compare *EPI-1* and *EPI-2* sequences with the genome database of *P. tetraurelia*. This analysis was performed on the site <http://aiaia.cgm.cnrs-gif.fr/blast/blast.html>. *Tetrahymena* orthologous epiplasmin sequences were obtained by the TBLASTN program from the site <http://tigrblast.tigr.org/er-blast/index.cgi?project=ttg>. Preliminary *Tetrahymena* sequence data were obtained from The Institute for Genomic Research website at <http://www.tigr.org>. The 39 paralogous epiplasmin sequences were disclosed by our contribution to annotation of the macronuclear genome using the Artemis program (Rutherford et al. 2000). Sequences of articulins and plateins were obtained using the BLASTP program and the conserved central domain of epiplasmins as queries on the site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Due to the high level of P, V, Q amino acid residues in epiplasmin sequences, the low complexity filter was removed in all BLAST analyses. Amino acid sequences were aligned by the CLUSTALW (v. 1.8) program, available on the site <http://clustalw.genome.jp/>, and processed through the GENEDOC (v. 2.6.02) program, available from the site <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>. CLUSTALW (v. 1.8) was also used to align epiplasmin nucleic sequences and to build a similarity tree using the Phylip 3.6 package, available from the site <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>: distances were calculated by DNADIST using the F84 model. Trees were elaborated by the FITCH program using the Fitch-Margoliash method. Confidence levels were evaluated using 1000 bootstraps replicates and 10 jumbles for each replicate. The rooted tree was drawn with TreeView v. 1.6.6 software available from the site <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>.

Aknowledgements

We would like to express our gratitude to Dr. J. Cohen for kindly providing genomic indexed DNA bank of *Paramecium*, *ND7* wild type gene and *nd7-1* mutant cells and also for efficient help in macronuclear microinjection and genomic annotation of epiplasmins. We would like to acknowledge F. Ruiz for her expert advice on microinjection and fluorescence microscopy and L. Sperling for bioinformatics. Contributions of F. Koll and D. Bayle to preparative technics were highly appreciated. For generous gifts, many thanks to Dr. E. Meyer for EMBL3 λ phage DNA bank, pGFP plasmid vector and to Dr. A. Fleury for I3D3 and CTS-32 antibodies. We are also indebted to J. L. Vincenot for artistic work and Dr. C. Thompson-Coffe for critical reading and correction of the manuscript. Preliminary *Tetrahymena* sequence data were obtained from The Institute for Genomic Research website at <http://www.tigr.org>. This work was supported by CNRS (UMR 6023) and by a grant from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (to S. P.).

References

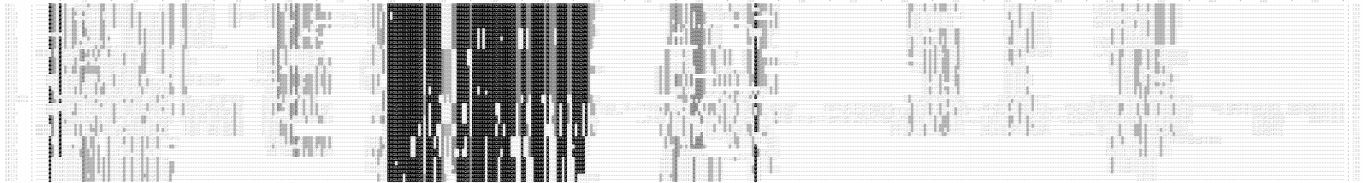
- Adoutte A and Fleury A** (1996) Cytoskeleton of ciliates. In Hausmann K and Bradbury PC (ed) Ciliates: cells as organisms. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, pp 41-49
- Allen RD** (1971) Fine structure of membranous and microfibrillar systems in the cortex of *Paramecium caudatum*. J Cell Biol **49**: 1-20
- Bennett V and Baines AJ** (2001) Spectrin and ankyrin based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. Physiol Rev **81**: 1353-1392
- Bouchard P, Chomilier J, Ravet V, Mornon JP and Viguès B** (2001) Molecular characterization of the major membrane skeletal protein in the ciliate *Tetrahymena pyriformis* suggests n-plication of an early evolutionary intermediate filament protein subdomain. J Cell Sci **114**: 101-110
- Church GM and Gilbert W** (1984) Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA **81**: 1991-1995
- Coffe G, Le Caer JP, Lima O and Adoutte A** (1996) Purification, *in vitro* reassembly, and preliminary sequence analysis of epiplasmins, the major constituent of the membrane skeleton of *Paramecium*. Cell Motil Cytoskel **34**: 137-151
- Fazio MJ, Da Silva AC, Rosiere TK and Bouck GB** (1995) Membrane skeletal proteins and their integral membrane protein anchors are targets for tyrosine and threonine kinases in *Euglena*. J Eukaryot Microbiol **42**: 570-580
- Frankel J** (2000). Cell biology of *Tetrahymena thermophila*. Methods Cell Biol **62**: 27-125
- Froissard M, Keller AM, Dedieu JC and Cohen J** (2004) Novel secretory vesicle proteins essential for membrane fusion display extracellular-matrix domains. Traffic **5**: 493-502
- Garreau de Loubresse N, Keryer G, Viguès B and Beisson J** (1988) A contractile cytoskeletal network of *Paramecium*: the infraciliary lattice. J Cell Sci **90**: 351-364
- Hauser K, Haynes WJ, Kung C, Plattner H and Kissmehl R** (2000a) Expression of the green fluorescent protein in *Paramecium tetraurelia*. Eur J Cell Biol **79**: 144-149
- Hauser K, Pavlovic N, Klauke N, Geissinger D and Plattner H** (2000b) Green Fluorescent Protein-tagged sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase overexpression in *Paramecium* cells: isoforms, subcellular localization, biogenesis of cortical calcium stores and functional aspects. Mol Microbiol **37**: 773-787

- Huttenlauch I, Geisler N, Plessmann U, Peck RK, Weber K and Stick R** (1995) Major epiplasmic proteins of ciliates are articulins: cloning, recombinant expression, and structural characterization. *J Cell Biol* **130**: 1401-1412
- Huttenlauch I, Peck RK, Plessmann U, Weber K and Stick R** (1998a) Characterization of two articulins, the major epiplasmic proteins comprising the membrane skeleton of the ciliate *Pseudomicrothorax*. *J Cell Sci* **111**: 1909-1919
- Huttenlauch I, Peck RK and Stick R** (1998b) Articulins and epiplasmins: two distinct classes of cytoskeletal proteins of the membrane skeleton in protists. *J Cell Sci* **111**: 3367-3378
- Iftode F, Cohen J, Ruiz F, Torres Rueda A, Chen-Shan L, Adoutte A and Beisson J** (1989) Development of surface pattern during division in *Paramecium*. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structures in the wild type. *Development* **105**: 191-211
- Jeanmaire-Wolf R, Clérot JC, Nahon P, Iftode F, Fleury A and Adoutte A** (1993) Isolation and characterization of monoclonal antibodies to cytoskeletal and membrane proteins of *Paramecium* cortex. *Eur J Protistol* **29**: 311-333
- Kaczanowska J, Iftode F, Coffe G, Prajer M, Kosciuszko H and Adoutte A** (1996) The protein kinase inhibitor 6-dimethylaminopurine does not inhibit micronuclear mitosis, but impairs the rearrangement of cytoplasmic MTOCs and execution of cytokinesis in the ciliate *Paramecium* during transition to interphase. *Eur J Protistol* **32**: 2-17
- Keller AM and Cohen J** (2000) An indexed genomic library for *Paramecium* complementation cloning. *J Eukaryot Microbiol* **47**: 1-6
- Kloetzel JA, Baroin-Tourancheau A, Miceli C, Barchetta S, Farmar J, Banerjee D and Fleury-Aubusson A** (2003) Cytoskeletal proteins with N-terminal signal peptides: plateins in the ciliate *Euplotes* define a new family of articulins. *J Cell Sci* **116**: 1291-1303
- Marrs JA and Bouck GB** (1992) The two major membrane skeletal proteins (articulins) of *Euglena gracilis* define a novel class of cytoskeletal proteins. *J Cell Biol* **118**: 1465-1475
- Meyer E, Caron F and Baroin A** (1985) Macronuclear structure of the G surface antigen gene of *Paramecium primaurelia* and direct expression of its repeated epitopes in *Escherichia coli*. *Mol Cell Biol* **5**: 2414-2422
- Meyer E and Keller AM** (1996) A mendelian mutation affecting mating-type determination also affects developmental genomic rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. *Genetics* **143**: 191-202

- Nahon P, Coffe G, Le Guyader H, Darmanaden-Delorme J, Jeanmaire-Wolf R, Clérot JC and Adoutte A** (1993) Identification of epiplasmins, a new set of cortical proteins of the membrane cytoskeleton in *Paramecium*. *J Cell Sci* **104**: 975-990
- Pollack S** (1974) Mutations affecting the trichocysts in *Paramecium aurelia*. I. Morphology and description of the mutants. *J Protozool* **21**: 352-362
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA and Barrell B** (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**: 944-945
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Shoeman RL and Traub P** (1995) The proteins of intermediate filament systems. In Hesketh JE and Pryme IF (ed) *The cytoskeleton: structure and assembly*. Jai Press Inc, Greenwich, pp 205-255
- Skouri F and Cohen J** (1997) Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: identification of the *ND7* gene required for membrane fusion. *Mol Biol Cell* **8**: 1063-1071
- Sonneborn TM** (1970) Methods in *Paramecium* research. *Methods Cell Physiol* **4**: 241-339
- Sperling L, Keryer G, Ruiz F and Beisson J** (1991) Cortical morphogenesis in *Paramecium*: a transcellular wave of protein phosphorylation involved in ciliary rootlet disassembly. *Dev Biol* **148**: 205-218
- Sperling L, Dessen P, Zagulski M, Pearlman RE, Migdalski A, Gromadka R, Froissard M, Keller AM and Cohen J** (2002) Random sequencing of *Paramecium* somatic DNA. *Eukaryot Cell* **1**: 341-352
- Traub P and Shoeman RL** (1994) Intermediate filament proteins: cytoskeletal elements with gene-regulatory function. *Int Rev Cytol* **154**: 1-103
- Williams NE, Vaudaux PE and Skriver L** (1979) Cytoskeletal proteins of the cell surface in *Tetrahymena*. I. Identification and localization of major proteins. *Exp Cell Res* **123**: 311-320
- Williams NE** (2004) The epiplasm gene *EPCI* influences cell shape and cortical pattern in *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* **51**: 201-206
- Wuitschick JD, and Karrer KM** (1999) Analysis of genomic G + C content, codon usage, initiator codon context and translation termination sites in *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* **46**: 239-247

Supplementary data

Alignment of complete epiplasmin amino acid sequences



Central conserved
Domain

Annex

CLUSTAL W (1.83) multiple amino acid sequence alignment of epiplasmins

```
EPI1      -----MSNIPQS---QQAQQAPQAPQPYYGQPSYAQPYG-----APLSPL--RYSY
EPI2      -----MSNIPQSQHPQQQAQQPPQAPQPYYGQPSYAQPYG-----APLSPL--RYSY
EPI18     -----MSNIPPSQHPPQAPQPG-PYQQPTFQPGFAPQYAPAPVAYGPPLTQSPL--RYSQ
EPI19     -----MSNIPPSQHP--ASQPG-PYQQPTFQPGFAPQYAPAPVTYGPPLTSSPL--RYSQ
EPI20     -----MSNVPNSHHPPQAPKQGGPPYQPTQFQPGFAPQYAPAPVTYGPPLTSSPL--RYSQ
EPI21     -----MSNVPN SQHPPQAPQQGAPYQPNHFQPGFAPQYAPAPVAYGPPLTSSPL--RYSQ
EPI5      -----MSNHPASQRPPQ-PVQNAPHQPVA----YSPRPTYAPPVQFASPSYYPV--QQSV
EPI6      -----MSNHP SQRPPQ-PVQNAPHQPLA----YSPRPTYAPPVQFASPSYYPV--QQSV
EPI34     -----MSNHPASTKPPQ-KTAPAPQQPIP----YSPRPTYAPPVAFASPSYLPV--QQSF
EPI35     -----MSNHPASTRPPQQAQRPAQPQHPVIA----YSPRPTYAPPVAFASPSYLPV--QQSF
EPI38     -----MSNRPPTQQPGQPATTAPQYQPQWN-PTFSPPRAYQAPVQLQSPAYIPQ--YYTQ
EPI12     MSNHPQSQQPQPKTQAPQPQARTVAPTYPNAVLPQAYPNAFQPQPYYPASVPRQ--SYVA
EPI13     MSNHPQSQQPQQQPQAAQPLARTAAPTYPNAVLPQAYPNAFQPQPYYPASVPRQ--SYVA
EPI28     -----MSNRPEAAQQPQQPQQRQVPAPQTRPAGPVYPTNTYLPPTTYYPASPIRQ--SYVA
EPI29     -----MSNHPQAAQQPQ--QAPAPVPAQQRPAAPVYPNAVLPPTTYYPASPIRQ--SYVA
EPI32     -----MSNHPYSNAPPAQPLATTQAPKFGQPTLQQPVVPQYAVP---LQQSPIRQ--SYIQ
EPI33     -----MSNHPYSNAPPAQPLATTQAPKFGQPTLQQPVVPQYAVP---LQQSPIRQ--SYIQ
EPI22     -----MSQRPPVPQNQAPQPQQYPSAPQYAPQYAPQYVVPQYAPLPT-----YLPQ--QYAP
EPI23     ----MSQRPPVPQNQAPQPQQYFPAPTYAPQYAPQYAPTYAPAYAPTYAPTYAP--QYAP
EPI41     ----MSQRPPVPQNQAPQPQQYHPQAPQYAPQYAPQYAPQYAPQYSPAPLATYPA--QYAP
EPI36     -----MAPPPVPSNKP IQAPPQFQQQPALFGQPQTYQPYSTLAPVQYQPINAPL--AYS-
EPI37     -----MTPTPVPSNKP LQENQQPQFQPALFRQPQTYQPLQTVAPIQYQPYNAPL--AYS-
EPI1tetra -----MSSNENQSEQEKAQVLQGTKPVYQYPAYTSQYVQQQPLIQSOLVTQPVQ--YVQQ
EPI2tetra -----MSDQPEQAQQQANLQQQQQPPVQTQVLQYPFQYVQQPLVQSQVVAQPIY--TNGQ
EPI3      ----MANIPQQQYSTPSNLPSYNRDQSTYQQPTLQQQQVQPSNYQPQQSAEKGL--QYLP
EPI4      ----MANLPQQQYSTPSNLPSYNRDPSTYQQPTLQQQQIPQSNYQPQQSSDKGL--QYLP
EPI40     ----MANLPPQQYSPPSNLPTNNREPQTFQQPTIGQPQVARSNLPIQSLPDTAL--QYLP
EPI8      ----MSQLPQQGQESKPHSNLPQQNIPQGGQNFIPQQGIPNQIFPQAQPPQY--VVPA
EPI9      ----MSQLPQTGQQSKPQSNMPQQNIPQGGQ--QFIPQQGIPTQVLPQGGQPQY--VVPS
EPI10     MNNPRPSQLPAQKATPSQLPPTAQQQVPEAYLPQQNWPVASSQIQPGVYGGP-----IPL
EPI11     MNNPRPSQLPAQKATPSQLPPTSQQQVPEYQAQPNWVPASSQIQPGVLSQP-----IPL
EPI39     MNNTRPSQLPAAKSTPSQLPQGGQQ-VPEGYQPPLGWVPASSQIQPGTANQA-----LPF
EPI24     -----MPIYP-----TAPLTSSIP--APVSVVQPVSYAQPVTYAQPVQYVPPQPVQ----
EPI25     -----MPIYP-----TAPLTSSIP--APVSVVQPVSYAQPVTYAQPVSYAPPVSY----
EPI7      -----MSFYPGYRYPYAAPLTSSFA--APLTYAPQVSYAPPVQYAPQVSYAPPVSY----
EPI26     -----MSFYPGFYRYPYTQPLAASFA--APLAYP-QASYVRPVATAPIYT-----
EPI27     -----MSFYPGFYRYPYTQPLAASFA--APLAYP-QASIVRPVATTPIYT-----
EPI14     -----MYSYAPLGVSYASPLATS IARPVVGYAAPVSYVQPVSYAAPVSYAP-----
EPI15     -----MYSYAPLGVSYASPLATS IARPVVGYGAPVSYVQPVSYAAPVTYAPPV-----
EPI30     -----MYSYAPLGVSYASPLATS IARPVVGYAAPVSYAAPVSYAPPVSYAAPV-----
EPI31     -----MYSYAPLGVSYASPLATS IARPLVGYAAPVSYAAPVSYAAPVSYAAPV-----
EPI16     -----MYSYAPLGVSFASPIGTSIVRPAPVSYVQPVSYAQPIPYAQPISYVQP-----
EPI17     -----MYSYAPLGVSFASPIATSIVRPAPVSYVQPVSYAQPVSYAQPIITYAQP-----

EPI1      APPVVQQVVP-----QTYVP-----QQVIPQTYVPQQVVAQPVVAQP-----
EPI2      APPVVQQVVP-----QTYVP-----QQVVPQTYVPQQVVAQPVVAQP-----
EPI18     PLYQAPVVQQ-----PVYAQPVVQQPVYTQPVVQQPVYAQPVVQQPVYAQPVVQQPIVTTQ
EPI19     PLYQAPVVQQ-----PVYAQPVVQQPVYTQPVVQQPVYTQPVVQQPVYAQPVVQQPIVTTQ
EPI20     PLYQPSVVAQ-----PVYAP-----PVVQQPVYAPSVVQQPVVT-----
EPI21     PLYQPSVVAQ-----PVYAP-----QVVQQPVYAPPVVQQPVYAPPVVQQPVVTQ
EPI5      VAP-VQYVP-----QPVAVQPLVQP-VAVQPV-----
EPI6      VAAPVQYVP-----QPVAVQPIVQ-----PV-----
EPI34     VGAPVQYVP-----QPVAVQPVAVQPVAVQ-----
EPI35     VGSVPQYIP-----QPVAVQPVAVQPVAVQPV-----
```

EPI38 PVAQSYVAPPVVQQP-----IVYQQPVVVTQSVVAQPVVVTQP-----
 EPI12 -----PVQYAPVAQVPVAPIASVPVQYAVAP-----
 EPI13 -----PVQYAPVAQVPVAPIASVPVQYAVAP-----
 EPI28 PVA-----PIQYAPVAQVPVAPIASVPIQQVAPVPVQT-----
 EPI29 PVA-----PIQYAPVAQVPVAPIASVPVQQLAPVQVQP-----
 EPI32 -----PVQYAPAPQP--VQYVQQPVQYVQQPVQYV-----
 EPI33 -----PVQYAPVPQQ--VQYVPQPVQYVQQPVQYV-----
 EPI22 APIAPLTYSVAR-----PVAPQPVVAQPVVQAPVLQQSVIAQP-----
 EPI23 APIAPLTYSVARPV-----APVAPVAPVVAQPVIAQPVVAQPVVQSVIAQP-----
 EPI41 ATYAPAYAPVAP-----LTYSVARPVAPVVAQPVVQAPVLQQSVIAQP-----
 EPI36 -----VASPVQPVVQVQVAPQPLLAQSYVAQP-----
 EPI37 -----VAAPVQPVVQQIVAPQPILAQSYLPQ-----
 EPI1tetra P-----VQYVQQTVQGVHQ-----SALSQSQAVASG--LVATQIQR-----
 EPI2tetra VPTTQFLGSTLIQGATQQVSA-----GTVLHQSGVQVSGVPVQTTLQR-----
 EPI3 QQQGILPQNVQTQP--LYGQP-----QVGIVGQPFTQQPIFGQSQIQQLPQQTV-----
 EPI4 QQIGGLPQNAQPQQQQLYGQP-----QFGLIGQPITQQPVFGQSQIQQLPQQT-----
 EPI40 QQIAQQPYSSQPLQQPLYNQL-----QPTKLGP---QQPIFGQSQIQQIAQP-----
 EPI8 QNLGRAPISGFPAQQLPYSQQ-----QGLQPLPQSQIQGQTGAPYQTGPVQLSS-----
 EPI9 QNLGRAPISGFPTQQPLPYLQQ-----QGFQPLPSQVIGQNGVPYQTGPVQLSS-----
 EPI10 QQTG-LITNPQYLQQPVYAQQ-----GLVQSSGPVVVTQG-----
 EPI11 QQTG-LIQNPQYLQQPVYAQQ-----QLIQSSAPVVVTQG-----
 EPI39 QQTG-LIANPQYLQQQPYAQQ-----PVIQSSGPVVVTQG-----
 EPI24 -----YVPQPVQYVPQPVVQQPVIAQPILTQS-----
 EPI25 -----YVPQPVQYVPQPVYQQPVIAQPILTQS-----
 EPI7 -----AAPVQYARPVVTQSYVQPVVQSVIAQP-----
 EPI26 -----APAPIYTAPAPVVVTQSVVQPVVQSVV-----
 EPI27 -----APAPIYTAPAPVVVTQSVVQPVVQSVV-----
 EPI14 -----
 EPI15 -----
 EPI30 -----
 EPI31 -----
 EPI16 -----
 EPI17 -----

EPI1 -----VVAQSVVAQPTIKGESRIEYVPYEKTVLEYEVEVRQRIQVPREKYVTDYYAVEYQ
 EPI2 -----VVAQSVVAQPTIKGESRIEYVPYEKTVLEYEVEVRQRIQVPREKFTDYYAVEYQ
 EPI18 SIVAQ---PQPVVAAQPIQGESRIEYVPYEKTVIEYEVEVRQKIQVPRKQYVTDYYAVEYQ
 EPI19 SVVAQPVVAQPVVAAQPIQGESRIEYVPYEKTVIEYEVEVRQKVQVPRKQYVTDYYAVEYQ
 EPI20 ---QSVVAQPVVAAQPIKGESRIEYVPYEKTVLEYEVEVRQKIQVPRERYVTDYYAVEYQ
 EPI21 SVVAQPVVAQPVVAAQPIKGESRIEYVPYEKTVLEYEVEVRQKIQVPRERYVTDYYAVEYQ
 EPI5 -----AVQPAQQVIKGESRIEYIPYEKSVIEYEVEVRQRIQVPREKYVTEYQAVEYQ
 EPI6 -----AVQPAQQVIKGESRIEYIPYEKSVIEYEVEVRQRIQVPREKYVTEYQAVEYQ
 EPI34 -----PAQQVIKGESRIEYIPYEKSVIEYEVEVRQKIQVPREKYITEYQAVEYQ
 EPI35 -----AVQPAQQVIKGESRIEYIPYEKSVIEYEVEVRQRIQVPREKYVTEYQAVEYQ
 EPI38 -----VVQQQPIIKGESRVEYIPYEKSVIEYEVEVRQKIQVPREKYVTEYQAVEYQ
 EPI12 -----VAPVAQHQS IKGESRIEYVPYQKAVIEYEEQEVVSYVPRETRVTDYYAVEYQ
 EPI13 -----VAPVAQHQS IKGESRIEYVPYQKAVIEYEEQEVVSYVPRETRVTDYYAVEYQ
 EPI28 -----LGVAPVAQHQT IKGESRIEYIPYQKAVVEYEEQEIVSYVPRETKVTDYYAVEYQ
 EPI29 -----VAVAPVAQHQT IKGESRIEYIPYQKAVVEYEEQEIVSYVPRETKVTDYYAVEYQ
 EPI32 -----QQPVPQVQHQS IKGESRIEYVPYQKAVVEYEEQEIVSYVPRETKVTDYYAVEYQ
 EPI33 -----VQ---SVQHQS IKGESRIEYVPYQKAVVEYEEQEIVSYVPRETKVTDYYAVEYQ
 EPI22 -----VVQQSVHAT--IKGESRIEYIPYQKAVMEYEEQEIVSYVPREKKITDYYAVEYQ
 EPI23 -----VVQQSVHAT--IKGESRIEYIPYQKAVMEYEEQEIVSYVPRETKVTDYYAVEYQ
 EPI41 -----VVQQPVHAT--IKGESRIEYVPYQKAVMEYEEQEIVSYVPRETKVTDYYAVEYQ
 EPI36 -----VIAQPVQQSPNIKGESRIEYIPYQKAVTEYEEQEIVSYVPRETKVTEYYAVEYQ
 EPI37 -----PVQQSQT IKGESRIEYIPYQRAITEYEEQEIVSYVPRETKVTEYYAVEYQ
 EPI1tetra -----EVVKGESRIEYIPYEKSVIEYEAVQRVDYVPKKEKITDYYAVEYQ
 EPI2tetra -----EVVKGESRIEYIPYEKTVIEYEAVQRVIEYVPKKEKITDYYAVEYQ
 EPI3 -----ETQQGQVVKGQSRIEYIPYERTITEYEVEVRRQVQVPITKQVTDYYAVQYD

EPI4 -----ETQQGQLVKGQSRIEYIPYERTITEYEEVRRQVQVPITKQITDYYAVQYD
EPI40 -----PQEGNVVKGQSRIEYIPYERTITEYEEVRRQVQVPITKQVTDYYAVQYD
EPI8 -----HVLTEQAIKGESRIEYVPYERVITEYEEVRRQVQVPITRQITDYYAVQYE
EPI9 -----QLMTEQAIKGESRIEYVPFERVITEYEEVRRQVQVPVTRQITDYYAVQYE
EPI10 -----NAIKGESRIEYVPYTKEVTEYVMQEVVEYVPRERKITDYYAVEYV
EPI11 -----NAIKGESRIEYIPYTKEVTEYVTQEVVEYVPRERKITDYYAVEYV
EPI39 -----NVIKGESRIEYIPYTKEVTEYVTQEVVEYVPRERKITDYYAVEYV
EPI24 -----VVAAPQQAPIKGESRVEYREFQRPVEMETETIQVQVPKTKYVTDYYPVEYQ
EPI25 -----VVAAPQQAPIKGESRVEYREFQRPVEMETETIQVQVPKTKYVTDYYPVEYQ
EPI7 -----VVAQPQQAPIKGESRVEYREYQRPVEMETETVQVQVPKTKYVTDYYPVEYQ
EPI26 -----QPVVAAQPAIKGESRVEYREYQRPVVEYETETIEVKKPVTKYVTDYYPVEYQ
EPI27 -----QPVVAAQPAIKGESRVEYREYQRPVVEYETETIEVKKPVTKYVTDYYPVEYQ
EPI14 -----PAYSPIRGESRVEYVPYQKPVVELEEEVVRTVQVPRQKWVTDYYPVEYQ
EPI15 -----SYAPPAYSPVGGSRVEYVPYQKPVVELEEEVVRTVQVPRQKWVTDYYPVEYQ
EPI30 -----SYAAPQYSPIRGESRVEYVPYQKPVVELEEEVRTFQVQKQKWVTDYYPVEYQ
EPI31 -----SYAAPQYSPIRGESRVEYVPYQKPVVELEEEVVRTVQVPRQKWVTDYYPVEYQ
EPI16 -----APATIKGESRYEYVPYQKSVVEIEEEQR--VVPKQKWVTDYYPVEYQ
EPI17 -----APATIKGESRYEYVPYQKSVVEMEEQR--IVPKQKWVTDYYPVEYQ
: * * * * : : : * * : * * . : * *

EPI1 TEYVPQVFQEKFTYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQQQVQ-----
EPI2 TEYVPQVFQEKFTYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQQQVQ-----
EPI18 TEYVPQVFQEKFTYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQQ-----
EPI19 TEYVPQVYQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQQ-----
EPI20 TEYVPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQP-----
EPI21 TEYVPQVFQEKFTYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQQ-----
EPI5 TEYIPQVFYDKVTEYVPVDRFQDRVEYYPVERQVVHQQQV-----
EPI6 TEYIPQVFYDKVTEYVPVDRFQDRVEYYPVERQVVHQQQV-----
EPI34 TDYIPQVFYDKVTEYVPVDRFQDRVEYYPVERQVVHQP-----
EPI35 TEYIPQVFYDKVTEYIPVDRFQDRVEYYPVERQVVHQP-----
EPI38 TEYVPQVFYDKVTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQP-----
EPI12 TEYIPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVH-----
EPI13 TEYIPQVFQEKFTYVPVDRYQERVEYYPVERQVVH-----
EPI28 TEYIPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVH-----
EPI29 TEYIPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVH-----
EPI32 TEYVPQVFQEKFTYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQQVQP-----
EPI33 TEYVPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQQVQP-----
EPI22 TEYIPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVH-----
EPI23 TEYVPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVH-----
EPI41 TEYVPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVH-----
EPI36 TEYVPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVH-----
EPI37 TEYIPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVH-----
EPI1tetra TEYLPQVYQDRYIEYIPTERIQERVEYQAIQKQIVHQPVQ-----
EPI2tetra TEYIPQVYQDRYIEYVPTERVQERVEYQAIQKQVVHQPQ-----
EPI3 IEYIPQVIQEKQVEYVPERVAERTEYTTVERQNVIQQPVGYSQSSQ---VQT--SYAPVQ
EPI4 IEYIPQVIQEKQIEYVPERVAERTEYTTVERQNVIQQPIGYQSQQ---VQTSATYTPVQ
EPI40 IEYIPQVIQEKQIEYVPERVAERTEYTTVEKQNVIQQPIGYQSQIQTN-----
EPI8 IEYIPQVIQEKQIEYVPERIQERTEYTTVQKQNILPAQ-----TN
EPI9 VEYIPQVIQEKQIEYVPERIQERTEYTTVQKQNILPAQP-----ALQPQT
EPI10 TEHIPQVIQEKYIEYVPVETIKERTEYQAVTKQSVIQAP-----
EPI11 TEHIPQVIQEKYIEYVPVETIKERTEYQAVTKQSVVQAP-----
EPI39 TEHIPQVIQEKYIEYVPVETIKERTEYQAVTRQSVIQQP-----
EPI24 TEYIPRTVYEQQTEYVPVTKTVPRVEYDAVEREVQR-----
EPI25 TEYIPRTVYEQQTEYVPVTKTVPRVEYDAVEREVQR-----
EPI7 TEYIPRTVYEQQTEYVPVTKTVPRVEYEAVEREVQR-----
EPI26 TDYIPRTVYETQTEYVPVQKTIPRVEYEAVEREVQR-----
EPI27 TDYIPRTVYETQTEYVPVQKTIPRVEYEAVEREVQR-----
EPI14 KEYIPQVSYEKQIDYVPVEKNVPRVDYLEYEREVR-----
EPI15 KEYIPQVSYEKQIDYVPVEKNVPRVDYLEYEREVR-----
EPI30 KEYVPQVSYEKQIDYVPVEKNVPRVDYLEYEREVR-----

EPI31 KEYVPQVSYEKQIDYVPVEKKNVPRVDYLEYEREVR-----
EPI16 KEYIPQVTYEKQVDYIPVEKTVPRVDYLEREVRRSSFVAP-----
EPI17 KEYVPQVTYEKQIDYVPVEKTVPRVDYLEREVRRSSFVAP-----
::*: . : :*: . * :*

EPI1 ---QVVAQPVQQVVTQSVVQPVQYAPQP--VQYAPQPVQYVQQPVQYAPQ-----
EPI2 ---QVVAQPVQQVVTQSVVQPVQYAPQP--VQYVQQPVQYAPQPVQYASQ-----
EPI18 -----VQPVQQVVAQPVVQQPVQYVQQPVQVQVQPVQVQVQQQPVYQQQ-----
EPI19 -----VQPVQQVVAQPVVQQPVQYVQQPVQVQVQPVQVQVQVY-----QQ-----
EPI20 -----AQQVQQVVAQPVVQQP-----VQVVQQPVQYVQQ-----
EPI21 -----VQPVVQQPVQVVQQPVSVVQQP-----VQYVQQPVVQQPVQYVQQ-----
EPI5 -----VAQPVVQPVVQSVVQQVQYVAP-----VPQYVAPVAQPYV-----
EPI6 -----VAQ-----PVVQSVVQQVQYVAP-----VPQYVSPVAQPYV-----
EPI34 -----VQQVVAQPVVQSVVQQVQYVAP-----VQSVVQPVYQ-----
EPI35 -----VQQVVAQPVVQSVVQQVQYVAP-----VQSVVQPVFQ-----
EPI38 -----QIQTVAAQPVVQ-----QSYVAQPVVVTQSY-----
EPI12 -----QQPTQYVQQAVSVVQQPVYVQQSVQYVP---QPVQYVQQ-----Q---
EPI13 -----QQPTQYVQQAVSVVQQPVYVQQSVQYVP---QPVQYVQQ-----Q---
EPI28 -----QQP-----AQAVSVVQQPVIQQSVQYVQ---QPVQYVQQPVQYVQQ-----
EPI29 -----QQPTQYVQQAVSVVQQPVIQQSVQYVQ---QPVQYVQQPVQYAQQPVQYVQQ---
EPI32 -QQVVQQPVQVVQQPVQVVQQPVYVQQPVYVQQ---PVQYVQQP-----
EPI33 -QQVVQQPVQVVQQPVQVVQQPVYVQQPVYVQQPVYVQQPVQYVQQP-----
EPI22 -QQVVQQPVVQQVVQQ-----PVVQQVVPQPVVQQVVQQPLSVVQP-----
EPI23 -QQVVQQPVVQQVVQQPVVQQVVQQPVVQQVVPQPVVQQVVQQPLSVVQP-----
EPI41 -QQVVQQPVVQQVVQQPVVQQVVQQPVVQQVQTVAPQPVVQQFVQQPVSVIQP-----
EPI36 -QQVAQQPVQVVQQPVQVVQQ-----PVQYVQQP-----
EPI37 -QQVAQQPVQVAQQPIQVVQQPVQMYQQQVQVVQQPIQVVQQPGQVYQQP-----
EPI1tetra -----QQQQVLQTVVQPATTYQLSSQVTVPVVQQQFVPTA-----
EPI2tetra -----EVSQVYVSQVP-----VSSVSQVPVAQQQLTS-----
EPI3 TQQFTQQYTQYVPPQQTIAQQPVQIQQQYQTREVIHQPIVQQSYLQQREVIPQQQV---
EPI4 TQLLSQQYAQYVQPQQTLAYQQPVQVQQQYQTREVIQQPIAQQSYVQQREVVPQQ-----
EPI40 -YIPEQFQYNQIIERQSALAYQPYQQQTQIQTTREVTQYVPAQQQQYIQQLPVQQS-----
EPI8 LAQSQTIQTRVQQQIVTQQAQQYVTVAAQQPQVTTYQAPPQTTQVLPQPPVQQPITSTF
EPI9 LAQSQTIQTRVQQQIVTQQPQQYLTIAQQPQVTTYQAPPVQTTTVIPQPPVQQPITSTF
EPI10 ---VDYQQIQTTQQYQVAAPIQYAQTYTQPIQYAQTTVQPVQYAQATT-----
EPI11 ---IDYQQIQKTQQYQVAAPIQYAQTYTQPIQYAQTTVQPIQYAQTTT-----
EPI39 ---IDYQQIQTTQQYQVPAQIQYATTTTTNQYIPATQNQFNTVPVTTT-----
EPI24 ---VQYQPVQTVPVQPVVQSVYVQPVQSVYVQPVQPLTYSVARPIAQAPVY-----
EPI25 ---VQYQPVQTVPVQPVVQS-----IVQPVQPLTYSVARPIAQAPVY-----
EPI7 ---AQPVVVQQPVVQSVVQQP-----VVQQPLSYSLVR---PAPTY-----
EPI26 ---VPAAPVQYAPAPLTY-----VVQPVQSVVTQ-----
EPI27 ---VPAAPVQYAPAPVQYAPA-----PLTYSVVQPVQVVTQ-----
EPI14 ---RAPPAPVSYASPLSYSAAPVAPVVPVAPVAPLRTSYVAPTYGYG-----
EPI15 ---RAPPAPVSYASPLSYSAAPVAPL-----TSYVAPTYGY-----
EPI30 ---RAPPAPVSYASPLSYVAPVAPL-----TSVAPTYNYGY-----
EPI31 ---RAPPAPVSYASPLSYVAPVAPV-----TSVAPTYGYGY-----
EPI16 ---INTAQPINYVSPLSYSVAAPIAPVT-----TSYVAP-----
EPI17 ---INTAPPPIHYASPLSYVAAPIAPVT-----TSYVAP-----

EPI1 -----PVQYAPAPLQQTSYVPAPVAS
EPI2 -----PVQYAPAPLQQTTYVPAPVAS
EPI18 -----PVYQQPLVQSIPVQTVRP---
EPI19 -----PIVQQPLVQSIPVQTVRPPVG
EPI20 -----PVVQQPLVQSIPVQTVRPP--
EPI21 -----PVVQQPLVQSIPVQTVRPP--
EPI5 -----AQSIVQPSYVQPSYVPSRVAP
EPI6 -----AQSIVQP-----SYVPSRVAP
EPI34 -----QPQISYAPYVQPNFAPSRIAP
EPI35 -----QPQFQYAPYVQPNFAPSRIAP

EPI38 -----VAQPVVQQSYVTQTPVVSQP
 EPI12 -----PVQYVQQPLIASRMVPQFAQP
 EPI13 -----PVQYVQQPLIASRMAPQFAQP
 EPI28 -----PLIASRVVPQFVQP
 EPI29 -----PVQYAQQPLIASRVVPQFVQP
 EPI32 -----VTYAQPLVASRVVPQGFAP
 EPI33 -----VTYAQPLVASRVVPQGFAP
 EPI22 -----VQTVPVTYAPQYAAP
 EPI23 -----VQTVPVTYAPQYAAP
 EPI41 -----VQTYPVQYA---AP
 EPI36 -----VQAVPVTYAPQYASP
 EPI37 -----VQTVPLAYGQQYASP
 EPI1tetra -----SVVHTTIPATQVVQGATHVVQG
 EPI2tetra -----SQVHVLPTQTVISGGQQVAYQ
 EPI3 -----QVQQSVALQPTIPTTQYLPQQQYQTQP-----QLQIAQTVPLNYGQQIQTI
 EPI4 -----QIQQSVALQPTLPTTQYVPQQQYQTIQNTQTVQPQLQIAQTVPLNYGQSIQAQ
 EPI40 -----VPLPAPQAQYLPQYQYASPIGIIQQPQYQIQQTVPLNYGQQFQAS
 EPI8 IQPPIITTLQRPNVQNTIIPQTQLASTYVQQQPTIIPGQVQSIPQTIQTTSVVPQTIQT
 EPI9 IQPPIITTTIQAPTIVVQNTIMPQTQYTSAYVQQPPAVVTTQLQSVPTIQTTSVVPQTIQT
 EPI10 -----QFVPTTQSQYVTAPVTTSSQYVPPYST
 EPI11 -----QFVPTTQSQYVSAPVTTSSQFVSQPYPT
 EPI39 -----QYIP-QQISYGQLPTAAYGQLPATTTT
 EPI24 -----
 EPI25 -----
 EPI7 -----
 EPI26 -----
 EPI27 -----
 EPI14 -----
 EPI15 -----
 EPI30 -----
 EPI31 -----
 EPI16 -----
 EPI17 -----

EPI1 -L-----PLAQTQIPTRTVPQARPQQ-----PLDRTQAQ
 EPI2 -L-----PLAQTQVPTRTVPQARPQQ-----PLDRTQAQ
 EPI18 PV-----YGPATTLPLGQTVSPRPLG-----TTVPAKPL
 EPI19 PV-----YAPTTTLPLGQTVSPRHPG-----APVTAKPL
 EPI20 -----VYAPGSLPLGQTVSPRLP-----PQAQTKPQ
 EPI21 -----VYAPGSLPLGQTVSPRLP-----PQAQTKPT
 EPI5 VY-----NHAPYQG-RPVSQPRRFS-----P
 EPI6 VY-----NHAPYQG-RPVSQPRRFS-----P
 EPI34 VS-----YAPPLSYGAPVSHPRRYVN-----HIVINQSP
 EPI35 VS-----YAPPLSYGHPVSHPRRHVN-----SYVNHQSP
 EPI38 IQ-----YAQYPQYAQPATQTIYGPP-----VPIGNPPI
 EPI12 LQ-----QYPPAPVARPQQPSQQPPQ-----SHQQ
 EPI13 LQ-----QYPPAPVARHQPSQQPPQ-----SHQPSHQ
 EPI28 QY-----AAPPVVRPS-----QP
 EPI29 QY-----AAPVARTS-----QP
 EPI32 TY-----APSYVQQFQP-----QQ
 EPI33 TY-----APQYAQQYQP-----QQ
 EPI22 IV-----SSRVIPSYPQYP-----S
 EPI23 IV-----SSRVIPSYPQYP-----S
 EPI41 IV-----SSRVIPSYPQYP-----Q
 EPI36 II-----SSRVIPAYQP-----
 EPI37 II-----SSRLIPGYQP-----
 EPI1tetra AS-----TVVQNVPQAQFVQTVPTAFST-----QTLGVPVVR
 EPI2tetra NQ-----SFAYAPVQQSVVYTTT-----AQLGQSVYR
 EPI3 QTQ-----QQPIVNPAQTPTTQINQGYISIPVTQT-----QAPQYSVYGQQSLGPPQPK

EPI4 QPVNPAIQTNAPVNOGYSIPATQVNOGYSIPATQVNOGYSIPSTQQPVYGGQSLGPPQPK
EPI40 QIQP-----APKQPIATATVPQGYQIPTQTVP-----QQYINQQVEQDPTIHSKR
EPI8 G-----SVIPQTRTLKPPPTTIIQPQATIPQASIPLATTTALPVQLAQTAVPSSVYKD
EPI9 TNVFPQTASVIPQTRTLTKPPPTTIVQPQASVPLATT---TVLPPQLAQTTTGIPSSYKD
EPI10 TT-----YGAPITTYGQVPQNOGYLPATAYAQP-----VGQVTTT
EPI11 TT-----YGAPITNYGQLTQNTAYLPAATYAQPG-----IGQVTTT
EPI39 YG-----QLPPQVNYGQLPVTTTTAPYGFPPPTTT-----AAYGQLPSNAYGQVTTT
EPI24 -----AQP
EPI25 -----AQP
EPI7 -----AAP
EPI26 -----PVA
EPI27 -----PVA
EPI14 -----AP
EPI15 -----AP
EPI30 -----YAP
EPI31 -----YAP
EPI16 -----
EPI17 -----

EPI1 NPRPNPQAPQQPQQKQKSFLDRLFDRD-----
EPI2 NPRPQP--AQQPQQKQKSFLDRLFDRD-----
EPI18 DKTQGPKQPAQQNKQKSFLDRLFDRD-----
EPI19 DKTQGNQPAQQNKPKSFLDRLFDRD-----
EPI20 AQLPQTK-QPQQQKTKSFLDRLFDRD-----
EPI21 GQPQAQQKQPQQQKPKSFLDRLFDRD-----
EPI5 PSKPVQIQK-QPQEKKKTFLNIFS-----
EPI6 PSKPVQIQK-QPQEKKKTFLNIFS-----
EPI34 PAKPQPAQKPQPQKEKKTFLDNIFS-----
EPI35 PAKPLPAQKPQPQKEKKSFLDNIFS-----
EPI38 PASQLPAAVKTGQFQQTPQK-----
EPI12 SHQPSHQPPQVPSQQPRSQPSQQQQSQQQ-----
EPI13 SHQPSHQPPQIQSQQPRSQPSQQQQSQQP-----
EPI28 QQQQSHQPPQVPSQQPRPQAVQQQQSQQQ-----
EPI29 QQQQSHQPPQVPSQQPRSQATQQQAQQQQ-----
EPI32 IPQQPKPQQQQQQAPRSNVGPQ-----
EPI33 IPQQPKAQQQQQ--APRSNVGQQ-----
EPI22 YPQYQQAPQQ-QAQPQQPPRSNLNVH-----
EPI23 YPQYQQAPQQHQAPQQPPRSNLNVH-----
EPI41 YPQYHPAPQQVQQQPPRSNLNNNI-----
EPI36 --QYQPAPQKVQPQAPPRSNLNNNI-----
EPI37 --QYLPAPQIVQPQVPPKYNLNSNI-----
EPI1tetra AGLTTSGVRTLGPVVPYSVVEEAIKKSQKKDE-----
EPI2tetra GPTVLTNSIAQKPVQQNAKKEEKTFLERIFE-----
EPI3 TQQPLAQTTQYNPQLQQTVAPAQFAQSVPQQQQQQQQQQQQSIPQDMGRTRPYQQGQLP
EPI4 TQQPLTQTTQYNPQLQQTVAPSQFAQSVPQQ-----QQQSIQDMGRTRPYQQAPLP
EPI40 PQQQLAQTAQYNPQLQQTVGPNQFAQSVPQQ-----QSLQQDLGRTRPYQQQQQP
EPI8 FQRLPAQGNSLYRKTLPPIQPGQLAQTAPPI-----QVPTQP
EPI9 AQRLPVQGNSLYRKTLPPIQPGQLAQTAPPQ-----QIPTQP
EPI10 TKQYSTGWQQVYPASTGNVQPQLQQQQLG-----QLQKPG
EPI11 TQQYSTGWQQVYPASTGNFQPQLQQQQVG-----QLQIQG
EPI39 TQQYSTGWQQVYPSAAGNVQQPQFQQQQPQQ-----ANQRPG
EPI24 VVAPALTYSGVRPAYAPVYPSYPQVGARPPQQAQQPVPSNKPQ-----
EPI25 VVAPALTFSGVRPAYAPVYPSYPPVGARTQQPQQPVPSNKPQ-----
EPI7 VAYSSVAPVGAYPSYGGYRYP-----
EPI26 QYTTPLTYSTVRPAYG--YPPYY-----
EPI27 SYGTPLTYSTVRPAYGGYPPYY-----
EPI14 SYSYVAPTFGYGSVYRY-----
EPI15 NYSYVAPTFGYGSVYRY-----
EPI30 TYSYAAPTTFGYGSVYRY-----

EPI31 TYSYAAPTFGYGSVYRY-----
 EPI16 -----AYSTVYRY-----
 EPI17 -----AYSTVYRY-----

EPI1 -----
 EPI2 -----
 EPI18 -----
 EPI19 -----
 EPI20 -----
 EPI21 -----
 EPI5 -----
 EPI6 -----
 EPI34 -----
 EPI35 -----
 EPI38 -----
 EPI12 -----
 EPI13 -----
 EPI28 -----
 EPI29 -----
 EPI32 -----
 EPI33 -----
 EPI22 -----
 EPI23 -----
 EPI41 -----
 EPI36 -----
 EPI37 -----
 EPI1tetra -----
 EPI2tetra -----
 EPI3 QQPSQ---PQQAGTAQKQNKESFLEKLF
 EPI4 QQPSQ---PQQAGTAQKSNKESFLEKLF
 EPI40 QPQQQLPQQQGVQKPNKESFLEKLF
 EPI8 QQPQQA-----KQDKDTFLERLFE
 EPI9 QLPQQA-----KPDKDTFLERLFE
 EPI10 QSPKYA-----
 EPI11 QSPKYA-----
 EPI39 QSPKYQ-----
 EPI24 -----
 EPI25 -----
 EPI7 -----
 EPI26 -----
 EPI27 -----
 EPI14 -----
 EPI15 -----
 EPI30 -----
 EPI31 -----
 EPI16 -----
 EPI17 -----

PARTIE II

The membrane skeleton in *Paramecium*: a functional analysis by RNAi of epiplasmins

Title: The membrane skeleton in *Paramecium*: a functional analysis by RNAi of epiplasmins

Authors: Sébastien Pomel and Bernard Viguès*

Address: Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177, Aubière cedex, France

Running header title : RNAi of epiplasmins

Corresponding author: Bernard Viguès: Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177, Aubière cedex, France.

E-mail address:

Bernard.Vigues@univ-bpclermont.fr

Tel: (33)4-73-40-74-69

Fax: (33)4-73-40-76-70

Abstract

The membrane skeleton in *Paramecium* is essentially represented by epiplasmic scales organized around basal bodies and apposed beneath the cytoplasmic face of the inner alveolar membrane. This structure is composed of a complex set of proteins, named epiplasmins, which constitute a novel multigenic family (*EPI* genes) recently identified through our contribution to annotation of the macronuclear genome in *P. tetraurelia*. In the present study, we show that feeding-mediated RNAi of two *EPI* genes generates a severe phenotype characterized by repeated blockages of cytokinesis leading to monstrous organisms which are finally lysed after 72 h of RNAi induction. Down-regulation of *EPI* transcripts was evidenced by RT-PCR. Analysis of induced cells by fluorescence microscopy revealed their inability to form a division furrow. Epiplasmic scales, however could be found in induced cells, suggesting that several genes escaped the RNAi process. This possibility is discussed on the basis of a search of potential siRNA among members of the entire multigenic family.

Keywords: Membrane skeleton, epiplasmins, RNAi, morphogenesis, cytokinesis, *Paramecium*.

Introduction

Due to their asymmetrical and polarized cortical pattern, ciliated protozoans have long been known to provide interesting cell model systems for the analysis of molecular mechanisms involved in cellular morphogenesis. To date, studies performed on the membrane skeleton of ciliates have been mostly descriptive and were the experimental domain of microscopists and biochemists. A prominent example of a highly organized membrane skeleton is that of *Paramecium*, in which a network of sub-membranous filaments (the “outer lattice”) subdivides the cortex into hundreds of hexagonal cortical units, giving the cell surface a honeycomb aspect. Each unit is centered on a ciliary apparatus and encloses an alveolar sack interposed between the cell membrane, and a sub-alveolar cytoskeletal structure linked to the cytoplasmic face of the inner alveolar membrane. These structures, termed epiplasmic scales, sustain a three-layered membranous system (the two alveolar membranes plus the plasma membrane) within cortical units, and contact the outer lattice at the periphery of the units.

Interestingly, immunological probes revealed that the epiplasm and outer lattice are composed of distinctive protein components (Coffe et al. 1996; Nahon et al. 1993; Cohen et al. 1987; see also Cohen and Beisson, 1988). The two systems thus provide regular landmarks useful in the analysis, in space and time, of the reconstruction at each division of the *Paramecium* membrane skeleton and cell shape. Immunofluorescence microscopy revealed a remarkable developmental program in which the epiplasm and outer lattice elongate longitudinally by intussusceptive addition of material. The epiplasm then segments by intercalation between growing units of newly formed transverse partitions of the outer lattice (Iftode et al. 1989). Clearly, the data indicate that growth of *Paramecium* membrane skeleton is an extremely elaborate process requiring specific protein interactions and functions that may be of particular interest with respect to our understanding of cell morphogenesis in ciliated protozoans.

Since these pioneering studies, powerful reverse genetic techniques have emerged for functional analysis of genes in *Paramecium*. Function of *Paramecium* genes can be studied by microinjection in the macronucleus of high copy numbers of DNA coding sequence of a transgene (Vayssié et al. 2001; Beisson et al. 2001; Garreau de Loubresse et al. 2001; Ruiz et

al. 1999). In this case, both sense and anti-sense RNA are transcribed leading to degradation of endogenous mRNA (Ruiz et al. 1998; Galvani and Sperling, 2001). RNA interference (RNAi) is a process of gene silencing promoted by exogenous introduction of double stranded RNA (dsRNA) in the organism, as previously described in *C. elegans* by microinjection (Fire et al. 1998). In *C. elegans*, RNAi can also be induced by feeding the worms bacteria expressing dsRNA (Timmons and Fire, 1998; Timmons et al. 2001; Kamath et al. 2000). More recently, a feeding-mediated RNAi method has been developed with success in *Paramecium* (Galvani and Sperling, 2002). Phenotypes obtained through this approach are similar to those produced by microinjection (Dupuis-Williams et al. 2002). In many organisms, RNAi has proved useful in understanding pathways involving many proteins, providing important information on processes once difficult to study (Kawano et al. 2000; Li and Wang, 2002; Lin and Wang, 2004). Cortical morphogenesis in ciliates is a case in point, due to the remarkable protein complexity of epiplasmic scales confirmed by recent characterization of forty one paralogous genes (*EPI*) within the macronuclear genome of *P. tetraurelia* (Pomel et al. 2005).

This prompted us to use the feeding-mediated RNAi approach in a preliminary functional analysis of this new multigenic family in *Paramecium*. Two genes, *EPI-1* and *EPI-2*, were silenced; both cases yielded a severe phenotype characterized by repeated blockages of cytokinesis. Cells processed for RNAi of these genes have been analyzed by immunofluorescence using three distinct antibodies that visualize major cortico-skeletal structures including epiplasmic scales, the outer lattice and rows of basal bodies. As expected, morphogenetic defects are observed mainly in epiplasmic scales of the median region in induced cells. The results are discussed in relation to the complexity of the multigenic family and in view of the possibility of a redundant role of the different epiplasmin sub-families described in our previous paper (Pomel et al. 2005).

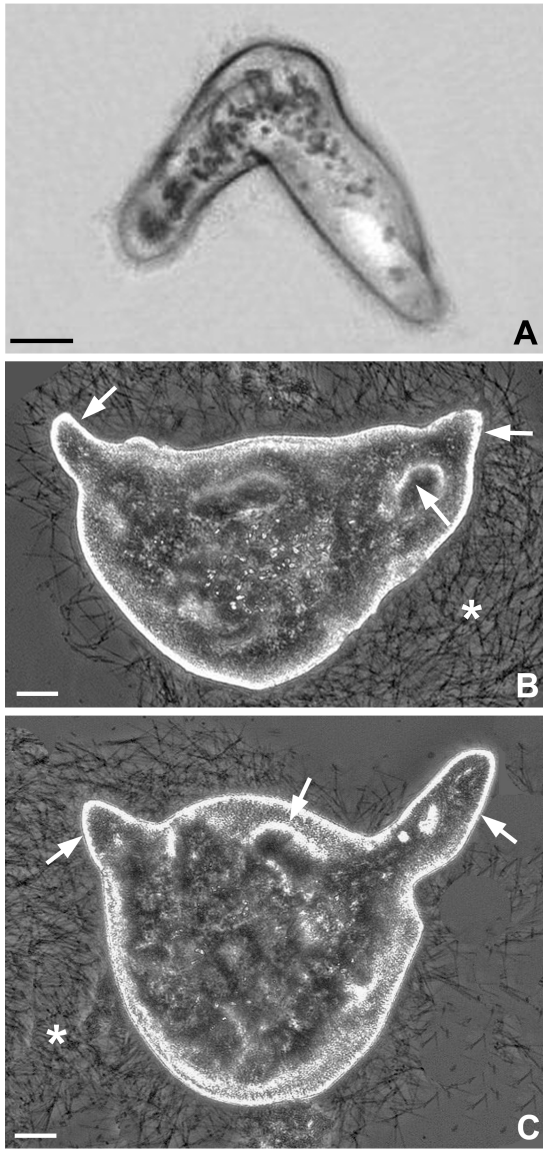


Figure 1. Phase contrast microscopy of phenotypes obtained after RNAi induction of *EPI-1* gene coding sequence. Cytokinesis is arrested in induced cells leading to boomerang phenotypes (A) then to monstrous (post-boomerang) organisms (B and C) obtained after 16 h and 40 h respectively. Protusions (arrows) projecting from the surface of these monstrous organisms are due to the elongation process that is repeated many times before cell lysis, which occurs 72 h after induction. Note that post-boomerang organisms conserved the ability to secrete trichocysts (*). Bars: 25 μ m.

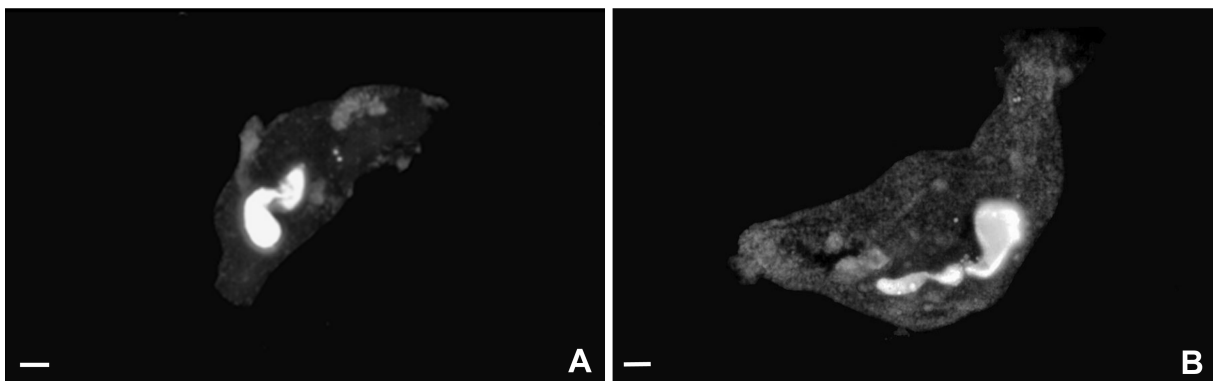


Figure 2. DAPI staining of a boomerang (A) and a post-boomerang phenotype (B). Both phenotypes are characterized by abnormal morphology and distribution of macronuclear material and anomalous morphology of their macronuclei. Bars: 25 μ m.

Results

Appearance of boomerang phenotypes correlates with a decrease of epiplasmins expression

In *Paramecium*, cell division is first observed as an elongation of the parental cell due to duplication of cortical units. Cortical elongation is necessary for the reproduction of identical surface architecture in the two future daughter cells. In normal cells (i.e. non-induced cells), cortical elongation proceeds along the longitudinal axis of the parental cell. As shown in Fig. 1A, the situation is different in induced cells where elongation of the proter and the opisthe proceeds along two axes which are oriented so as to give the parental cell a typical boomerang aspect. Compared to wild types, which display a rectilinear swim, boomerang cells swim circularly and have no avoidance strategy. The movie presented as supplementary data to this manuscript illustrates these changes in the behaviour of *Paramecia*. Clearly, the main characteristic of boomerang cells is the inability of "pre-made" daughter cells to undergo separation. Figures 1B and 1C show parental cells 48 h after RNAi induction. The monstrous organisms (post-boomerang cells) shown in these two pictures result from repeated abortions of cytokinesis. They systematically collapse 72 h after RNAi of epiplasmins. Figures 2A and 2B show fluorescence pictures obtained by DAPI staining of a boomerang (2A) and a post-boomerang (2B) cell. Macronuclei display abnormal shapes and tend to remain attached. This indicates that not only cytokinesis, but also karyokinesis is severely affected by RNAi of epiplasmins.

To demonstrate mRNA degradation after feeding with bacterial strains carrying *EPI-2* coding sequence, identical amounts of total RNA extracted from induced and non-induced cells were amplified by RT-PCR using *EPI-2* and α -tubulin specific primers (Fig. 3). The amount of *EPI-2* mRNA significantly decreased in induced cells (Fig. 3A). This was not the case for α -tubulin mRNA used as RT-PCR control experiments (Fig. 3B). This indicates that down-regulation of *EPI-2* mRNA was not attributable to an instability of total RNA samples. Specific *EPI-2* mRNA amplification was supported by NdeI digestion of these PCR products, which produced restriction fragments characteristic of the coding sequence: 740, 530, 310, 210 and 100 bp (data not shown).

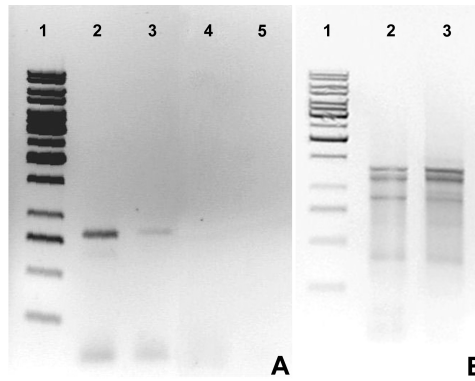


Figure 3. Down-regulation of *EPI-2* transcript after 24 h of RNAi induction. A) Amplification of *EPI-2* mRNA was carried out with (lanes 2 and 3) or without (lanes 4 and 5) retrotranscription on total RNA. Equal amounts of total RNA of wild type (lane 2 and 4) and induced cells (lanes 3 and 5) were loaded in each well. B) RT-PCR of α -tubulin transcripts was performed using total RNA from wild-type (lane 2) or induced cells (lane 3) to control their amount and their integrity. Lanes 1 : Molecular weights standards from Fermentas Inc. (Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder).

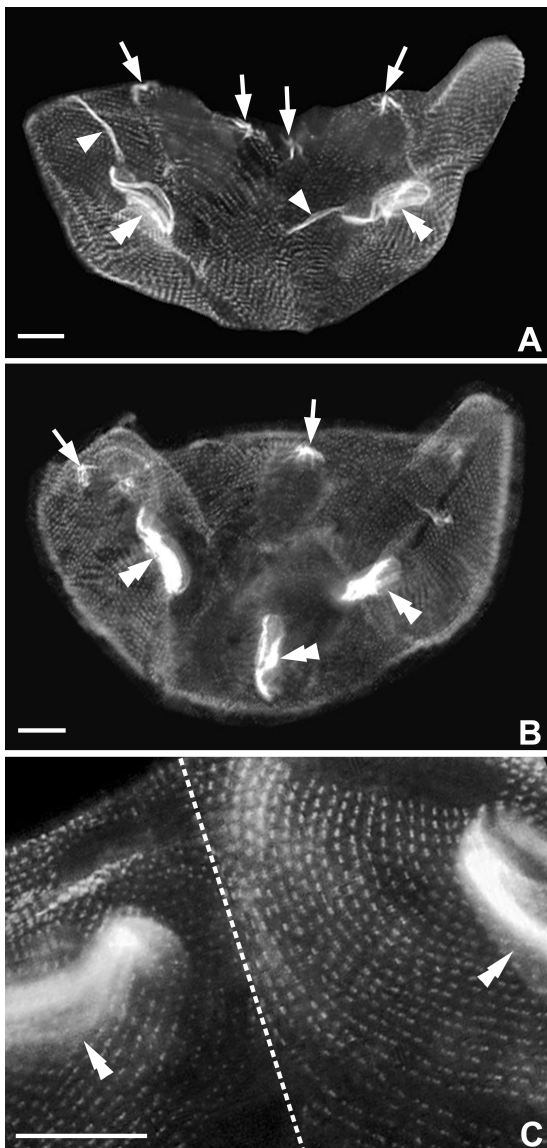


Figure 4. Immunofluorescence labelling of induced cells using 1D5 antibody. Silencing of *EPI-1* and/or *EPI-2* does not impair duplication of pulsatile vacuoles (arrows), basal bodies or oral apparatuses (double arrowheads) in boomerang (A) and post boomerang cells (B). Organization of rows of basal bodies is nonetheless affected in boomerang cells as shown at higher magnification (C). The folding region is visualized by the dashed line. Note that microtubules of post-oral fibers (simple arrowheads) are evident in boomerang cells but absent in more advanced stages of the phenotype. Bars: 15 μ m.

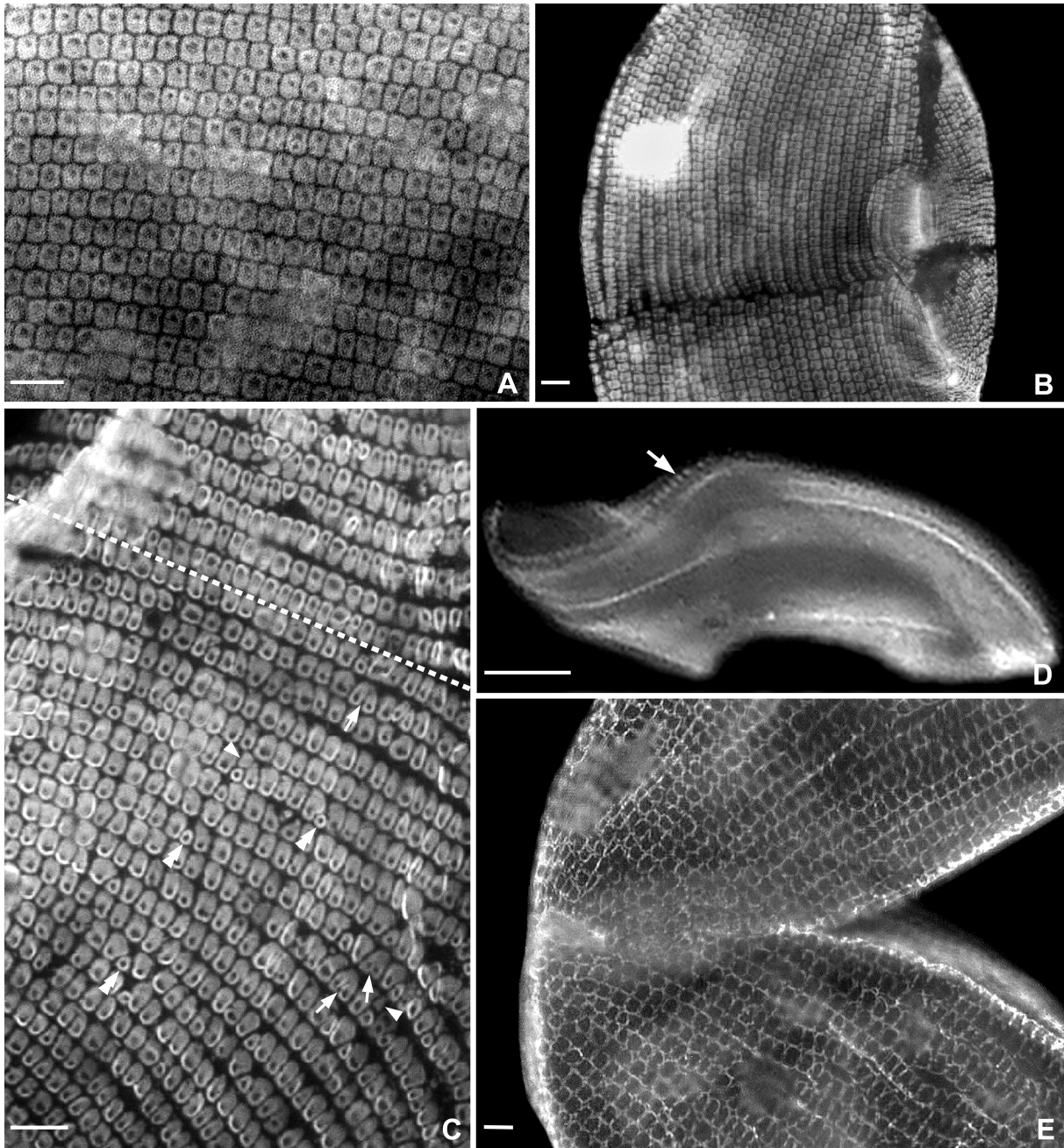


Figure 5. Immunofluorescence microscopy using mAb CTS-32 (A-D) and I3D3 (E). Note the homogeneity of epiplasmic scales in interphase wild type cells (A). A fission line is evident in the median zone of wild type cell in division (B). This line is absent from the folding region (dashed line) in boomerang cells (C). Note the inverted polarity of epiplasmic scales above and below the dashed line. Many scales are incompletely divided (arrows). Some display an abnormal size (double arrowheads) and some are devoid of their ciliary apparatus (simple arrowheads). CTS-32 also decorates oral structures, notably digitations (arrow) projecting from the transition zone between the cytostome and cytopharynx. The integrity of the outer lattice is preserved in boomerang cells, as visualized by I3D3 antibody (E). Note that these cells lack a cleavage furrow in the folding region. Bars: 5 μm in A-D and 2,5 μm in E.

Immunofluorescence labelling of boomerang and post-boomerang phenotypes

All microtubular structures recognized by mAb 1D5 i.e. basal bodies, and microtubules associated to the pulsatile vacuoles are duplicated in boomerang (Fig. 4A) and post-boomerang (Fig. 4B) cells. However, induced cells are affected in the patterning of rows of basal bodies, which extend parallel to each other in the folding region of boomerang cells (Fig. 4C). We also noted that microtubules of the post-oral fibers are evident in boomerang cells (Fig. 4A), but absent in more advanced stages of the phenotype (Fig. 4B).

As expected, mAb CTS-32 labels epiplasmic scales in interphasic and dividing wild type cells (Fig. 5A and 5B). Surprisingly, epiplasmic scales remain decorated by CTS-32 antibody after induction of RNAi. We note, however, that epiplasmic scales appear more condensed and display abnormal sizes and shapes in the folding region of boomerang cells (Fig. 5C). Similarly, and as judged by the localization of basal bodies, which appear negatively stained in Fig. 5A-C, we note an inverted polarity of epiplasmic scales, on either side of the folding line of boomerang cells. Furthermore, oral structures recognized by mAb CTS-32 in wild types are still recognized after induction (Fig. 5D; see also Pomel et al., 2005 for labelling of wild type cells). Fig. 5E shows the fluorescence pattern provided by antibody I3D3 in the folding region of boomerang cells. This antibody labels hexagonal meshes of the outer lattice (see Introduction). As for previous antibodies, i.e. mAb 1D5 (Fig. 4C), and mAb CTS-32 (Fig. 5C), this antibody reveals one of the main characteristics of boomerang cells: the absence of the fission line following induction of RNAi of epiplasmins.

Discussion

In this study, we show that RNAi of *EPI-1* and *EPI-2* genes leads to repeated cytokinesis blockages, probably because induced cells fail to develop a cleavage furrow at the time of cell division. A similar phenotype, characterized by cytokinesis impairment and abnormal division of the macronucleus, has been reported following treatment of *Paramecia* by 6-DMAP, an inhibitor of serine-threonine kinase activity (Kaczanowska et al. 1996). Phenotypes generated by 6-DMAP present additional abnormalities, such as deficiency in the gullet separation, probably due to the numerous phosphorylatable molecules targeted by this drug. With regard to the conservation of a potential serine-threonine kinase site in the central domain of all epiplasmins (Pomel et al. 2005), we postulate that these proteins are part of the many molecules affected by the drug. 6-DMAP also leads to cytokinesis deficiencies in *Tetrahymena* (Kaczanowska et al. 1999). In this ciliate, the thermosensitive mutant *cdaA1* gives rise to phenotypes either arrested prior to formation of the fission line or partially divided with a primitive unilateral furrow on the ventral side (Kaczanowska et al. 1992). In these phenotypes, the ventral side of the dividing cell tends to bulge but oral apparatuses can duplicate several times, with a rapid loss of functionality. The gene product of this mutant, named p85, appears in the presumptive division plane prior to the macronuclear division and persists in the contractile ring during cell division (Numata et al. 1995; Gonda et al. 1999). This indicates, first that specific cortical proteins (e.g. p85) are required for cell constriction in ciliates, and second, that mutation of a protein implied in the earliest stages of the division furrow formation in *Tetrahymena* may generate a phenotype similar to that obtained in *Paramecium* following down-regulation of epiplasmic proteins.

The significance of the boomerang phenotype with regard to epiplasmins localization and function remains unclear, unless we propose (which seems likely), that local disassembly of epiplasmic material is a prerequisite for ingression of the contractile ring. An inference from the present study that, like p85 in *Tetrahymena*, epiplasmins 1 and 2 are fission line-specific proteins would be inaccurate since GFP-tags performed in our previous paper localize these proteins in all epiplasmic scales, as well as in oral structures (Pomel et al. 2005). In our opinion, the appearance of the boomerang phenotype is probably due to the functional redundancy among the numerous epiplasmins identified in *Paramecium*. Our results indeed

revealed that epiplasmins 1 and 2 are dispensable for cortical elongation and stomatogenesis in parental cells. A corollary to this hypothesis is that several *EPI* genes have escaped the RNAi process. This raises the question of which genes have been really silenced in experiments reported in this paper.

It is now established that the minimal size of small interfering RNA (siRNA) is 22 nucleotides (nt). This is also the length of siRNA responsible for genome rearrangements in *Paramecium tetraurelia* (Garnier et al. 2004). Shared potential siRNA are particularly abundant in *EPI-1* and *EPI-2* sequences, which strongly suggests that both genes have been co-silenced following RNAi. Among the multigenic family, eight additional *EPI* genes (*EPI-5*, *EPI-12*, *EPI-19*, *EPI-20*, *EPI-21*, *EPI-22*, *EPI-23* and *EPI-32*) contain potential siRNA. The longest stretch in these genes is 32 bp long versus 95 bp within the pair *EPI-1/EPI-2* (Pomel et al. 2005). Furthermore, some epiplasmins contain potential siRNA, either in *EPI-1* (*EPI-19* and *EPI-32*) or *EPI-2* (*EPI-12* and *EPI-20*) sequences. Since identical phenotypes were obtained by RNAi of *EPI-1* or *EPI-2*, one might suppose that these genes (*EPI-19*, *EPI-32*, *EPI-12* and *EPI-20*) have a reduced contribution in the generation of the boomerang phenotype. Consequently, we would suggest that six genes, *EPI-1*, *EPI-2*, *EPI-5*, *EPI-21*, *EPI-22* and *EPI-23* are more serious candidates among *EPI* genes that have been targeted by the RNAi process. Moreover, potential siRNA found in *EPI-5*, *EPI-21*, *EPI-22* and *EPI-23* are mostly localized inside the highly conserved central domain containing the serine threonine phosphorylatable site found in a wide number of *Paramecium* epiplasmins. RNAi experiments performed using the *EPI-1* or *EPI-2* central domain showed that this conserved region is sufficient to generate boomerang cells (data not shown) but with a delay in phenotype appearance and a lower rate of affected cells (50-75% of induced cells versus 90-100% using entire coding sequences). This suggests that potential siRNA localized within the central domain influence the efficiency of the RNAi process. This is in agreement with a previous paper published by Ji et al. (2003) reporting that gene silencing can be enhanced by multiple siRNA specific to a unique gene sequence. The high percentage of homology between *EPI-1* and *EPI-2* favors a more efficient co-silencing of these two genes. Finally, our results suggest that the boomerang phenotypes obtained after feeding induction with the complete coding sequence of *EPI-1* and *EPI-2* is mostly attributable to the silencing of these two genes and, at a lower rate, of four additional genes (*EPI-5*, *EPI-21*, *EPI-22* and *EPI-23*). This probably means that several *EPI* mRNA escaped the RNAi process developed in this study. This is corroborated by the persistence of mAb CTS-32 staining in somatic and oral structures in

induced cells. On the basis of our previous study, it seems likely that co-silenced genes belong to groups I and II determined by phylogenetic analysis (Pomel et al. 2005).

In future studies, RNAi of as yet untargeted *EPI* genes (probably groups III and IV) would be of great interest to determine the functional specificities of epiplasmins in morphogenesis and cytokinesis and interdependence of these processes in *Paramecium* cell division.

Methods

1) Cell cultures

Wild type strain was *Paramecium tetraurelia* 8-2B. Cells were grown at 28°C in grass infusion medium WGP (Wheat Grass Powder, Pines International, Lawrence, KA), infected with *Klebsiella pneumoniae* the day before use and supplemented with 0,4 µg/ml β-sitosterol, according to Sonneborn (1970).

2) PCR and RT-PCR

EPI-1 and *EPI-2* coding sequences were cloned using PCR products obtained from 40p22 and 103h9 clones selected from a the macronuclear genomic DNA indexed bank (Keller and Cohen, 2000), kindly provided by Dr. J. Cohen (Centre de Genetique Moleculaire, Gif-sur-Yvette, France). 40p22 and 103h9 clones contain *EPI-1* and *EPI-2* sequences respectively, as previously described (Pomel et al. 2005). PCR experiments were performed using a mix (50 µl) containing 1 ng DNA, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 25 pmol of each primer and 1 U Taq polymerase (Eurobio). Primers used for *EPI-1* and *EPI-2* amplifications were Epipara S (sense): 5'-AATAAATCTAGAATGAGCAATATCCCACAATCA-3' and Epipara AS (antisense): 5'-TTATGAGGGCCCATCTCTATCAAAGAGTCTGTGTC-3'. The reaction started with one cycle of denaturation (94°C for 5 min), followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 30 s), annealing (64°C for 30 s) and extension (72°C for 1 min) and by a final extension at 72°C for 15 min.

RT-PCR were performed using a reverse transcription system kit according to the manufacturer's instructions (Promega, France). Primer sequences used for *EPI-2* and α-tubulin mRNA retro-transcription were 5'-TAAATAGGGCCCTACTTGAGTTCTGTCTAATGG-3' (Epipara 2) and 5'-ACCTTCTCCTTCTTCACCTTC-3' (α-tubAS) respectively. For cDNA amplification, primers were as follows: Epipara S (sense ; see above) and Epipara 1 (antisense): 5'-TCTGTCTCGGGCCCTTATTGGGGTCTAGCTTAAGG-3' for *EPI-2* and α-tubS (sense): 5'-

ATGAGAGAAGTCATTTCTATT-3' and α -tubAS (antisense; see above) for α -tubulin. Primers of α -tubulin, deduced from the α PT1 sequence previously determined (Dupuis-Williams et al. 1996), delimit its coding sequence. PCR conditions are identical to those described above except for the annealing step of α -tubulin amplification that was performed at 54°C.

3) DNA cloning and sequencing

Amplification products were cloned in the double T7-promoter feeding vector L4440 (Timmons and Fire, 1998), kindly provided by Dr. L. Timmons and Dr. A. Fire (Carnegie Institution of Washington, Baltimore, USA), which contains an ampicilline resistance gene. This plasmid was purified by lysis alkaline method (Sambrook et al. 1989) and transfected, with standard CaCl₂ methodology, in competent HT115 (DE3) bacteria designed for feeding-mediated RNAi experiments (Timmons et al. 2001). This *E. coli* strain was kindly provided by Dr. L. Timmons and Dr. A. Fire (Carnegie Institution of Washington, Baltimore, USA). This strain is RNase III-deficient and includes an Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) inducible T7 polymerase gene (Dasgupta et al. 1998; Timmons et al. 2001). The HT115 genotype is as follows: (*F*⁻, *mcrA*, *mcrB*, *IN(rrnD-rrnE)*₁, *lambda*⁻, *rnc14::Tn*₁₀(*DE3 lysogen:lacUV*₅ promoter T7 polymerase)). Disruption of the RNase III gene is caused by the insertion of the Tn10 transposon which contains a tetracycline resistance gene. Positive clones were selected on LB medium (Luria-Bertani) containing 100 μ g/ml of ampicilline and 12,5 μ g/ml of tetracycline. Plasmid inserts were sequenced on both strands using Epipara S and Epipara AS primers, and the CEQ – DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter, France).

4) Feeding-mediated RNAi

Feeding experiments were performed as described by Galvani and Sperling (2002). Briefly, HT115 pre-cultures, carrying the L4440-epiplasmin feeding vector, were grown in LB containing 100 μ g/ml of ampicillin until OD₆₀₀=0,4. Expression of dsRNA was induced by addition of 0,4 mM of IPTG in cultures which were incubated at 37°C for 3 h, centrifuged at 1600 g for 10 min, and re-suspended in WGP medium supplemented (dilution 1/10) with 100 μ g/ml of ampicillin and 0,5 mM of IPTG where 1 to 10 *Paramecia*/ml were added. Phenotypes were screened after 16 – 72 h of feeding. Several negative controls were done by

feeding *Paramecia* on three types of strains: (1) HT115 carrying no plasmid, (2) HT115 carrying the L4440 plasmid without insert, (3) HT115 carrying the same construction of the experiment but without IPTG induction. For each control, cells were grown no alteration of their growth rate or morphology.

5) Antibodies

Monoclonal antibodies (mAb) I3D3 (dilution 1/10), and CTS 32 (dilution 1/20) were kindly provided by Dr. A. Fleury-Aubusson (Université Paris XI, Paris, France). They were raised against *Paramecium* cortical preparations treated by the non-ionic detergent Triton X-100. The mAb 1D5 (dilution 1/10), kindly provided by Dr. P. Dupuis-Williams (Université Paris XI, Paris, France), was raised against the 14 COOH-terminal amino acids of detyrosinated pig brain tubulin (Wehland et al. 1984). The properties of mAbs I3D3, CTS-32 and 1D5 have been reported elsewhere (Jeanmaire-Wolf et al. 1993; Nahon et al. 1993; Dupuis-Williams et al. 1996). Anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies conjugated with fluorescein 5(6)-isothiocyanate (FITC) or alkaline phosphatase (AP) were from Sigma and used at dilutions 1/100 and 1/7500 respectively according to the manufacturer's instructions.

6) Microscopy

Phase contrast images of boomerang cells were obtained using an Axioplan 2 imaging pol microscope equipped with a Zeiss Axiocam HR camera. Post-boomerang phenotypes were observed using a DMCR epifluorescence Leica microscope equipped with a CoHU high performance CCD camera. For immunofluorescence, cells were permeabilized for 1 min using 1% Triton X-100 in PHEM buffer (Pipes 60 mM, Hepes 25 mM pH 6,9, EGTA 10 mM, MgCl₂ 2 mM), fixed with 2% formaldehyde and loaded on histological glass slides pre-coated with poly-L-lysine (Sigma). Slides were washed in PBS (Phosphate Buffer Saline: 0,15 M NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,2) and incubated for 15 min in PBS containing 3% BSA to prevent non-specific binding of antibodies. Primary antibody was applied for 1 h in PBS containing 0,3% BSA (PBSB). Slides were then washed in PBS and treated for one hour with the secondary antibody in PBSB. After three successive washes in PBS, slides were mounted in 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane medium (DABCO; Sigma)

supplemented with 55 ng/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) and observed using the Leica microscope used for phased contract microscopy (see above).

7) RNA extraction

Total RNA was extracted according to the method of Chomczynski and Sacchi (1987) except that cells were lysed by vortexing in the presence of glass beads. RNA extracts were treated by 0,1U/ μ l RNase-free DNase (Promega, France) for 30 min at 37°C. After a phenol / chloroform purification and precipitation in 2 volumes of ethanol 100°, 1/10 volume of sodium acetate 3M, total RNA was recovered by centrifugation in DEPC-H₂O (diethyl pyrocarbonate-H₂O).

Aknowledgements

We are indebted to Dr. C. Thompson-Coffe and Dr. G. Coffe for critical reading and correction of the manuscript and J. L. Vincenot for artistic work. For generous gifts, we are very grateful to Drs. L. Timmons and A. Fire for the L4440 vector and the HT115 (DE3) *E. coli* strain used for feeding experiments, Dr. P. Dupuis-Williams for providing the mAb 1D5 and Dr. A. Fleury-Aubusson for providing the I3D3 and CTS-32 monoclonal antibodies. This work was supported by CNRS (UMR 6023) and by a grant from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (to S. P.).

References

- Beisson J, Clérot JC, Fleury-Aubusson A, Garreau de Loubresse N, Ruiz F and Klotz C** (2001) Basal body-associated nucleation center for the centrin-based cortical cytoskeletal network in *Paramecium*. *Protist* **152**: 339-354
- Chomczynski P and Sacchi N** (1987) Single-step method isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159
- Coffe G, Le Caer JP, Lima O and Adoutte A** (1996) Purification, in vitro reassembly, and preliminary sequence analysis of epiplasmins, the major constituent of the membrane skeleton of *Paramecium*. *Cell Motil Cytoskeleton* **34**: 137-151
- Cohen J, Garreau de Loubresse N, Klotz C, Ruiz F, Bordes N, Sandoz D, Bornens M and Beisson J** (1987) Organization and dynamics of a cortical fibrous network of *Paramecium*: the outer lattice. *Cell Motil Cytoskeleton* **7**: 315-324
- Cohen J. and Beisson J.** (1988). The cytoskeleton. In Görtz HD (ed) *Paramecium*. Springer Verlag, Berlin, pp 363-392
- Dasgupta S, Fernandez S, Kameyama L, Inada T, Nakamura Y, Pappas A and Court DL** (1998) Genetic uncoupling of the dsRNA-binding and RNA cleavage activities of the *Escherichia coli* endoribonuclease RNase III – the effect of dsRNA binding on gene expression. *Mol Microbiol* **28**: 629-640
- Dupuis-Williams P, Klotz C, Mazarguil H and Beisson J** (1996) The tubulin gene family of *Paramecium*: characterization and expression of the α PT1 and α PT2 genes which code for α -tubulins with unusual C-terminal amino acids, GLY and ALA. *Biol Cell* **87**: 83-93
- Dupuis-Williams P, Fleury-Aubusson A, Garreau de Loubresse N, Geoffroy H, Vayssié L, Galvani A, Espigat A and Rossier J** (2002) Functional role of ϵ -tubulin in the assembly of the centriolar microtubule scaffold. *J Cell Biol* **158**: 1183-1193
- Fire A, Xu S, Montgomery SK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811
- Galvani A and Sperling L** (2001) Transgene-mediated post-transcriptional gene silencing is inhibited by 3' non-coding sequences in *Paramecium*. *Nucleic Acids Res* **29**: 4387-4394
- Galvani A and Sperling L** (2002) RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet* **18**: 11-12

- Garnier O, Serrano V, Duharcourt S and Meyer E** (2004) RNA-mediated programming of developmental genome rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. *Mol Cell Biol* **24**: 7370-7379
- Garreau de Loubresse N, Ruiz F, Beisson J and Klotz C** (2001) Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of *Paramecium* basal bodies. *BMC Cell Biol* **2**: 4
- Gonda K, Katoh M, Hanyu K, Watanabe Y and Numata O** (1999) Ca²⁺/calmodulin and p85 cooperatively regulate an initiation of cytokinesis in *Tetrahymena*. *J Cell Sci* **112**: 3619-3626
- Iftode F, Cohen J, Ruiz F, Torres Rueda A, Chen-Shan L, Adoutte A and Beisson J** (1989) Development of surface pattern during division in *Paramecium*. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structures in the wild type. *Development* **105**: 191-211
- Iftode F, Fleury A and Adoutte A** (1997) Development of surface pattern during division in *Paramecium*. III. Study of stomatogenesis in the wild type using antitubulin antibodies and confocal microscopy. *Eur J Protistol* **33**: 145-167
- Jeanmaire-Wolf R, Clérot JC, Nahon P, Iftode F, Fleury A and Adoutte A** (1993) Isolation and characterization of monoclonal antibodies to cytoskeletal and membrane proteins of *Paramecium* cortex. *Eur J Protistol* **29**: 311-333
- Ji J, Werni M, Klimkait T and Erb P** (2003) Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett* **552**: 247-252
- Kaczanowska J, Buzanska L and Frontczak M** (1992) The influence of fission line expression on the number and positioning of oral primordia in the *cdaA1* mutant of *Tetrahymena thermophila*. *Dev Genet* **13**: 216-222
- Kaczanowska J, Iftode F, Coffe G, Prajer M, Kosciuszko H and Adoutte A** (1996) The protein kinase inhibitor 6-dimethylaminopurine does not inhibit micronuclear mitosis, but impairs the rearrangement of cytoplasmic MTOCs and execution of cytokinesis in the ciliate *Paramecium* during transition to interphase. *Eur J Protistol* **32**: 2-17
- Kaczanowska J, Joachimiak E, Buzanska L, Krawczynska W, Wheatley DN and Kaczanowski A** (1999) Molecular subdivision of the cortex of dividing *Tetrahymena* is coupled with the formation of the fission zone. *Dev Biol* **212**: 150-164
- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG and Ahringer J** (2000) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* **2**: research/0002.1-research/0002.10

- Kawano T, Fujita M and Sakamoto H** (2000) Unique and redundant functions of SR proteins, a conserved family of splicing factors, in *Caenorhabditis elegans* development. *Mech Dev* **95**: 67-76
- Keller AM and Cohen J** (2000) An indexed genomic library for *Paramecium* complementation cloning. *J Eukaryot Microbiol* **47**: 1-6
- Li Z and Wang CC** (2002) Functional characterization of the 11 non-ATPase subunit proteins in the trypanosome 19 S proteasomal regulatory complex. *J Biol Chem* **277**: 42686-42693
- Lin R and Wang H** (2004) *Arabidopsis* FHY3/FAR1 gene family and distinct roles of its members in light control of *Arabidopsis* development. *Plant Physiol* **136**: 4010-4022
- Nahon P, Coffe G, Le Guyader H, Darmanaden-Delorme J, Jeanmaire-Wolf R, Clérot JC and Adoutte A** (1993) Identification of epiplasmins, a new set of cortical proteins of the membrane cytoskeleton in *Paramecium*. *J Cell Sci* **104**: 975-990
- Numata O, Suzuki H, Ohba H and Watanabe Y** (1995) The mutant gene product of a *Tetrahymena* cell-division-arrest mutant *cdaA* is localized in the accessory structure of specialized basal body close to the division furrow. *Zoolog Sci* **12**: 133-135
- Pomel S, Diogon M, Bouchard P, Pradel L, Ravet V, Coffe G and Viguès B** (2005) The membrane skeleton in *Paramecium*: molecular characterization of a novel epiplasmin family and preliminary GFP expression results. *Protist*, in press
- Ruiz F, Vayssié L, Klotz C, Sperling L and Madeddu L** (1998) Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell* **9**: 931-943
- Ruiz F, Beisson J, Rossier J and Dupuis-Williams P** (1999) Basal body duplication in *Paramecium* requires γ -tubulin. *Curr Biol* **9**: 43-46
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sonneborn TM** (1970) Methods in *Paramecium* research. *Methods Cell Physiol* **4**: 241-339
- Timmons L and Fire A** (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**: 854
- Timmons L, Court DL and Fire A** (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**: 103-112
- Vayssié L, Garreau de Loubresse N and Sperling L** (2001) Growth and form of secretory granules involves stepwise assembly but not differential sorting of a family of secretory proteins in *Paramecium*. *J Cell Sci* **114**: 875-886

Wehland J, Schröder HC and Weber K (1984) Amino acid sequence requirements in the epitope recognized by the α -tubulin-specific rat monoclonal antibody YL 1/2. *EMBO J* **3**: 1295-1300

PARTIE III

**Production d'un nouvel anticorps dirigé
contre les épiplasmines de paramécie :
application à l'étude des phénotypes
boomerang et pré-boomerang**

Titre : Production d'un nouvel anticorps dirigé contre les épiplasmines de paramécie : application à l'étude des phénotypes boomerang et pré-boomerang.

Auteurs : Sébastien Pomel, Philippe Bouchard, Viviane Ravet, Christine Henou et Bernard Viguès.

Abstract

Un nouvel anticorps a été produit en immunisant des lapins au moyen de deux peptides de synthèse issus des séquences des deux gènes *EPI-1* et *EPI-2*. Cet anticorps marque les écailles épiplasmiques mais de façon beaucoup moins intense que l'anticorps CTS-32. En Western blot, il réagit avec plusieurs protéines qui semblent appartenir aux groupes I et II des épiplasmines. En accord avec cette hypothèse, le signal obtenu en immunofluorescence disparaît à un stade très précoce de l'apparition du phénotype boomerang induit par le RNAi des gènes codant pour les épiplasmines 1 et 2.

Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons observé que l'intensité du marquage procuré par l'anticorps CTS-32 reste pratiquement inchangée en dépit de certaines anomalies induites dans les écailles épiplasmiques (phénotypes boomerangs) suite au RNAi des séquences codantes des deux gènes *EPI-1* et/ou *EPI-2*. L'anticorps CTS-32 reconnaissant un très large spectre de constituants épiplasmiques chez la paramécie, il semblait intéressant de produire un nouvel anticorps plus discriminatif en terme d'immunodétection. Dans ce but, nous avons proposé à la société COVALAB de produire des anticorps polyclonaux dirigés contre deux peptides des épiplasmines 1 et 2. Nous présentons ici la caractérisation de ce nouvel anticorps, nommé AI. Sa spécificité a été analysée par Western blot et immunofluorescence et comparée à celle de l'anticorps monoclonal CTS-32. Lors de la production de cet anticorps, seules les séquences des épiplasmines 1 et 2 étaient connues. Depuis, 39 gènes homologues ont été identifiés dans le génome macronucléaire de la paramécie (Pomel et al., 2005). L'intérêt de ce nouvel anticorps en tant que marqueur morphogénétique suite au RNAi des épiplasmines et sa capacité discriminative au sein de la famille multigénique sont discutés.

Matériels et méthodes

Conditions de culture

La souche de *Paramecium tetraurelia* 8.2B est cultivée à 28°C dans le milieu WGP (Wheat Grass Powder, Pines International, Lawrence, KA),ensemencé la veille par la souche bactérienne *Klebsiella pneumoniae* et supplémenté de 0,4 µg/ml de β-sitostérol, d'après Sonneborn (1970).

Anticorps

L'anticorps polyclonal anti-peptides a été produit par la société Covalab après injections intradermiques et sous-cutanées, chez le lapin, des peptides de synthèse NH₂-EYVPVDRYQERVEYC-COOH (peptide 1) et NH₂-CVPQARPQQPLDRTQ-COOH (peptide 2) couplés à la protéine porteuse KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). L'antisérum a été purifié sur colonne d'affinité contenant les peptides 1 et 2 couplés à des billes de sépharose. L'anticorps anti-peptide purifié (AI) a été utilisé à la dilution de 1/500 en western blot, et de 1/100 en simple et double marquage en immunofluorescence. L'anticorps CTS-32 qui nous a été gracieusement fourni par A. Fleury-Aubusson (Université Paris XI, Orsay, France) est un anticorps monoclonal dirigé contre les protéines épiplasmiques de *Paramecium* (Nahon et al., 1993). Cet anticorps est dilué au 1/20 en western blot et simple marquage en immunofluorescence et au 1/50 en double marquage en immunofluorescence. Les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés soit à la rhodamine soit à FITC (Fluorescein 5(6)-isothiocyanate) et anti-IgG de lapin couplés à FITC ont été utilisés au 1/200. Ils proviennent de la société Sigma. Les anticorps secondaires anti-IgG de lapin ou de souris couplés à la phosphatase alcaline (dilution 1/5000) ou à la peroxydase (dilution 1/5000) ont également été fournis par la société Sigma.

Extraction protéique et immunodétection par Western blot

Les extraits protéiques analysés ont été obtenus par la méthode préalablement décrite par Nahon et al. (1993) sans purification préalable des cortex sur gradient de Percoll. Les cellules sont suspendues dans un tampon Tris-maléate 200 mM, EDTA 30 mM pH 7,4 (tampon TME) et perméabilisées dans 5 volumes de TME contenant 1% de Triton X-100 en présence d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (PMSF ou Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride 1 mM, leupeptine 2 µg/ml, aprotinine 0,5 U/ml, pepstatine 5 µg/ml) pendant 15 à 30 min à 4°C puis centrifugées 15 min à 4500 g. Les protéines sont solubilisées dans le tampon de charge (Laemmli, 1970), séparées par SDS-PAGE 10% (acrylamide/bis-acrylamide 19/1) puis transférées sur membrane PVDF à 40 V pendant 3 h (Towbin et al., 1979). Les membranes sont saturées 1 h dans du Régilait dilué à 5% (p/v) dans le tampon PBST (0,15 M NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM NaH₂PO₄ pH 7,2, Tween 0,1%) puis incubées 1 h avec l'anticorps primaire dilué en PBST/Régilait 0,5%. Après trois lavages de 10 min en PBST/Régilait 0,5%, les membranes sont incubées 1 h avec l'anticorps secondaire dilué en PBST/Régilait 0,5%. Après trois lavages de 10 min en PBST puis en PBS, l'activité de la phosphatase alcaline est révélée dans un tampon Tris HCl 100mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM pH 9,5 (tampon phosphatase alcaline ou PAB) par l'addition successive de 33 µl de NBT (Nitroblue Tetrazolium, Sigma) à 50 mg/ml en diméthylformamide 70% et de 33 µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma) à 25 mg/ml en diméthylformamide 100% pour 5 ml de tampon PAB. La réaction est stoppée par un rinçage de la membrane à l'eau distillée. L'activité peroxydase est révélée par la méthode ECL (kit Amersham). Concernant le dot-blot, 10 µl des peptides de synthèse 1 et 2 solubilisés à 0,1 mg/ml en PBS ont été déposés sur membrane de nitrocellulose. Au contact de la membrane, ces peptides forment des spots de tailles différentes probablement en raison de leurs propriétés physico-chimiques distinctes affectant leurs interactions avec la surface de nitrocellulose.

Immunofluorescence et feeding

Les protocoles utilisés sont identiques à ceux décrits dans la partie précédente. Lors du double marquage, les deux anticorps primaires ou secondaires sont ajoutés simultanément dans le tampon PBS/BSA 0,3%. Les expériences de feeding ont été réalisées avec la souche bactérienne HT115 transformée par le vecteur L4440 contenant la séquence codante du gène *EPI-1*.

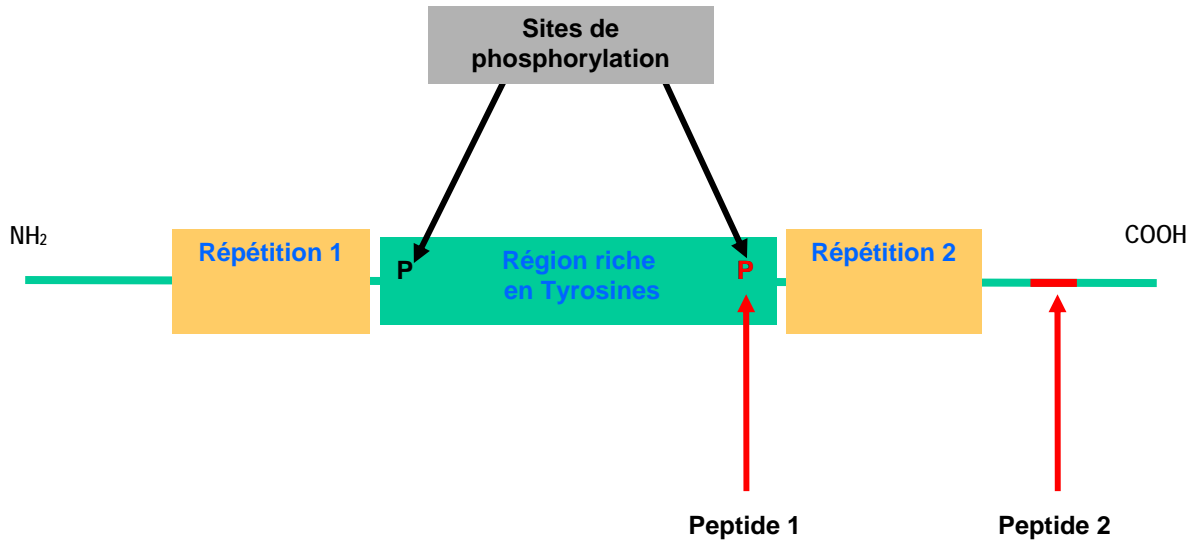


Figure 1 : Représentation schématique de la position des peptides 1 et 2 sélectionnés à partir des séquences des épiplasmines 1 et 2. Les peptides, notés en rouge, sont communs aux deux protéines. Les deux sites de phosphorylations situés aux deux extrémités du domaine central sont notés par la lettre P.

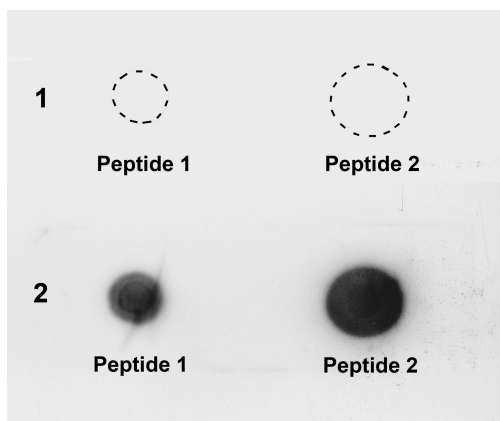


Figure 2 : Dot blot à partir de dépôts des deux peptides 1 et 2. Les membranes 1 et 2 ont été respectivement incubées avec les anticorps CTS-32 ou AI. Une quantité équivalente de peptides a été déposée au niveau de chaque spot. L'anticorps CTS-32 (membrane 1) ne reconnaît pas les peptides utilisés comme immunogènes utilisés pour générer l'immunosérum AI.

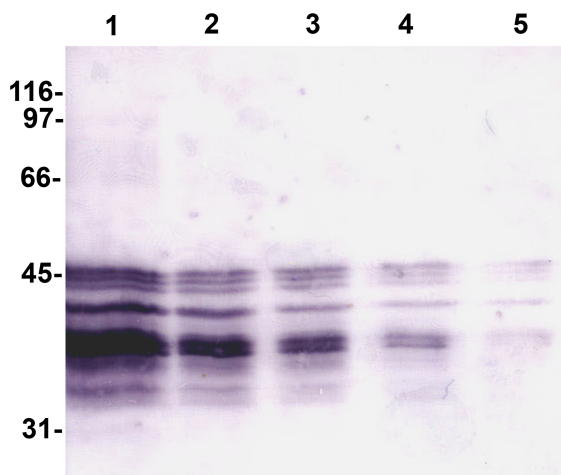


Figure 3 : Western blot révélant les protéines reconnues par l'anticorps AI. La quantité de protéines déposée est progressivement diluée de gauche à droite. Les dilutions progressent de 1/2 en 1/2 à partir de 1/1 (piste 1) jusqu'à 1/16 (piste 5).

Résultats

Spécificité des l'anticorps AI chez la souche sauvage de *P. tetraurelia*

Le figure 1 montre la localisation dans la séquence des épiplasmines 1 et 2 des deux peptides synthétiques utilisés comme immunogènes pour générer l'anticorps polyclonal AI. Nous avons comparé la spécificité de ce nouvel anticorps à celle de l'anticorps monoclonal CTS-32. En dot blot, les peptides 1 et 2 sont reconnus par l'anticorps AI (Fig. 2). Dans ces conditions, aucun signal n'est détecté avec l'anticorps CTS-32. En Western blot, l'anticorps AI reconnaît des bandes protéiques dont les PM entre 35 et 45 kDa sont compris dans la gamme de 30 à 50 kDa des épiplasmines (Fig. 3 piste 1). Parmi les bandes révélées par cet anticorps, les protéines de migration électrophorétique les plus rapides sont faiblement marquées. Des dilutions sérielles de l'échantillon (Fig. 3 pistes 2, 3, 4 et 5), montrent que l'intensité de toutes les bandes diminue proportionnellement à la dilution. A la dilution la plus importante (1/16), l'anticorps révèle un triplet de bandes de 43 à 45 kDa ainsi que deux groupes de bandes de 40 à 43 kDa qui sont les plus fortement marqués dans l'échantillon non dilué (Fig. 3 piste 1).

Les profils d'immunofluorescence procurés par les deux anticorps ont été comparés par la technique de double marquage. En simple marquage et dans les conditions normales d'utilisation, l'anticorps CTS-32 marque la totalité des écailles épiplasmiques (voir partie précédente ainsi que Nahon et al., 1993). Dans les conditions expérimentales qui ont permis d'obtenir les images montrées figure 4A, l'anticorps CTS-32 est beaucoup plus dilué que dans ses conditions standard d'utilisation. Sur la figure 4A, l'anticorps CTS-32 réagit plus faiblement avec la région centrale (péricinétosomienne) de l'écaille. L'anticorps AI procure un marquage similaire (Fig. 4B), confirmé par la superposition des deux marquages (Fig. 4C). Bien que les deux anticorps ne reconnaissent pas les mêmes épitopes (dot blot montré Fig. 2), les résultats de Western blot et d'immunofluorescence suggèrent que les protéines reconnues par l'immunsérum AI constituent un sous-groupe au sein de la famille multigénique des épiplasmines de paramécie.

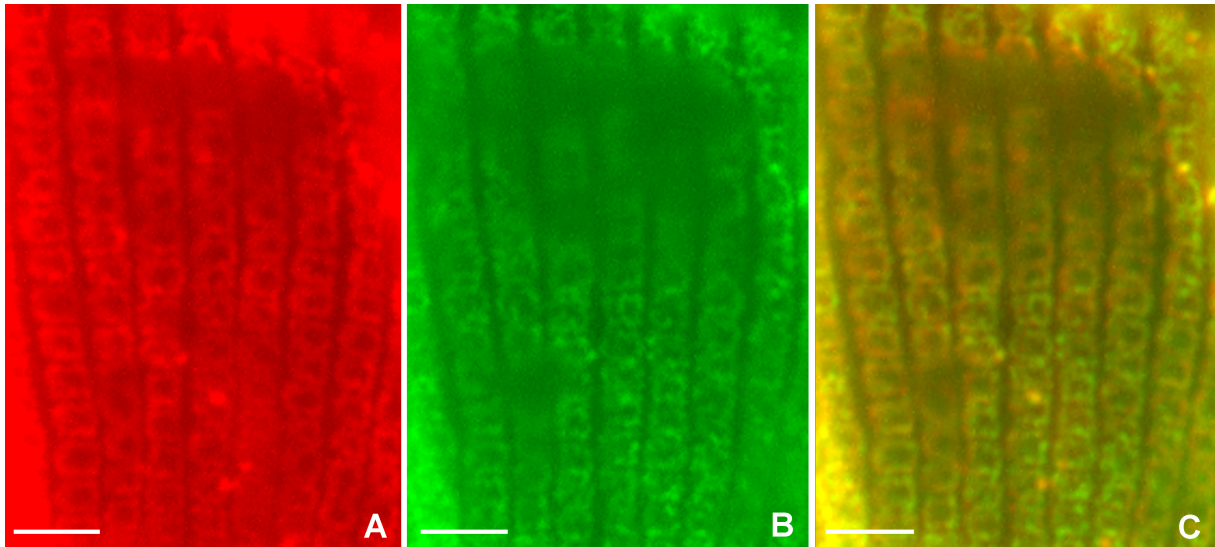


Figure 4 : Immunofluorescence indirecte : double marquage de cellules sauvages à l'aide des deux anticorps CTS-32 (A) et AI (B). Les deux anticorps marquent la même région des écailles épithéliales comme le montre la superposition des deux images (C). Barres : 2,5 μ m.

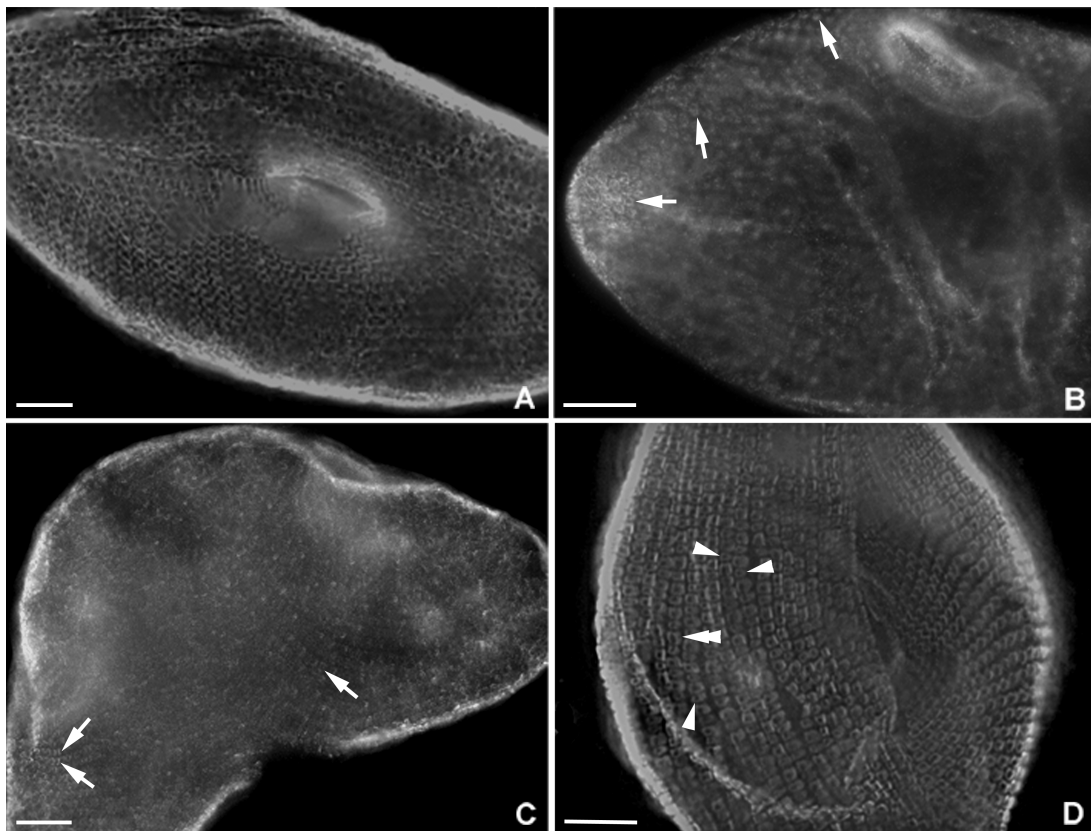


Figure 5 : Immunofluorescence indirecte : simples marquages au moyen des anticorps AI (A-C) et CTS-32 (D). Les cellules traitées sont le type sauvage (A), le stade pré-boomerang (B et D) et boomerang (C). Noter la perte du signal AI dès le stade pré-boomerang. Noter aussi la persistance du signal CTS-32 à ce même stade. Certaines écailles épithéliales présentent des anomalies de forme et de taille (simples têtes de flèche). D'autres présentent une duplication partielle (doubles têtes de flèche). Barres : 10 μ m.

L'anticorps AI : un marqueur de l'apparition du phénotype boomerang ?

Nous avons tenté de suivre l'évolution des profils d'immunofluorescence procurés chez les phénotypes obtenus après RNAi du gène *EPI-1*. L'analyse par Western blot n'a pour l'instant pas été possible du fait des problèmes liés à la méthode feeding et qui se répercutent fatalement sur le nombre de cellules disponibles après induction sachant que le phénotype conduit à une lyse relativement rapide (72 h) après initiation du RNAi. Nous avons néanmoins pu obtenir un certain nombre limité d'images d'immunofluorescence. La figure 5A montre le profil d'immunofluorescence chez les cellules sauvages. Comme dans la figure 4B, l'anticorps AI réagit avec la région la plus externe de l'écaille. Les cellules induites présentent un profil qui est fortement atténué avant même la formation des phénotypes boomerangs (Fig. 5B). Ces cellules sont beaucoup plus courtes et plus volumineuses que les cellules sauvages. Leur suivi en microscopie à contraste de phase montre qu'il s'agit d'un stade transitoire entre le phénotype sauvage et le phénotype boomerang (données non montrées). Nous le qualifierons de phénotype "pré-boomerang". Dans ces cellules, le marquage des écailles épiplasmiques est beaucoup plus diffus. Il est pratiquement éteint au stade boomerang (Fig. 5C). L'anticorps CTS-32 semble révéler les toutes premières anomalies en termes d'organisation et de duplication des écailles à ce stade précoce du phénotype induit (Fig. 5D).

Discussion

Nous présentons ici la caractérisation d'un nouvel anticorps polyclonal (AI) dirigé contre 2 peptides de synthèse issus des épiplasmines 1 et 2. Ces deux peptides n'incluent pas l'épitope reconnu par CTS-32 qui est commun à l'ensemble des épiplasmines de la paramécie. Le peptide 2 est spécifique des épiplasmines 1 et 2. Le peptide 1 est commun aux épiplasmines des groupes I et II caractérisés préalablement (voir partie 1 des résultats) à l'exception de 4 d'entre elles qui sont les épiplasmines 5, 6, 34 et 35 qui présentent deux substitutions d'acides aminés de charges équivalentes (D/E et F/Y). Malgré ces substitutions, le site putatif de phosphorylation reste potentiellement phosphorylable. La multitude de bandes reconnues en Western blot à partir des cellules sauvages suggère fortement que le principal épitope reconnu par l'anticorps AI est situé au niveau du peptide 1. Curieusement, et bien que le peptide 2 soit spécifique des épiplasmines 1 et 2, ces deux protéines de PM de 33/34 kDa n'apparaissent pas parmi les principaux antigènes reconnus par l'anticorps AI. Ceci suggère que le peptide 2 est très faiblement (ou pas) reconnu en immunofluorescence par l'anticorps AI probablement en raison d'une inaccessibilité de l'épitope dans les conditions de marquage utilisées dans cette étude. En d'autres termes, et contrairement à ce que révèlent les expériences de dot blot, la cible principale de l'anticorps AI serait donc le peptide 1. Par conséquent, les épiplasmines reconnues par l'anticorps AI représentent probablement la quasi-intégralité des membres des groupes I et II de la famille multigénique. Le fait que le peptide 1 soit phosphorylable pose toutefois un certain nombre de questions vis-à-vis de l'interprétation des résultats de Western blot et d'immunofluorescence. D'une part, il paraît difficile d'assigner une bande visualisée sur gel à une protéine déterminée. De nombreuses protéines épiplasmiques sont en effet phosphorylées. C'est le cas notamment des articulines caractérisées chez les euglènes (Marrs et Bouck, 1992). La phosphorylation est connue pour générer des discordances entre PM calculés et PM apparent évalué par SDS-PAGE. D'autre part, les épitopes phosphorylables sont sujets à des modifications conformationnelles suite à l'ajout d'un ou de plusieurs groupements phosphates. Ainsi, l'extinction du signal d'immunofluorescence procuré par l'anticorps AI pourrait être dû à une phosphorylation du peptide 1 et à une invalidation de son épitope. Les phosphorylations figurent en effet parmi les modifications biochimiques propagées à partir de la région médiane (vagues morphogénétiques) vers les pôles de la

cellule parentale lors de la division (Iftode et al., 1989). Actuellement, il est difficile de savoir si l'anticorps AI présente un réel intérêt en tant qu'outil d'étude de l'épistasme chez la paramécie. De toute évidence, cet anticorps est un marqueur des groupes I et II de la famille multigénique. Il semble désormais essentiel de déterminer si le site de phosphorylation inclus dans le peptide 1 est réellement phosphorylé *in vivo* et quelle peut être l'influence des phosphorylations dans la dynamique de l'épistasme lors de l'élongation des cellules parentales en prévision de la cytotinèse.

Références

Cette partie du chapitre II ne renferme aucune référence qui n'ait été citées dans les chapitres précédents.

CHAPITRE III
DISCUSSION GENERALE
& PERSPECTIVES

Discussion générale et perspectives

Il est clair désormais que les épiplasmines de la paramécie sont codées par une famille multigénique dont les membres ont en commun un domaine central très conservé d'environ 80 acides aminés riche en tyrosine, valine et glutamate flanqué de deux domaines riches en glutamine, valine et proline qui sont organisés en motifs répétés dont la longueur et le nombre sont variables. Des études biochimiques réalisées par Coffe et al. (1996) avaient montré que les épiplasmines de *Paramecium* peuvent être déclinées en trois groupes de PM (LMW, MMW et HMW) en fonction de leurs propriétés d'hydrophobicité et de réassemblage *in vitro*. L'analyse phylogénétique réalisée à partir des séquences nucléotidiques du domaine central a permis d'identifier 4 groupes de similarité dont les membres sont également classés en fonction de leur PM. Ainsi, les caractères physico-chimiques propres à chaque groupe d'épiplasmines sembleraient être en partie déterminés par les substitutions observées dans le domaine central. Le nombre de résidus acides, basiques ou hydrophobes dans ce domaine ne varie cependant pas en fonction des groupes de similarité. Ce serait donc plutôt la répartition différentielle de ces résidus dans le domaine central qui déterminerait le caractère hydrophobe particulier à chaque groupe d'épiplasmine. Il est à noter que la plupart des résidus chargés de ces protéines sont confinés au domaine central ainsi qu'à l'extrémité C-terminale de certaines de ces protéines (l'ensemble des membres du groupe II à l'exception des gènes *EPI-38* et 5 membres du groupe IV). La distribution particulière des charges dans les épiplasmines suggère que les domaines latéraux très faiblement chargés pourraient être impliqués dans les interactions avec la membrane permettant ainsi l'assemblage et la croissance de l'épiplasma dans les cellules parentales.

L'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal CTS-32, qui reconnaît probablement l'ensemble des membres de la famille des épiplasmines, pourrait être localisé dans le domaine central étant donné l'extrême conservation de ce domaine en terme de séquence. Un cas de figure comparable a été mis en évidence pour l'anticorps monoclonal "anti-IFA" qui reconnaît la quasi-totalité des protéines de filaments intermédiaires et dont l'épitope (en exemplaire unique) est localisé dans "l' α -helical rod domain" qui est la région la mieux conservée de cette famille de protéines (Pruss et al., 1981). Il est à noter que l'anticorps CTS-32 marque

également l'articuline 1 de *Pseudomicrothorax* (Huttenlauch et al., 1998b). Les études réalisées sur ce modèle ont montré que l'épitope reconnu par l'anticorps CTS-32 est situé dans la partie C-terminale de l'articuline 1 contenant des hexapeptides riches en glycines et en résidus hydrophobes. Les épiplasmies, et particulièrement leur domaine central, étant pauvres en glycines, l'épitope reconnu par l'anticorps CTS-32 pourrait être essentiellement composé d'acides aminés hydrophobes et de nature conformationnelle. Nous avons constaté par ailleurs que les anticorps CTS-32 et AI ne procurent aucune réaction immunologique croisée chez *Tetrahymena* (données non montrées) malgré la présence dans cet organisme de deux gènes orthologues aux épiplasmies de paramécie. A cet égard, il est important de rappeler que l'épiplasma de *Tetrahymena* n'est pas, contrairement à celui de la paramécie, un homopolymère uniquement constitué d'épiplasmies telles que définies dans cette étude. L'épiplasma de *Tetrahymena* est constitué en très grande majorité de trois protéines de très fort PM (bandes A, B et C ; voir Williams et al., 1979) dont les parentés structurales restent à définir. La localisation des deux épiplasmies orthologues n'est pas connue chez *Tetrahymena*. Leurs interactions avec les protéines épiplasmiques majeures de ce cilié pourraient masquer les épitopes reconnus par l'anticorps monoclonal CTS-32 et l'immunoserum AI et expliquer l'absence de réaction croisées entre les deux ciliés. En tout état de cause, la caractérisation de l'épitope reconnu par l'anticorps CTS-32 demeure un challenge intéressant. Son identification devrait permettre une meilleure corrélation entre l'interprétation des informations issues de la biochimie (immunofluorescence et Western blot) et les données provenant de la génomique (famille multigénique) chez la paramécie.

L'approche RNAi nous a permis d'obtenir un phénotype, nommé "boomerang", suite à l'induction du processus d'interférence ARN au moyen des séquences codantes des gènes *EPI-1* et/ou *EPI-2*. Ce phénotype, caractérisé par des anomalies mineures en termes d'élongation des cellules parentales et par un blocage répété de la cytocinèse, est similaire à celui obtenu dans le mutant *cdaA1* du gène codant pour la protéine p85 chez *Tetrahymena* (Kaczanowska et al., 1992). Cette protéine, impliquée dans l'assemblage des constituants de l'anneau contractile, est précocément exprimée dans le territoire présomptif du sillon de division des cellules parentales (Numata et Gonda, 2001). Par analogie, il est donc envisageable que la dynamique des épiplasmies de paramécie lors de l'élongation des cellules parentales joue un rôle prépondérant dans la détermination du sillon de division. De plus, l'expression du produit du gène de β -tubuline *BTU-1*, muté dans trois sites de polyglycylation sur les cinq existants, dans une souche de *Tetrahymena* soumise à un double KO des gènes *BTU-1* et *BTU-2*,

engendre de nombreuses anomalies dans la structure des cils (interruption de la zone de transition entre l'axonème et le corps basal ; perte du doublet central et de certains tubules B) et un blocage de la cytokinèse (Thazhath et al., 2002). D'après ces auteurs, l'arrêt de la cytokinèse serait indépendant de la paralysie des cils mais serait plutôt attribuable à une prolifération anormale des unités ciliaires ainsi qu'à la persistance de microtubules longitudinaux dans la zone de fission entraînant une résistance mécanique lors de l'ingression de l'anneau contractile. Ces résultats vont dans le sens du concept général selon lequel le désassemblage des structures corticales au niveau du futur sillon de division est nécessaire à la progression du processus de cytokinèse. A cet égard, Kaczanowska et al. (1999) ont montré que la protéine épiplasmique B, caractéristique de *Tetrahymena*, disparaît transitoirement du territoire présomptif du plan de fission dans les cellules pré-diviseurs. Ces résultats suggèrent que l'épépilasse de *Tetrahymena* se désassemble localement pour permettre la cytokinèse. Bien que nécessaire à la contraction de l'anneau contractile, le désassemblage des microtubules longitudinaux ne semble pas essentiel à la mise en place du sillon de division chez *Tetrahymena* (Thazhath et al., 2002). Chez la paramécie, comme chez *Tetrahymena*, le sillon de division se développe suite à la mise à disposition de la cellule parentale d'un territoire disponible dans la région équatoriale pour permettre le mécanisme de constriction nécessaire à la séparation des cellules filles (Iftode et al., 1989). A l'échelle de la cellule entière, et considérant la redondance fonctionnelle entre les différentes épépilasmines de *Paramecium*, il n'y aurait pas d'épépilasmines spécifiquement localisées au niveau du territoire présomptif du sillon de division. Il n'existe à ce jour aucun argument en faveur d'une telle hypothèse. L'incapacité des cellules parentales à former ce sillon résulterait plutôt de l'épuisement d'un processus naturel de complémentation basé sur la redondance fonctionnelle des différentes épépilasmines.

Les données de la littérature indiquent que l'inactivation par interférence ARN du gène d' α -tubuline chez *Trypanosoma brucei* génère des cellules de forme sphérique présentant un blocage de la cytokinèse en dépit de leur capacité à dupliquer et à ségréger leur appareil flagellaire et leur noyau à plusieurs reprises (Ngô et al., 1998). Ce phénotype, dénommé FAT, ressemble fortement au phénotype post-boomerang caractérisé chez la paramécie où l'on constate des échecs répétés de cytokinèse et de karyokinèse conduisant *in fine* à la lyse cellulaire. Au niveau ultrastructural, le phénotype FAT est caractérisé par une désorganisation de la paire centrale et des doublets périphériques de microtubules dans le flagelle ainsi que des microtubules liés à la zone d'attachement flagellaire (zone FAZ). Un phénotype similaire,

associé à une perte du flagelle, a été constaté suite à l'extinction du gène *FLA1* dont le produit d'expression est localisé dans la zone FAZ (LaCount et al., 2002). La zone FAZ se duplique lors des premiers stades de cytokinèse. Elle aurait donc une influence dans le positionnement du sillon division chez *Trypanosoma* (Gull, 1999). Ces résultats suggèrent que le blocage de la cytokinèse peut être indirect sans affecter les protéines spécifiquement impliquées dans la constriction des cellules parentales. C'est l'hypothèse que nous retenons pour tenter d'expliquer l'apparition des phénotypes boomerangs chez la paramécie via le RNAi des épiplasmiques. Toutefois, une relation de cause à effet ne semble pas systématique si l'on considère par exemple l'inactivation du gène *PFRA* dont le produit d'expression est une structure paraflagellaire. L'inactivation de ce gène conduit à une paralysie des cellules sans affecter le processus de cytokinèse (Bastin et al., 2000). Par ailleurs, les données de la littérature indiquent que l'inactivation du gène d'actine par RNAi chez la forme "bloodstream" de *T. brucei* déclenche un arrêt de la division cellulaire lié à un élargissement massif de la poche flagellaire ainsi qu'à une perte de l'activité d'endocytose (Garcia-Salcedo et al., 2004). Les cellules restent viables suite à l'extinction de ce gène dans la forme procyclique (Shi et al., 2000). Ainsi, l'actine semblerait avoir des rôles distincts chez *Trypanosoma* en fonction du cycle cellulaire du parasite. Plusieurs gènes d'actine ont été identifiés suite à l'analyse du génome macronucléaire de *Paramecium*. Le rôle de ces protéines a été principalement décrit lors de l'endocytose (Cohen et Beisson, 1988). Leur rôle est beaucoup plus discuté en terme de cytokinèse (Beisson, communication personnelle).

L'étude du génome de la paramécie révèle que les gènes d'actine sont non-conventionnels et constituent une famille d'environ 30 membres dont les produits d'expression figurent dans une gamme de PM comprise entre 38 et 45 kDa (Kissmehl et al., 2004). Bien que l'expression de ces protéines au niveau du sillon de division n'ait actuellement pas été clairement mise en évidence, le groupe de H. Plattner (Université de Konstanz) a récemment obtenu un phénotype d'aspect boomerang suite à l'inactivation par RNAi d'un gène d'actine (Kissmehl, communication personnelle). Ce résultat est en accord avec notre hypothèse d'un rôle indirect des épiplasmiques dans la cytokinèse via l'élongation de la cellule parentale et une modification locale du cortex dans sa région médiane nécessaire à la mise en place d'un anneau contractile. Une question qui reste en suspens est la nature biochimique exacte des protéines impliquées dans la constriction des cellules parentales chez la paramécie. Un mécanisme de cytokinèse indépendant de la myosine a été mis en évidence chez *Dictyostelium* (Uyeda et al., 2000). Des cellules de *Dictyostelium* mutées pour le gène de myosine II, présentant un blocage de la

cytocinèse dans la forme nageuse de cet organisme, sont capables de se diviser suite à l'adhésion à un substrat. Ce processus, dépendant de l'adhésion des cellules et nommé cytocinèse B (versus cytocinèse A, dépendant de la myosine), résulte d'une ingression passive du sillon de division, suite à des mouvements améboïdes de directions opposées par rapport aux pôles de la cellule. Récemment, Reichl et al., (2005) ont suggéré que la pression de Laplace, qui est une force correspondant à la différence de pressions de deux fluides séparés par une interface courbe sous tension, serait suffisante à la formation du sillon de division et à la séparation des cellules filles dans le mécanisme de cytocinèse B, suite à la l'allongement de la cellule. La viscoélasticité du cortex, influençant cette force de pression, serait régulée par une protéine de type ABP de la famille ERM (Ezrine Radixine Moesine), nommée dynacortine (Girard et al., 2004). L'expression des protéines chimère dynacortine-GFP et leur visualisation *in situ* ont permis à Robinson et Spudich (2000) de montrer que le signal est renforcé aux pôles de la cellule et s'estompe dans le sillon de division. Dans le cortex, la dynacortine co-localise avec la coronine (autre protéine de type ABP) dont la fonction est essentielle au mécanisme de cytocinèse B (Nagasaki et al., 2002). Une troisième protéine de type ABP, nommée cortexilline, serait également nécessaire à ce processus (Weber et al., 1999). Contrairement à la dynacortine et la coronine, la cortexilline est localisée dans le sillon de division lors de la cytocinèse de type B alors que l'actine est redistribuée aux pôles de la cellule. La capacité de la cortexilline à interconnecter les filaments d'actine est inhibée lors de l'association avec le facteur membranaire PIP₂ (Stock et al., 1999). Ainsi, dans ce mécanisme supposé "primitif" de cytocinèse, la dépolymérisation de l'actine dans le sillon de division favoriserait l'accumulation de cortexilline qui modulerait également la viscoélasticité corticale de la cellule. Le mécanisme permettant la constriction des cellules parentales de paramécie n'est toujours pas élucidé et pourrait éventuellement faire appel à des protéines telles que celles intervenant dans les cytocinèses dites primitives. Grâce au séquençage du génome macronucléaire, l'identification de ces protéines est désormais possible, ce qui pourrait permettre une meilleure compréhension du processus de cytocinèse chez cet organisme.

L'expression, dans des cellules en culture de mammifères, d'un dominant négatif de kinésine II ou de Syne-1, une protéine du squelette membranaire de l'enveloppe nucléaire et de l'appareil de Golgi appartenant à la famille des spectrines, accentue, dans les deux cas, le taux de cellules multinucléées (Fan et Beck, 2004). Ce résultat met ainsi en évidence le rôle concerté de ces deux protéines dans le processus de cytocinèse. L'expression des dominants négatifs de Syne-1 et kinésine II n'a cependant pas d'effet sur la mise en place de l'anneau

contractile. Ces deux protéines n'interviennent pas dans l'ingression du sillon de division. La protéine Syne-1, localisée lors de la cytokinèse au niveau d'un anneau concentrique et interne à l'anneau contractile encerclant la partie centrale du fuseau mitotique (midbody), aurait un rôle dans l'ancrage de l'anneau contractile sur le midbody en s'associant à l'actine. Les protéines Syne-1 et kinésine II ont également un rôle dans l'accumulation des vésicules membranaires au niveau du midbody et leur fusion avec la membrane plasmique dans le sillon de division. Chez *Tetrahymena*, le double KO des gènes de kinésine II *KIN1* et *KIN2* entraîne des anomalies de motilité et de cytokinèse (Brown et al., 1999a). En dépit de l'ingression normale du sillon de division dans les cellules $\Delta KIN1\Delta KIN2$, les cellules filles sont incapables de se séparer à l'étape terminale de cytokinèse. De plus, la protéine Kin1p, s'accumulant préférentiellement dans les cils en cours d'assemblage, ne semble pas être localisée dans le sillon de division. Ces auteurs ont suggéré que l'arrêt de la cytokinèse dans les cellules $\Delta KIN1\Delta KIN2$ pourrait être la conséquence de l'absence de motilité ciliaire. Par ailleurs, Brown et al. (1999b) ont montré que, lors de l'étape finale de cytokinèse, la cellule postérieure (opisthe) effectue, tout en restant dans l'axe antéro-postérieur, plusieurs rotations unidirectionnelles sur elle-même (plus de 46) par rapport à la cellule antérieure (proter) qui reste immobile. Ce phénomène, qualifié de rotocinèse, créerait ainsi une tension au niveau du pont cytoplasmique, reliant les deux futures cellules filles, qui pourrait aisément céder suite à un bref mouvement de traction nécessaire à l'achèvement de la division cellulaire. Le blocage de la cytokinèse dans les cellules $\Delta KIN1\Delta KIN2$ pourrait alors être dû à leur incapacité à engendrer de tels mouvements en raison de leur paralysie. Il est à noter que le phénomène de rotocinèse n'est pas un mécanisme indispensable à l'accomplissement de la cytokinèse chez *Tetrahymena* car, dans 40% des cas, les cellules $\Delta KIN1\Delta KIN2$ ne présentent aucun défaut de cytokinèse. Ceci suggère l'existence d'autres mécanismes indépendants de la rotocinèse permettant de séparer les cellules filles de *Tetrahymena* malgré leur paralysie. Chez la paramécie, une légère rotation du proter sur la gauche de la cellule est également observée suite à l'apparition du nouvel appareil oral sur le côté droit de l'ancien (Iftode et al., 1997). Cet événement, se produit lors d'une phase très antérieure au processus de constriction. Il est probable qu'il influe sur la formation des lignes de suture antérieures et postérieures de l'opisthe et du proter respectivement lors de la mise en place des appareils oraux dans les futures cellules filles. Les lignes de sutures semblent pouvoir se former dans les phénotypes boomerangs suggérant que le mécanisme de rotation du proter dans l'axe antéro-postérieur de la cellule n'est pas affecté. Indépendamment de ce phénomène, la rotation du proter par

rapport à l'opisthe caractéristique du phénotype boomerang pourrait être due à un blocage de l'allongement du diviseur malgré une forte duplication des unités corticales dans la région équatoriale, comme décrit précédemment dans la cellule sauvage (Iftode et al., 1989). L'accumulation d'unités corticales à partir de ce centre morphogénétique provoquerait alors une torsion de la cellule dans un axe passant par le sillon de division et orthogonal à l'axe antéro-postérieur, à l'origine du phénotype boomerang. Cette hypothèse est en accord avec le rôle que nous attribuons aux épiplasmies dans l'élongation des cellules parentales et la mise en place du sillon division. Dans ces circonstances, les épiplasmies inactivées par RNAi dans ce travail auraient un rôle dans l'allongement de la cellule en division, en plus de la fonction dans la mise en place du sillon de division.

En conclusion, dans cette étude, nous avons caractérisé une nouvelle famille de gènes à partir des séquences d'épiplasmies 1 et 2, précédemment identifiées au laboratoire, et de données préliminaires du génome de la paramécie. Les membres de cette famille contiennent un domaine central très conservé d'environ 80 acides aminés ne présentant aucune homologie avec les domaines préalablement répertoriés dans les banques de données. A partir de la séquence nucléique de ce domaine central, nous avons pu classer ces gènes en 4 groupes de similarités. Ces groupes sont également classés suivant leur PM, tout comme les groupes biochimiques préalablement définis par Coffe et al. (1996), suggérant que les caractères physico-chimiques des groupes d'épiplasmies seraient, au moins en partie, contenus dans le domaine central. L'expression de l'épiplasmine 1 couplée à la GFP a confirmé un marquage des écailles épiplasmiques. L'extinction des gènes *EPI-1* et *EPI-2* par RNAi induit un phénotype, nommé boomerang, caractérisé par un blocage répété de la cytokinèse. L'inhibition de l'expression des gènes *EPI-1* et *EPI-2* a été mise en évidence par une analyse en RT-PCR. Des observations en microscopie à épifluorescence du phénotype boomerang ont montré, en dépit du déroulement normal de certains événements morphogénétiques, des anomalies de morphogenèse corticale et de karyocinèse. Ces anomalies, ainsi que le blocage de la cytokinèse, sont vraisemblablement la conséquence de l'invalidation des gènes des groupes I et II. L'élongation de la cellule parentale reste néanmoins possible probablement en raison d'une redondance fonctionnelle au sein de la famille multigénique (complémentation fonctionnelle par les gènes des familles III et IV). Cette redondance ne serait cependant pas suffisante pour l'achèvement du processus de division qui *in fine* est la séparation des deux cellules filles.

Il devient désormais important d'identifier l'ensemble des protéines localisées dans le sillon de division chez la paramécie. Les données provenant de la séquence du génome macronucléaire (Dessen et al., 2001 ; Sperling et al., 2002 ; Zagulski et al., 2004) devraient permettre d'identifier des gènes candidats. Le couplage de leurs produits d'expression avec la GFP devrait pouvoir confirmer leur localisation. Une analyse fonctionnelle à grande échelle du génome de la paramécie, comme celle réalisée par RNAi chez le nématode *C. elegans* (Fraser et al., 2000 ; Gonczy et al., 2000 ; Kamath et al., 2003), devrait permettre d'identifier quels sont les gènes réellement impliqués dans l'apparition du phénotype boomerang et de développer une étude plus détaillée de leurs produits d'expression au moyen de nouvelles sondes immunologiques. Une telle analyse semble en mesure d'élucider le rôle des épiplasmies dans la cascade d'évènements morphogénétiques conduisant à la cytokinèse. Une étude comparée de la distribution et la dynamique de ces protéines via l'approche GFP devrait également permettre de mieux comprendre les mécanismes de morphogenèse et de cytokinèse et leur interdépendance lors de la division chez la paramécie.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adoutte A. et Fleury A.** (1996). Cytoskeleton of ciliates. Dans "Ciliates: cells as organisms" (Hausmann K. et Bradbury P.C. eds). pp. 41-49, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.
- Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohmmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K. et Mukherjee S.K.** (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 657-685.
- Al-Anouti F., Quach T. et Ananvoranich S.** (2003). Double-stranded RNA can mediate the suppression of uracil phosphoribosyltransferase expression in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**: 316-323.
- Allen R.D.** (1967). Fine structure, reconstruction and possible functions of components of the cortex of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.* **14**: 553-565.
- Allen R.D.** (1969). The morphogenesis of basal bodies and accessory structures of the cortex of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* **40**: 716-733.
- Allen R.D.** (1971). Fine structure of membranous and microfibrillar systems in the cortex of *Paramecium caudatum*. *J. Cell Biol.* **49**: 1-20.
- Almeida R. et Allshire R.C.** (2005). RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol.* **15**: 251-258.
- Awan A., Bernstein M., Hamasaki T. et Satir P.** (2004). Cloning and characterization of Kin5, a novel *Tetrahymena* ciliary kinesin II. *Cell Motil. Cytoskeleton* **58**: 1-9.
- Baines A.J. et Pinder J.C.** (2005). The spectrin-associated cytoskeleton in mammalian heart. *Front. Biosci.* **10**: 3020-3033.
- Bakowska J., Nelsen E.M. et Frankel J.** (1982). Development of the ciliary pattern of the oral apparatus of *Tetrahymena thermophila*. *J. Protozool.* **29**: 366-382.
- Bastin P., Ellis K., Kohl L. et Gull K.** (2000). Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J. Cell Sci.* **113**: 3321-3328.
- Bastin P., Galvani A. et Sperling L.** (2001). Genetic interference in protozoa. *Res. Microbiol.* **152**: 123-129.
- Beisson J. et Jerka-Dziadosz M.** (1999). Polarities of the centriolar structure: morphogenetic consequences. *Biol. Cell* **91**: 367-378.
- Beisson J., Clérot J.C., Fleury-Aubusson A., Garreau de Loubresse N., Ruiz F. et Klotz C.** (2001). Basal body-associated nucleation center for the centrin-based cortical cytoskeletal network in *Paramecium*. *Protist* **152**: 339-354.
- Bennett V. et Condeelis J.** (1988). Isolation of an immunoreactive analogue of brain fodrin that is associated with the cell cortex of *Dictyostelium* amoeba. *Cell Motil. Cytoskeleton* **11**: 303-317.
- Bennett V. et Baines A.J.** (2001). Spectrin and ankyrin based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev.* **81**: 1353-1392.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. et Hannon G.J.** (2001). Role for a bidendate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.
- Bouchard P., Viguès B., Ruchaud M.H. et Ravet V.** (1998). The membrane skeleton of *Tetrahymena* contains immunoanalogs of GFAP the intermediate filament protein expressed in astrocytes and cells of glial origin. *Eur. J. Protistol.* **34**: 138-147.

- Bouchard P., Chomilier J., Ravet V., Mornon J.P. et Viguès B.** (2001). Molecular characterization of the major membrane skeletal protein in the ciliate *Tetrahymena pyriformis* suggests n-plication of an early evolutionary intermediate filament protein subdomain. *J. Cell Sci.* **114**: 101-110.
- Brimmer A. et Weber K.** (2000). The cDNA sequences of three tetrins, the structural proteins of the *Tetrahymena* oral filaments, show that they are novel cytoskeletal proteins. *Protist* **151**: 171-180.
- Brown J.M., Marsala C., Kosoy R. et Gaertig J.** (1999a). Kinesin-II is preferentially targeted to assembling cilia and is required for ciliogenesis and normal cytokinesis in *Tetrahymena*. *Mol. Biol. Cell* **10**: 3081-3096.
- Brown J.M., Hardin C. et Gartig J.** (1999b). Rotokinesis, a novel phenomenon of cell locomotion-assisted cytokinesis in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Cell Biol. Int.* **23**: 841-848.
- Calegari F., Hausenback W., Yang D., Huttner W.B. et Buchholz F.** (2002). Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 14236-14240.
- Chang L. et Goldman R.D.** (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 601-613.
- Chiu Y.L. et Rana T.M.** (2002). RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell.* **10**: 549-561.
- Chomczynski P. et Sacchi N.** (1987). Single-step method isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Church G.M. et Gilbert W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991-1995.
- Clérot J.C., Iftode F., Budin K., Jeanmaire-Wolf R., Coffe G. et Fleury-Aubusson A.** (2001). Fine oral filaments in *Paramecium*: a biochemical and immunological analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**: 234-245.
- Coffe G., Le Caer J.P., Lima O. et Adoutte A.** (1996). Purification, *in vitro* reassembly, and preliminary sequence analysis of epiplasmins, the major constituent of the membrane skeleton of *Paramecium*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **34**: 137-151.
- Cohen J., Garreau de Loubresse N., Klotz C., Ruiz F., Bordes N., Sandoz D., Bornens M. et Beisson J.** (1987). Organization and dynamics of a cortical fibrous network of *Paramecium*: the outer lattice. *Cell Motil. Cytoskeleton* **7**: 315-324.
- Cohen J. et Beisson J.** (1988). The cytoskeleton. Dans "*Paramecium*" (H.D. Görtz ed.). pp. 363-392, Springer Verlag, Berlin.
- Curtenaz S., Nahon P., Iftode F. et Fleury A.** (1994). Interspecific immunological cross-reactions among cortical proteins of four ciliates. *Eur. J. Protistol.* **30**: 440-450.
- Dagger F., Dunia I., Hernandez A.G., Pradel L.A. et Benedetti E.L.** (1988-1989). Plasma membrane and cytoskeletal constituents in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biol. Rep.* **13**: 197-206.
- Dasgupta S., Fernandez S., Kameyama L., Inada T., Nakamura Y., Pappas A. et Court D.L.** (1998). Genetic uncoupling of the dsRNA-binding and RNA cleavage activities of the *Escherichia coli* endoribonuclease RNase III – the effect of dsRNA binding on gene expression. *Mol. Microbiol.* **28**: 629-640.
- Davis L.H., Otto E. et Bennett V.** (1991). Specific 33-residue repeat(s) of erythrocyte ankyrin associate with the anion exchanger. *J. Biol. Chem.* **266**: 11163-11169.
- De la Cruz E.M. et Ostap E.M.** (2004). Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 61-67.

- De Puytorac P., Grain J. et Mignot J.P.** (1987). Précis de protistologie. Boubée et fondation Singer Polignac, Paris.
- Dessen P., Zagulski M., Gromadka R., Plattner H., Kissmehl R., Meyer E., Bétermier M., Schultz J.E., Linder J.U., Pearlman R.E., Kung C., Forney J., Satir B.H., Van Houten J.L., Keller A.M., Froissard M., Sperling L. et Cohen J.** (2001). *Paramecium* genome survey: a pilot project. *Trends Genet.* **17**: 306-308.
- Diogon M., Henou C., Ravet V., Bouchard P. et Viguès B.** (2001). Evidence for regional differences in the dynamics of centriole cytoskeletal structures in the polymorphic hymenostome ciliate *Tetrahymena paravorax*. *Eur. J. Protistol.* **37**: 223-231.
- Doench J.G., Peterson C.P. et Sharp P.A.** (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* **17**: 438-442.
- Dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A. et Nosworthy N.J.** (2003). Actin binding proteins : regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* **83**: 433-473.
- Dupuis-Williams P., Klotz C., Mazarguil H. et Beisson J.** (1996). The tubulin gene family of *Paramecium*: characterization and expression of the α PT1 and α PT2 genes which code for α -tubulins with unusual C-terminal amino acids, GLY and ALA. *Biol. Cell* **87**: 83-93.
- Dupuis-Williams P., Fleury-Aubusson A., Garreau de Loubresse N., Geoffroy H., Vayssié L., Galvani A., Espigat A. et Rossier J.** (2002). Functional role of ϵ -tubulin in the assembly of the centriolar microtubule scaffold. *J. Cell Biol.* **158**: 1183-1193.
- Durand-Dubief M. et Bastin P.** (2003). TbAGO1, an Argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Biol.* **1**: 2.
- Dutcher S.K.** (2003). Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 634-640.
- Dykxhoorn D.M. et Lieberman J.** (2005). The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu. Rev. Med.* **56**: 401-423.
- Elbashir S.M., Lendeckel W. et Tuschl T.** (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**: 188-200.
- Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W. et Tuschl T.** (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**: 6877-6888.
- Etienne-Manneville S.** (2004). Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic* **5**: 470-477.
- Fan J. et Beck K.A.** (2004). A role for the spectrin superfamily member Syne-1 and kinesin II in cytokinesis. *J. Cell Sci.* **117**: 619-629.
- Fattoum A.** (2001). L'actine cytosquelettique et ses protéines associées. I. Analyse fondamentale. *m/s* **17**: 193-197.
- Fazio M.J., Da Silva A.C., Rosiere T.K. et Bouck G.B.** (1995). Membrane skeletal proteins and their integral membrane protein anchors are targets for tyrosine and threonine kinases in *Euglena*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**: 570-580.
- Fire A., Albertson D., Harrison S.W. et Moerman D.G.** (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* **113**: 503-514.
- Fire A., Xu S., Montgomery S.K., Kostas S.A., Driver S.E. et Mello C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Fischer R.S. et Fowler V.M.** (2003). Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol.* **13**: 593-601.

- Fowler V.M.** (1986). An actomyosin contractile mechanism for erythrocyte shape transformations. *J. Cell. Biochem.* **31**: 1-9.
- Fowler V.M.** (1996). Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscle. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**: 86-96.
- Frankel J.** (2000). Cell biology of *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol.* **62**: 27-125.
- Fraser A.G., Kamath R.S., Zipperlen P., Martinez-Campos M., Sohrmann M. et Ahringer J.** (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**: 325-330.
- Froissard M., Keller A.M., Dedieu J.C. et Cohen J.** (2004). Novel secretory vesicle proteins essential for membrane fusion display extracellular-matrix domains. *Traffic* **5**: 493-502.
- Gaertig J., Thatcher T.H., McGrath K.E., Callahan R.C. et Gorovsky M.A.** (1993). Perspectives on tubulin isotype function and evolution based on the observation that *Tetrahymena thermophila* microtubules contain a single α - and β -tubulin. *Cell Motil. Cytoskeleton* **25**: 243-253.
- Gallagher P.G.** (2003). Regulation of erythrocyte membrane protein gene expression. *Curr. Opin. Hematol.* **10**: 115-122.
- Galvani A. et Sperling L.** (2001). Transgene-mediated post-transcriptional gene silencing is inhibited by 3' non-coding sequences in *Paramecium*. *Nucleic Acids Res.* **29**: 4387-4394.
- Galvani A. et Sperling L.** (2002). RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet.* **18**: 11-12.
- Garcés J.A., Hoey J.G. et Gavin R.H.** (1995). Putative myosin heavy and light chains in *Tetrahymena*: co-localization to the basal body-cage complex and association of the heavy chain with skeletal muscle actin filaments *in vitro*. *J. Cell Sci.* **108**: 869-881.
- Garcia-Salcedo J.A., Perez-Morga D., Gijon P., Dilbeck V., Pays E. et Nolan D.P.** (2004). A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **23**: 780-789.
- Garnier O., Serrano V., Duharcourt S. et Meyer E.** (2004). RNA-mediated programming of developmental genome rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. *Mol. Cell Biol.* **24**: 7370-7379.
- Garreau de Loubresse N., Keryer G., Viguès B. et Beisson J.** (1988). A contractile cytoskeletal network of *Paramecium*: the infraciliary lattice. *J. Cell Sci.* **90**: 351-364.
- Garreau de Loubresse N., Klotz C., Viguès B., Rutin J. et Beisson J.** (1991). Ca^{2+} -binding proteins and contractility of the infraciliary lattice in *Paramecium*. *Biol. Cell* **71**: 217-225.
- Garreau de Loubresse N., Ruiz F., Beisson J. et Klotz C.** (2001). Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of *Paramecium* basal bodies. *BMC Cell Biol.* **2**: 4.
- Georgatos S.D. et Marchesi V.T.** (1985). The binding of vimentin to human erythrocyte membranes: a model for the study of intermediate filament-membrane interactions. *J. Cell Biol.* **100**: 1955-1961.
- Girard K.D., Chaney C., Delannoy M., Kuo S.C. et Robinson D.N.** (2004). Dynacortin contributes to cortical viscoelasticity and helps define the shape changes of cytokinesis. *EMBO J.* **23**: 1536-1546.
- Gonczy P., Echeverri C., Oegema K., Coulson A., Jones S.J., Copley R.R., Duperon J., Oegema J., Brehm M., Cassin E., Hannak E., Kirkham M., Pichler S., Flohrs K., Goessen A., Leidel S., Alleaume A.M., Martin C., Ozlu N., Bork P. et Hyman A.A.** (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* **408**: 331-336.
- Gonda K., Katoh M., Hanyu K., Watanabe Y. et Numata O.** (1999). Ca^{2+} /calmodulin and p85 cooperatively regulate an initiation of cytokinesis in *Tetrahymena*. *J. Cell Sci.* **112**: 3619-3626.

- Guerra C., Wada Y., Leick V., Bell A. et Satir P.** (2003). Cloning, localization, and axonemal function of *Tetrahymena* centrin. *Mol. Biol. Cell* **14**: 251-261.
- Gull K.** (1999). The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 629-655.
- Gunning P.W., Schevzov G., Kee A.J. et Hardeman E.C.** (2005). Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton functions. *Trends Cell Biol.* **15**: 333-341.
- Hall I.M., Noma K.I. et Grewal S.I.S.** (2003). RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 193-198.
- Hamilton A.J. et Baulcombe D.C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952.
- Hamilton A., Voinnet O., Chappell L. et Baulcombe D.** (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* **21**: 4671-4679.
- Hammond S.M., Bernstein E., Beach D. et Hannon G.J.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.
- Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R. et Hannon G.J.** (2001). Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**: 1146-1150.
- Hanyu K., Takemasa T., Numata O., Takahashi M. et Watanabe Y.** (1995). Immunofluorescence localization of a 25-kDa *Tetrahymena* EF-hand Ca^{2+} -binding protein, TCBP-25, in the cell cortex and possible involvement in conjugation. *Exp. Cell Res.* **219**: 487-493.
- Hanyu K., Numata O., Takahashi M. et Watanabe Y.** (1996). Immunofluorescence localization of a 23-kDa *Tetrahymena* calcium-binding protein, TCBP-23, in the cell cortex. *J. Biochem.* **119**: 914-919.
- Hauser K., Haynes W.J., Kung C., Plattner H. et Kissmehl R.** (2000a). Expression of the green fluorescent protein in *Paramecium tetraurelia*. *Eur J. Cell Biol.* **79**: 144-149.
- Hauser K., Pavlovic N., Klauke N., Geissinger D. et Plattner H.** (2000b). Green Fluorescent Protein-tagged sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase overexpression in *Paramecium* cells: isoforms, subcellular localization, biogenesis of cortical calcium stores and functional aspects. *Mol. Microbiol.* **37**: 773-787.
- Hausmann K. et Kaiser J.** (1979). Arrangement of structure of plates in the cortical alveoli of the hypotrich ciliate, *Euplotes vannus*. *J. Ultrastruct. Res.* **67**: 15-22.
- Hausmann K. et Hülsmann N.** (1996). *Protozoology* 2nd ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Herrmann H. et Wiche G.** (1987). Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *J. Biol. Chem.* **262**:1320-1325.
- Herrmann H. et Aebi U.** (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 749-789.
- Himber C., Dunoyer P., Moissiard G., Ritzenthaler C. et Voinnet O.** (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* **22**: 4523-4533.
- Hirono M., Nakamura M., Tsunemoto M., Yasuda T., Ohba H., Numata O. et Watanabe Y.** (1987). *Tetrahymena* actin: localization and possible biological roles of actin in *Tetrahymena* cells. *J. Biochem.* **102**: 537-545.
- Honts J.E. et Williams N.E.** (1990). Tetrins: polypeptides that form bundled filaments in *Tetrahymena*. *J. Cell Sci.* **96**: 293-302.
- Honts J.E. et Williams N.E.** (2003). Novel cytoskeletal proteins in the cortex of *Tetrahymena*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**: 9-14.

- Hosein R.E., Williams S.E. et Gavin R.H.** (2005). Directed motility of phagosomes in *Tetrahymena thermophila* requires actin and Myo1p, a novel unconventional myosin. *Cell Motil. Cytoskeleton* **61**: 49-60.
- Hutchison C.J. et Worman H.J.** (2004). A-type lamins: guardians of the soma? *Nat. Cell Biol.* **6**: 1062-1067.
- Huttenlauch I. et Peck R.K.** (1991). The membrane skeleton of *Pseudomicrothorax*. II. Biochemical and immunological characterization of the glycosylated cytoskeletal proteins. *J. Cell Sci.* **100**: 707-715.
- Huttenlauch I., Geisler N., Plessmann U., Peck R.K., Weber K. et Stick R.** (1995). Major epiplasmic proteins of ciliates are articulins: cloning, recombinant expression, and structural characterization. *J. Cell Biol.* **130**: 1401-1412.
- Huttenlauch I., Peck R.K., Plessmann U., Weber K. et Stick R.** (1998a). Characterization of two articulins, the major epiplasmic proteins comprising the membrane skeleton of the ciliate *Pseudomicrothorax*. *J. Cell Sci.* **111**: 1909-1919.
- Huttenlauch I., Peck R.K. et Stick R.** (1998b). Articulins and epiplasmins: two distinct classes of cytoskeletal proteins of the membrane skeleton in protists. *J. Cell Sci.* **111**: 3367-3378.
- Huttenlauch I. et Stick R.** (2003). Occurrence of articulins and epiplasmins in protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**: 15-18.
- Hutvagner G. et Zamore P.D.** (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**: 2056-2060.
- Iftode F., Cohen J., Ruiz F., Torres Rueda A., Chen-Shan L., Adoutte A. et Beisson J.** (1989). Development of surface pattern during division in *Paramecium*. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structures in the wild type. *Development* **105**: 191-211.
- Iftode F., Fleury A. et Adoutte A.** (1997). Development of surface pattern during division in *Paramecium*. III. Study of stomatogenesis in the wild type using antitubulin antibodies and confocal microscopy. *Eur. J. Protistol.* **33**: 145-167.
- Iftode F. et Fleury-Aubusson A.** (2003). Structural inheritance in *Paramecium*: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biol. Cell* **95**: 39-51.
- Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G. et Linsley P.S.** (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**: 635-637.
- Jeanmaire-Wolf R., Clérot J.C., Nahon P., Iftode F., Fleury A. et Adoutte A.** (1993). Isolation and characterization of monoclonal antibodies to cytoskeletal and membrane proteins of *Paramecium* cortex. *Eur. J. Protistol.* **29**: 311-333.
- Jerka-Dziadosz M. et Beisson J.** (1990). Genetic approaches to ciliate pattern formation: from self-assembly to morphogenesis. *Trends Genet.* **6**: 41-45.
- Jerka-Dziadosz M., Garreau de Loubresse N. et Beisson J.** (1992). Development of surface pattern during division in *Paramecium*. II. Defective spatial control in the mutant *kin241*. *Development* **115**: 319-335.
- Jerka-Dziadosz M., Ruiz F. et Beisson J.** (1998). Uncoupling of basal body duplication and cell division in *crochu*, a mutant of *Paramecium* hypersensitive to nocodazole. *Development* **125**: 1305-1314.
- Ji J., Werni M., Klimkait T. et Erb P.** (2003). Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett.* **552**: 247-252.
- Job D., Valiron O. et Oakley B.** (2003). Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**: 111-117.
- Kaczanowska J., Buzanska L. et Frontczak M.** (1992). The influence of fission line expression on the number and positioning of oral primordia in the *cdaA1* mutant of *Tetrahymena thermophila*. *Dev. Genet.* **13**: 216-222.

- Kaczanowska J., Iftode F., Coffe G., Prajer M., Kosciuszko H. et Adoutte A.** (1996). The protein kinase inhibitor 6-dimethylaminopurine does not inhibit micronuclear mitosis, but impairs the rearrangement of cytoplasmic MTOCs and execution of cytokinesis in the ciliate *Paramecium* during transition to interphase. *Eur. J. Protistol.* **32**: 2-17.
- Kaczanowska J., Joachimiak E., Buzanska L., Krawczynska W., Wheatley D.N. et Kaczanowski A.** (1999). Molecular subdivision of the cortex of dividing *Tetrahymena* is coupled with the formation of the fission zone. *Dev. Biol.* **212**: 150-164.
- Kaczanowska J., Joachimiak E., Kiersnowska M., Krzywicka A., Golinska K., Kaczanowski A.** (2003). The fenestrin antigen in submembrane skeleton of the ciliate *Tetrahymena thermophila* is proposed as a marker of cell polarity during cell division and in oral replacement. *Protist* **154**: 251-264.
- Kamath R.S., Martinez-Campos M., Zipperlen P., Fraser A.G. et Ahringer J.** (2000). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* **2**: research/0002.1-research/0002.10.
- Kamath R.S., Fraser A.G., Dong Y., Poulin G., Durbin R., Gotta M., Kanapin A., Le Bot N., Moreno S., Sohrmann M., Welchman D.P., Zipperlen P. et Ahringer J.** (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**: 231-236.
- Kawano T., Fujita M. et Sakamoto H.** (2000). Unique and redundant functions of SR proteins, a conserved family of splicing factors, in *Caenorhabditis elegans* development. *Mech. Dev.* **95**: 67-76.
- Kennerdell J.R. et Carthew R.W.** (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**: 1017-1026.
- Keryer G., Davis F.M., Rao P.N. et Beisson J.** (1987). Protein phosphorylation and dynamics of cytoskeletal structures associated with basal bodies in *Paramecium*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **8**: 44-54.
- Keryer G., Adoutte A., Ng S.F., Cohen J., Garreau de Loubresse N., Rossignol M., Stelly N. et Beisson J.** (1990). Purification of the surface membrane-cytoskeleton complex (cortex) of *Paramecium* and identification of several of its protein constituents. *Eur. J. Protistol.* **25**: 209-225.
- Keller A.M. et Cohen J.** (2000). An indexed genomic library for *Paramecium* complementation cloning. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**: 1-6.
- Kim V.N.** (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol. Cells* **19**: 1-15.
- Kissmehl R., Sehring I.M., Wagner E. et Plattner H.** (2004). Immunolocalization of actin in *Paramecium* cells. *J. Histochem. Cytochem.* **52**: 1543-1559.
- Klotz C., Garreau de Loubresse N., Ruiz F. et Beisson J.** (1997). Genetic evidence for a role of centrin-associated proteins in the organization and dynamics of the infraciliary lattice in *Paramecium*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **38**: 172-186.
- Kloetzel J.A.** (1991). Identification and properties of plateins, major proteins in the cortical alveolar plates of *Euplotes*. *J. Protozool.* **38**: 392-401.
- Kloetzel J.A., Baroin-Tourancheau A., Miceli C., Barchetta S., Farmar J., Banerjee D. et Fleury-Aubusson A.** (2003a). Plateins: a novel family of signal peptide-containing articulins in euplotid ciliates. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**: 19-33.
- Kloetzel J.A., Baroin-Tourancheau A., Miceli C., Barchetta S., Farmar J., Banerjee D. et Fleury-Aubusson A.** (2003b). Cytoskeletal proteins with N-terminal signal peptides: plateins in the ciliate *Euplotes* define a new family of articulins. *J. Cell Sci.* **116**: 1291-1303.
- Koblentz B., Schoppmeier J., Grunow A. et Lehtreck K.F.** (2003). Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J. Cell Sci.* **116**: 2635-2646.

- Krauss S.W., Lee G., Chasis J.A., Mohandas N. et Heald R.** (2004). Two protein 4.1 domains essential for mitotic spindle and aster microtubule dynamics and organization *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **279**: 27591-27598.
- Kreis T. et Vale R.** (1999). Guidebook to cytoskeletal and motor proteins. Oxford University Press, Oxford.
- Krzywicka A., Beisson J., Keller A.M., Cohen J., Jerka-Dziadosz M. et Klotz C.** (2001). *KIN241*: a gene involved in cell morphogenesis in *Paramecium tetraurelia* reveals a novel protein family of cyclophilin-RNA interacting proteins (CRIPs) conserved from fission yeast to man. *Mol. Microbiol.* **42**: 257-267.
- Kwiatkowska K. et Sobota A.** (1992). 240 kDa immunoanalogue of vertebrate α -spectrin occurs in *Paramecium* cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **23**: 111-121.
- LaCount D.J., Barrett B. et Donelson J.E.** (2002). *Trypanosoma brucei* *FLA1* is required for flagellum attachment and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 17580-17588.
- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Langley R.C. et Cohen C.M.** (1987). Cell type-specific association between two types of spectrin and two types of intermediate filaments. *Cell Motil. Cytoskeleton* **8**: 165-173.
- Lecellier C.H. et Voinnet O.** (2004). RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol. Rev.* **198**: 285-303.
- Li Z. et Wang C.C.** (2002). Functional characterization of the 11 non-ATPase subunit proteins in the trypanosome 19 S proteasomal regulatory complex. *J. Biol. Chem.* **277**: 42686-42693.
- Lin R. et Wang H.** (2004). *Arabidopsis* FHY3/FAR1 gene family and distinct roles of its members in light control of *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* **136**: 4010-4022.
- Liu Y., Song X., Gorovsky M.A. et Karrer K.M.** (2005). Elimination of foreign DNA during somatic differentiation in *Tetrahymena thermophila* shows position effect and is dosage dependent. *Eukaryot. Cell* **4**: 421-431.
- Madeddu L., Klotz C., Le Caer J.P. et Beisson J.** (1996). Characterization of centrin genes in *Paramecium*. *Eur. J. Biochem.* **238**: 121-128.
- Maiato H., Sampiao P. et Sunkel C.** (2004). Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis. *Int. Rev. Cytol.* **243**: 53-153.
- Makeyev E.V. et Bamford D.H.** (2002). Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Mol. Cell* **10**: 1417-1427.
- Malhotra P., Dasarashi P.V., Kumar A., Mohammed A., Agrawal N., Bhatnagar R.K. et Chauhan V.S.** (2002). Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **45**: 1245-1254.
- Marrs J.A. et Bouck G.B.** (1992). The two major membrane skeletal proteins (articulins) of *Euglena gracilis* define a novel class of cytoskeletal proteins. *J. Cell Biol.* **118**: 1465-1475.
- Mathieu O. et Bender J.** (2004). RNA-directed DNA methylation. *J. Cell Sci.* **117**: 4881-4888.
- McLaughlin N.B. et Buhse Jr. H.E.** (2004). Localization by indirect immunofluorescence of tetrin, actin, and centrin to the oral apparatus and buccal cavity of the macrostomal form of *Tetrahymena vorax*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**: 253-257.
- Meyer E., Caron F. et Baroin A.** (1985). Macronuclear structure of the G surface antigen gene of *Paramecium primaurelia* and direct expression of its repeated epitopes in *Escherichia coli*. *Mol. Cell Biol.* **5**: 2414-2422.

- Meyer E. et Keller A.M.** (1996). A mendelian mutation affecting mating-type determination also affects developmental genomic rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. *Genetics* **143**: 191-202.
- Michaud D., Guillet G., Rogers P.A. et Charest P.M.** (1991). Identification of a 220 kDa membrane associated plant cell protein immunologically related to human β -spectrin. *FEBS Lett.* **294**: 77-80.
- Middendorp S., Kuntzinger T., Abraham Y., Holmes S., Bordes N., Paintraïnd M., Paoletti A. et Bornens M.** (2000). A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J. Cell Biol.* **148**: 405-416.
- Mignot J.P., Brugerolle G. et Bricheux G.** (1987). Intercalary strip development and dividing cell morphogenesis in the euglenid *Cyclidiopsis acus*. *Protoplasma*, **139**: 51-65.
- Mochizuki K. et Gorovsky M.A.** (2004). Small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 181-187.
- Mochizuki K. et Gorovsky M.A.** (2005). A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase. *Genes Dev.* **19**: 77-89.
- Momayezi M., Kissmehl R. et Plattner H.** (2000). Quantitative immunogold localization of protein phosphatase 2B (calcineurin) in *Paramecium* cells. *J. Histochem. Cytochem.* **48**: 1269-1281.
- Montgomery M.K., Xu S. et Fire A.** (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 15502-15507.
- Montgomery M.K.** (2004). RNA interference. Historical overview and significance. *Methods Mol. Biol.* **265**: 3-21.
- Nagasaki A., de Hostos E.L. et Uyeda T.Q.P.** (2002). Genetic and morphological evidence for two parallel pathways of cell-cycle-coupled cytokinesis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **115**: 2241-2251.
- Nahon P., Coffe G., Le Guyader H., Darmanaden-Delorme J., Jeanmaire-Wolf R., Clérot J.C. et Adoutte A.** (1993). Identification of epiplasmins, a new set of cortical proteins of the membrane cytoskeleton in *Paramecium*. *J. Cell Sci.* **104**: 975-990.
- Nakano H., Amemiya S., Shiokawa K. et Taira M.** (2000). RNA interference for the organizer-specific Xlim-1 in *Xenopus* embryo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**: 434-439.
- Niggli V.** (1995). Membrane-cytoskeleton. Dans "The cytoskeleton: structure and assembly" (Hesketh J.E. et Pryme I.F. eds). pp. 123-168, Jai Press Inc., Greenwich.
- Ngô H., Tschudi C., Gull K. et Ullu E.** (1998). Double stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 14867-14892.
- Numata O.** (1996). Multifunctional proteins in *Tetrahymena*: 14-nm filament protein/citrate synthase and translation elongation factor-1 α . *Int. Rev. Cytol.* **164**: 1-35.
- Numata O., Suzuki H., Ohba H. et Watanabe Y.** (1995). The mutant gene product of a *Tetrahymena* cell-division-arrest mutant *cdaA* is localized in the accessory structure of specialized basal body close to the division furrow. *Zoolog. Sci.* **12**: 133-135.
- Numata O., Hanyu K., Takeda T. et Watanabe Y.** (2000). *Tetrahymena* calcium-binding proteins, TCBP-25 and TCBP-23. *Methods Cell Biol.* **62**: 455-465.
- Numata O. et Gonda K.** (2001). Determination of division plane and organization of contractile ring in *Tetrahymena*. *Cell Struct. Funct.* **26**: 593-601.
- Nunomura W., Takakuwa Y., Parra M., Conboy J. et Mohandas N.** (2000). Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **275**: 24540-24546.

- Pasternack G.R. et Racusen R.H.** (1989). Erythrocyte protein 4.1 binds and regulates myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 9712-9716.
- Paulin J.J.** (1996). Morphology and cytology of ciliates. Dans "Ciliates: cells as organisms" (Hausmann K. et Bradbury P.C. eds), pp. 1-40, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Peck R.K.** (1977). The ultrastructure of the somatic cortex of *Pseudomicrothorax dubius*: structure and function of the epiplasm in ciliated protozoa. *J. Cell Sci.* **25**: 367-385.
- Peck R.K., Duborgel F., Huttenlauch I. et De Haller G.** (1991). The membrane skeleton of *Pseudomicrothorax*. I. Isolation, structure and composition. *J. Cell Sci.* **100**: 693-706.
- Pinder J.C. et Gratzner W.B.** (1983). Structural and dynamic states of actin in the erythrocyte. *J. Cell Biol.* **96**: 768-775.
- Pollack S.** (1974). Mutations affecting the trichocysts in *Paramecium aurelia*. I. Morphology and description of the mutants. *J. Protozool.* **21**: 352-362.
- Pollard T.D.** (1984). Purification of a high molecular weight actin filament gelation protein from *Acanthamoeba* that shares antigenic determinants with vertebrate spectrins. *J. Cell Biol.* **99**: 1970-1980.
- Pollard T.D. et Earnshaw W.C.** (2004). *Biologie Cellulaire*. Elsevier S.A.S., Paris.
- Pruss R.M., Mirski R., Raff M., Thorpe R., Dowding A.J. et Anderton B.H.** (1981). All classes of intermediate filaments share common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell* **27**: 419-428.
- Redecker V., Levilliers N., Schmitter J.M., Le Caer J.P., Rossier J., Adoutte A. et Bré M.H.** (1994). Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* **266**: 1688-1691.
- Redecker V., Levilliers N., Vinolo E., Rossier J., Jaillard D., Burnette D., Gaertig J. et Bré M.H.** (2005). Mutations of tubulin glycylation sites reveal cross-talk between the C termini of α - and β -tubulin and affect the ciliary matrix in *Tetrahymena*. *J. Biol. Chem.* **280**: 596-606.
- Reichl E.M., Effler J.C. et Robinson D.N.** (2005). The stress and strain of cytokinesis. *Trends Cell Biol.* **15**: 200-206.
- Robinson D.N. et Spudich J.A.** (2000). Dynacortin, a genetic link between equatorial contractility and global shape control discovered by library complementation of a *Dictyostelium discoideum* cytokinesis mutant. *J. Cell Biol.* **150**: 823-838.
- Roth B.M., Pruss G.J. et Vance V.B.** (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* **102**: 97-108.
- Rubtsov A.M. et Lopina O.D.** (2000). Ankyrins. *FEBS Lett.* **482**: 1-5.
- Ruiz F., Vayssié L., Klotz C., Sperling L. et Madeddu L.** (1998). Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol. Biol. Cell* **9**: 931-943.
- Ruiz F., Beisson J., Rossier J. et Dupuis-Williams P.** (1999). Basal body duplication in *Paramecium* requires γ -tubulin. *Curr. Biol.* **9**: 43-46.
- Ruiz F., Krzywicka A., Klotz C., Keller A.M., Cohen J., Koll F., Balavoine G. et Beisson J.** (2000). The *SM19* gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, η -tubulin. *Curr. Biol.* **10**: 1451-1454.
- Rutherford K., Parkhill J., Crook J., Horsnell T., Rice P., Rajandream M.A. et Barrell B.** (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**: 944-945.

- Sahr K.E., Laurila P., Kotula L., Scarpa A.L., Coupal E., Leto T.L., Linnenbach A.J., Winkelmann J.C., Speicher D.W., Marchesi V.T., Curtis P.J. et Forget B.G.** (1990). The complete cDNA and polypeptide sequences of human erythroid α -spectrin. *J. Biol. Chem.* **265**: 4434-4443.
- Salisbury J.L.** (1995). Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 39-45.
- Salisbury J.L., Suino K.M., Busby R. et Springett M.** (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* **12**: 1287-1292.
- Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schneider A., Lutz H.U., Marugg R., Gehr P. et Seebeck T.** (1988). Spectrin-like proteins in the paraflagellar rod structure of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **90**: 307-315.
- Shang Y., Song X., Bowen J., Corstanje R., Gao Y., Gaertig J. et Gorovsky M.A.** (2002a). A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 3734-3739.
- Shang Y., Li B. et Gorovsky M.A.** (2002b). *Tetrahymena thermophila* contains a conventional γ -tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers. *J. Cell Biol.* **158**: 1195-1206.
- Shi H., Djikeng A., Mark T., Wirtz E., Tschudi C. et Ullu E.** (2000). Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA* **6**: 1069-1076.
- Shi H., Djikeng A., Tschudi C. et Ullu E.** (2004). Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Mol. Cell Biol.* **24**: 420-427.
- Shirayawa S. et Numata O.** (2003). *Tetrahymena* fimbrin localized in the division furrow bundles actin filaments in a calcium-independent manner. *J. Biochem.* **134**: 591-598.
- Shoeman R.L. et Traub P.** (1995). The proteins of intermediate filament systems. Dans "The cytoskeleton: structure and assembly" (Hesketh J.E. et Pryme I.F. eds). pp. 205-255, Jai Press Inc., Greenwich.
- Simmer F., Tijsterman M., Parrish S., Koushika S.P., Nonet M.L., Fire A., Ahringer J. et Plasterk R.H.A.** (2002). Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C.elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr. Biol.* **12**: 1317-1319.
- Skouri F. et Cohen J.** (1997). Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: identification of the *ND7* gene required for membrane fusion. *Mol. Biol. Cell.* **8**: 1063-1071.
- Slaninova I., Holubarova A. et Svoboda A.** (2003). Immunodetection of spectrin-like proteins in yeasts. *Can. J. Microbiol.* **49**: 189-196.
- Small E.B. et Lynn D.H.** (1985). Phylum ciliophora Doflein, 1901. Dans "Illustrated guide to protozoa" (Lee J.J., Hutner S.H. et Bovee E.C. eds). pp. 393-575, Society of Protozoologists, Allen Press, Lawrence.
- Smith J.J., Yakisich S., Kapler G.M., Cole E.S. et Romero D.P.** (2004). A β -tubulin mutation selectively uncouples nuclear division and cytokinesis in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryot. Cell* **3**: 1217-1226.
- Sonneborn T.M.** (1970). Methods in *Paramecium* research. *Methods Cell Physiol.* **4**: 241-339.
- Sperling L., Keryer G., Ruiz F. et Beisson J.** (1991). Cortical morphogenesis in *Paramecium*: a transcellular wave of protein phosphorylation involved in ciliary rootlet disassembly. *Dev. Biol.* **148**: 205-218.
- Sperling L., Dessen P., Zagulski M., Pearlman R.E., Migdalski A., Gromadka R., Froissard M., Keller A.M. et Cohen J.** (2002). Random sequencing of *Paramecium* somatic DNA. *Eukaryot. Cell* **1**: 341-352.

- Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H. et Schreiber R.D.** (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 227-264.
- Stemm-Wolf A.J., Morgan G., Giddings Jr. T.H., White E.A., Marchione R., McDonald H.B. et Winey M.** (2005). Basal body duplication and maintenance require one member of the *Tetrahymena thermophila* centrin gene family. *Mol. Biol. Cell* **16**: 3606-3619.
- Stock A., Steinmetz M.O., Janmey P.A., Aebi U., Gerisch G., Kammerer R.A., Weber I. et Faix J.** (1999). Domain analysis of cortaxillin I: actin-bundling, PIP₂-binding and the rescue of cytokinesis. *EMBO J.* **18**: 5274-5284.
- Susi P., Hohkuri M., Wahlroos T. et Kilby N.J.** (2004). Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol. Biol.* **54**: 157-174.
- Tabara H., Grishok A. et Mello C.C.** (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**: 430-431.
- Takemasa T., Ohnishi K., Kobayashi T., Takagi T., Konishi K. et Watanabe Y.** (1989). Cloning and sequencing of the gene for *Tetrahymena* calcium-binding 25-kDa protein (TCBP25). *J. Biol. Chem.* **264**: 19293-19301.
- Takemasa T., Takagi T., Kobayashi T., Konishi K. et Watanabe Y.** (1990). The third calmodulin family protein in *Tetrahymena*. Cloning of the cDNA for *Tetrahymena* calcium-binding protein of 23 kDa (TCBP23). *J. Biol. Chem.* **265**: 2514-2517.
- Tang G., Reinhart B.J., Bartel D.P. et Zamore P.D.** (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* **17**: 49-63.
- Thazhath R., Liu C. et Gaertig J.** (2002). Polyglycylation domain of β -tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in *Tetrahymena*. *Nat. Cell Biol.* **4**: 256-259.
- Timmons L. et Fire A.** (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**: 854.
- Timmons L., Court D.L. et Fire A.** (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**: 103-112.
- Tomari Y. et Zamore P.D.** (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* **19**: 517-529.
- Towbin H., Staehelin T. et Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.
- Traub P. et Shoeman R.L.** (1994). Intermediate filament proteins: cytoskeletal elements with gene-regulatory function. *Int. Rev. Cytol.* **154**: 1-103.
- Tuschl T., Zamore P.D., Lehmann R., Bartel D.P. et Sharp P.A.** (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev.* **13**: 3191-3197.
- Ueno H., Gonda K., Takeda T. et Numata O.** (2003). Identification of elongation factor-1 α as a Ca²⁺/calmodulin-binding protein in *Tetrahymena* cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **55**: 51-60.
- Ullu E., Tschudi C. et Chakraborty T.** (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell. Microbiol.* **6**: 509-519.
- Uyeda T.Q.P., Kitayama C. et Yumura S.** (2000). Myosin II-independent cytokinesis in *Dictyostelium*: its mechanism and implications. *Cell Struct. Funct.* **25**: 1-10.
- Van Houdt H., Bleys A. et Depicker A.** (2003). RNA target sequences promote spreading of RNA silencing. *Plant Physiol.* **131**: 245-253.

- Vaucheret H., Béclin C. et Fagard M.** (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* **114**: 3083-3091.
- Vaudaux P.** (1976). Isolation and identification of specific cortical proteins in *Tetrahymena pyriformis* strain GL. *Protozool.* **23**: 458-464.
- Vayssié L., Sperling L. et Madeddu L.** (1997). Characterization of multigene families in the micronuclear genome of *Paramecium tetraurelia* reveals a germline specific sequence in an intron of a centrin gene. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1036-1041.
- Vayssié L., Garreau de Loubresse N. et Sperling L.** (2001). Growth and form of secretory granules involves stepwise assembly but not differential sorting of a family of secretory proteins in *Paramecium*. *J. Cell Sci.* **114**: 875-886.
- Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R., Lepers C., Gascioli V., Mallory A.C., Hilbert J.L., Bartel D.P. et Crete P.** (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol. Cell* **16**: 69-79.
- Viel A.** (1999). α -actinin and spectrin structures: an unfolding family story. *FEBS Lett.* **460**: 391-394.
- Voet D. et Voet J.G.** (1998). *Biochimie* 2^e ed. De Boeck Université s.a., Paris.
- Volpe T.A., Kidner C., Hall I.M., Teng G., Grewal S.I.S. et Martienssen R.A.** (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**: 1833-1837.
- Weber I., Gerisch G., Heizer C., Murphy J., Badelt K., Stock A., Schwartz J.M. et Faix J.** (1999). Cytokinesis mediated through the recruitment of cortexillins into the cleavage furrow. *EMBO J.* **18**: 586-594.
- Wehland J., Schröder H.C. et Weber K.** (1984). Amino acid sequence requirements in the epitope recognized by the α -tubulin-specific rat monoclonal antibody YL 1/2. *EMBO J.* **3**: 1295-1300.
- Westermann S. et Weber K.** (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 938-947.
- Wilkes D.E. et Otto J.J.** (2003). Profilin functions in cytokinesis, nuclear positioning, and stomatogenesis in *Tetrahymena thermophila*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**:252-262.
- Williams N.E., Vaudaux P.E. et Skriver L.** (1979). Cytoskeletal proteins of the cell surface in *Tetrahymena*. I. Identification and localization of major proteins. *Exp. Cell Res.* **123**: 311-320.
- Williams N.E., Buhse Jr. H.E. et Smith M.G.** (1984). Protein similarities in the genus *Tetrahymena* and a description of *Tetrahymena leucophrys* n. sp. *J. Protozool.* **31**: 313-321.
- Williams N.E., Honts J.E. et Jaeckel-Williams R.F.** (1987). Regional differentiation of the membrane skeleton in *Tetrahymena*. *J. Cell Sci.* **87**: 457-463.
- Williams N.E., Honts J.E., Lu Q., Olson C.L. et Moore K.C.** (1989). Identification and localization of major cortical proteins in the ciliated protozoan, *Euplotes eurystomus*. *J. Cell Sci.* **92**: 433-439.
- Williams N.E., Honts J.E. et Kaczanowska J.** (1990). The formation of basal body domains in the membrane skeleton of *Tetrahymena*. *Development* **109**: 935-942.
- Williams N.E.** (1991). A comparison of alveolar plate proteins in two species of *Euplotes*. *Eur. J. Protistol.* **27**: 21-25.
- Williams N.E., Honts J.E., Dress V.M., Nelsen E.M. et Frankel J.** (1995). Monoclonal antibodies reveal complex structure in the membrane skeleton of *Tetrahymena*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**: 422-427.
- Williams N.E.** (2004). The epiplasm gene *EPCI* influences cell shape and cortical pattern in *Tetrahymena thermophila*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**: 201-206.

Williams S.A., Hosein R.E., Garces J.A. et Gavin R.H. (2000). *MYO1*, a novel, unconventional myosin gene affects endocytosis and macronuclear elongation in *Tetrahymena thermophila*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**: 561-568.

Williams S.A. et Gavin R.H. (2005). Myosin genes in *Tetrahymena*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **61**: 237-243.

Wuitschick J.D. et Karrer K.M. (1999). Analysis of genomic G + C content, codon usage, initiator codon context and translation termination sites in *Tetrahymena thermophila*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**: 239-247.

Xia L., Hai B., Gao Y., Burnette D., Thazhath R., Duan J., Bré M.H., Levilliers N., Gorovsky M.A. et Gaertig J. (2000). Polyglycylation of tubulin is essential and affects cell motility and division in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Biol.* **149**: 1097-1106.

Zagulski M., Nowak J.K., Le Mouël A., Nowacki M., Migdalski A., Gromadka R., Noël B., Blanc I., Dessen P., Wincker P., Keller A.M., Cohen J., Meyer E. et Sperling L. (2004). High coding density on the largest *Paramecium tetraurelia* somatic chromosome. *Curr. Biol.* **14**: 1397-1404.

ANNEXES

POSTER N° 1

2^e meeting ELSO, Nice (2002).

POMEL S., DIOGON M., BOUCHARD P. et VIGUES B.

"Evidence for an immunoanalog of articulins in the membrane skeleton of the ciliated protozoan *Paramecium tetraurelia*".

Evidence for an immunoanalog of articulins in the membrane skeleton of the ciliated protozoan *Paramecium tetraurelia*

The membrane skeleton in Ciliates : organization and recent data on constitutive proteins in *Pseudomicrothorax*, *Tetrahymena* and *Paramecium*

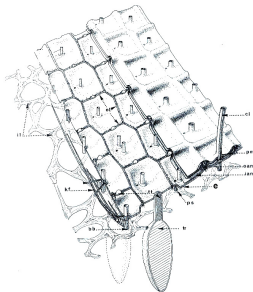


Figure 1 : Schematic representation of the cell cortex in ciliated protozoan. The membrane skeleton, also called epiplasm (e), is associated to the cytoplasmic face of the innermost compound of the cell membrane complex i.e. the inner alveolar membrane (iam). bb : basal-bodies, ci : cilia, pm : plasma membrane, kf : kinetodesmal fibers, tr : trichocysts.

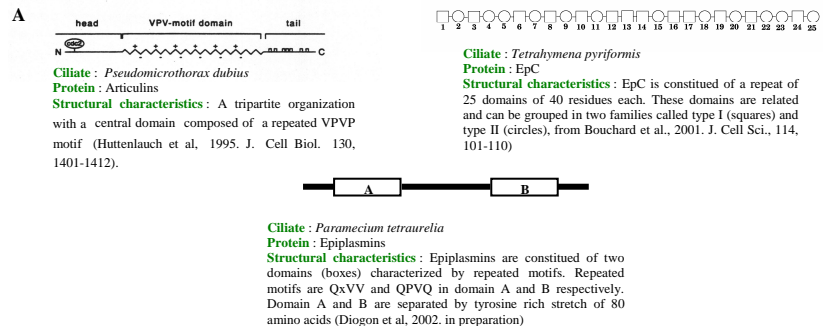


Figure 2 : Sequenced major membrane skeletal proteins belong to three distinct structural categories. Articulins have been disclosed in *Pseudomicrothorax dubius* (A), EpC in *Tetrahymena pyriformis* (B) and epiplasmins in *Paramecium tetraurelia* (C).

Objective of this study : taken together the above summarized data suggests that ciliates elaborate their membrane skeleton from a genus-specific set of proteins. Preliminary evidence against this concept arose from a previous study demonstrating articulin immunoanalogs among *Paramecium* cortical proteins, as judged by cell fractionation and western blot analysis (Huttenlauch et al., 1998, J. Cell Sci., 111, 3367-3378). In the present study we have used the same antibody raised against *Pseudomicrothorax* articulins in order to develop immunoprecipitation and immunolocalization experiments. The results are presented below.

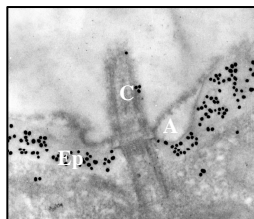


Figure 3 : Immunoelectron-microscopy shows the specificity of anti-articulin antibody. This section of *Pseudomicrothorax* cell cortex were treated by anti-articulin antibody (antibody 018 kindly provided by Dr R. K. Peck, University of Geneva), then by anti IgG secondary antibody coupled to colloidal gold particles. Antibody 018 stains the membrane skeleton which is particularly conspicuous in *Pseudomicrothorax*. Ep: epiplasm ; C: cilia ; AL: alveolar system

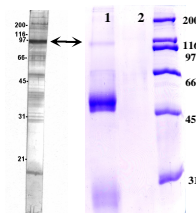


Figure 4 : Identification of a *Paramecium* 96 kDa articulin immunoanalog using western blot and immunoprecipitation experiments.

A : Western blot analysis. Protein components of *Paramecium* isolated cortices were separated by SDS-PAGE then transferred to PVDF membranes. Immunoblotting reveals a 96 kDa articulin immunoanalog. Some protein bands of lower molecular weight (30-48 kDa) are also evident on the blot.
B : Indirect immunoprecipitation using protein A immobilized on Sepharose beads. Proteins of isolated cortices were dissociated according to the "detergent method" (described in Bouchard et al., 1998, Eur. J. Protistol. 34, 138-147) and processed for immunoprecipitation of potential articulin immunoanalogs. Components of the resulting immunocomplex were separated by SDS-PAGE. Note the presence of the 96 kDa antigen (arrow). This band was absent in control experiments in which protein A was omitted (slot 2). Slots on the right side of the figure correspond to molecular weight markers.

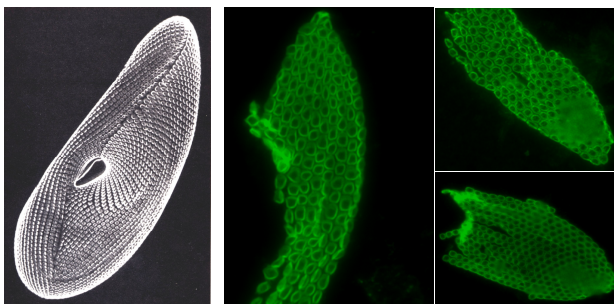


Figure 5 : Comparison of immunofluorescence patterns provided by anti-epiplasmin and anti-articulin in permeabilized cells of *Paramecium tetraurelia*. Figure A shows the distribution of epiplasmins, the major membrane skeletal protein in *Paramecium tetraurelia* (photothèque CNRS). Epiplasmins form individual scale-like structures centered around each ciliary unit. Figures B, C and D show immunofluorescence pattern provided by anti-articulin antibody. Clearly, the distribution of epiplasmins and articulin immunoanalogs overlaps at the periphery of the scales.

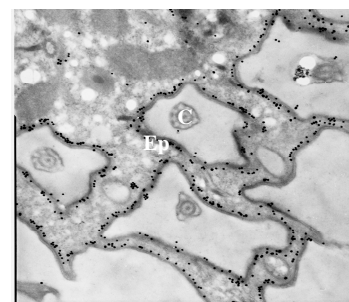


Figure 6 : Ultrastructural localization of the 96 kDa articulin immunoanalog in the cell cortex of *Paramecium*. Thin sections were processed for immunogold labelling as described in Figure 3. Note that gold particle deposits are localized beneath the inner alveolar membrane which is the expected localization for an epiplasmic membrane skeletal protein. Ep : epiplasm ; C : cilia.

Conclusion : the present study suggests the coexistence of epiplasmins and articulins in the membrane skeleton of the ciliate *Paramecium tetraurelia*. We note that articulin immunoanalogs are not distributed throughout the epiplasmic membrane skeleton but appears to be restricted to the periphery of epiplasmic scales. Such a regional differentiation within the membrane skeleton of *Paramecium* is of intrinsic interest, but it could also contribute to an understanding of molecular mechanisms by which ciliates position and regulate cortical structures.

POSTER N° 2

**4^e biennale de Parasitologie et 41^e meeting du GPLF,
Clermont-Ferrand (2003).**

**POMEL S., DIOGON M., BOUCHARD P., BAYLE D.,
RAVET V., HENOU C. et VIGUES B.**

"Squelette membranaire et cytocinèse chez le protozoaires cilié
Paramecium tetraurelia".

Squelette membranaire et cytocinèse chez le protozoaire cilié *Paramecium tetraurelia*

Pomel S., Diogon M., Bouchard P., Bayle D., Ravet V., Henou C & B. Viguès
Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Univ. Blaise Pascal, 63177, Aubière

PROBLEMATIQUE : Une des thématiques abordées par l'équipe "Cytosquelette et Morphogenèse" du Laboratoire de Biologie des Protistes est le rôle du squelette membranaire, également appelé épiplasma, dans l'organisation corticale, la morphogenèse et la cytocinèse chez le protozoaire cilié *Paramecium tetraurelia*. L'objectif principal est la caractérisation moléculaire des protéines épiplasmiques de *P. tetraurelia* et leur analyse fonctionnelle via le processus de RNAi.

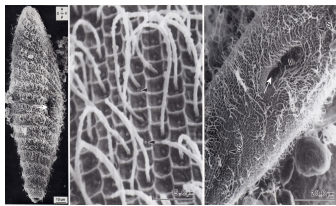


Fig 1 : Organisation corticale chez la paramécie
L'architecture de surface de la paramécie est constituée de plusieurs milliers d'unités corticales centrées autour des corps basaux (têtes de flèches) et disposées en rangées adjacentes longitudinales. Cette architecture élémentaire est façonnée au sein d'un pattern polarisé dont le principal centre d'asymétrie est l'appareil buccal (flèches).

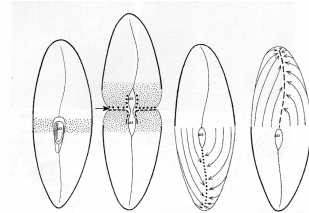


Fig 2 : Morphogenèse de division et cytocinèse
Très tôt lors de la division, un sillon transverse apparaît dans la région médiane séparant la paramécie en deux demi-cellules de formes et de motifs différents. Chaque cellule fille devra reconstruire le motif de la cellule parentale par "épimorphoses" distinctes et complémentaires. AO : appareil oral

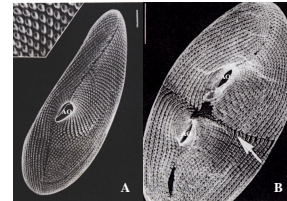


Fig 3 : L'épiplasma : organisation et dynamique lors de la division
A : Chez la paramécie, l'épiplasma visualisé par immunofluorescence (anticorps monoclonal CTS32) est discontinu et constitué d'écailles qui se superposent aux unités corticales. B : Lors de la division, une nouvelle écaille s'interpose entre deux anciennes (croissance intussusceptive) dans les deux futures cellules filles. Les protéines épiplasmiques sont absentes de la région correspondant au sillon de division (flèche) qui apparaît en négatif dans le plan équatorial de la cellule. AO : appareil oral

OUTILS

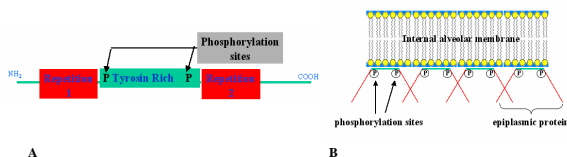


Fig 4 : Caractérisation moléculaire de deux épiplasmiques chez *P. tetraurelia*
Deux épiplasmiques ont pu être clonées et séquencées chez *P. tetraurelia*. Les deux protéines (p33 et p34) présentent plus de 90% d'homologie entre elles et se caractérisent par une organisation tripartite (A) constituée d'une région centrale riche en tyrosines (vert) et de deux régions flanquantes comprenant de courtes répétitions (rouge). Deux sites de phosphorylation potentiels se situent à la charnière entre les régions latérales et la région centrale. Sur la base de ces caractéristiques, un modèle théorique (B) a pu être proposé, impliquant la région centrale (vert) dans l'association avec la membrane alvéolaire interne et les régions latérales (rouge) dans les interactions entre épiplasmiques.

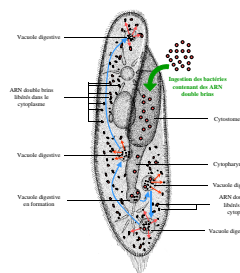


Fig 5 : Le RNAi peut être induit par la méthode de "feeding" chez la paramécie
La stratégie pour induire le RNAi consiste à nourrir la cellule (flèche verte) au moyen de bactéries produisant des ARN double brins (spots rouges). Les bactéries sont lysées à l'intérieur des vacuoles digestives et les ARN double brins sont libérés dans le cytoplasme déclenchant ainsi le RNAi.

RESULTATS

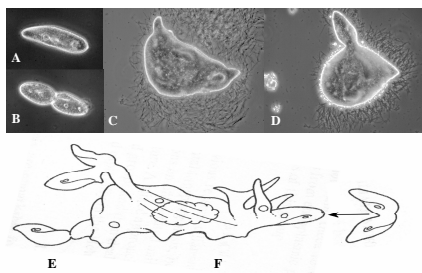


Fig 6 : Phénotype obtenu par RNAi de l'épiplasmine p33
Ce phénotype (C-F) se caractérise par des tentatives de cytocinèse systématiquement vouées à l'échec, alors que dans les mêmes conditions, les cellules témoins (ingestion de bactéries transformées par le vecteur sans insert, ou transformées par le vecteur avec insert mais non induites par l'HIPTO) se divisent normalement (A, B). C et D : Phénotypes obtenus 48 h après induction. E et F : Schéma des phénotypes obtenus 24 h (E) et 60 h (F) après induction. Phénotypes et cellules témoins sont présentés au même grossissement.

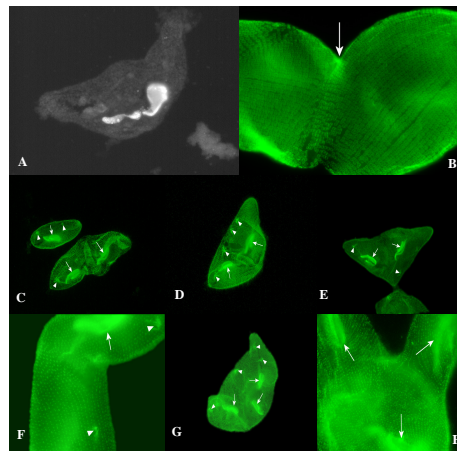


Fig 7 : Analyse du "phénotype p33" par microscopie à fluorescence
Les observations ont été réalisées 24 heures (A-F) et 40 heures (G et H) après induction. Les cellules sont colorées par le DAPI (A), par l'anticorps monoclonal CTS32 (B) qui décore les écailles épiplasmiques et par l'anticorps monoclonal anti-tubuline ID5 (C-F) qui décore les corps basaux, les microtubules des vacuoles pulsatiles (tête de flèche) ainsi que ceux de la fibre post-orale.

L'anticorps CTS 32 montre que l'organisation de l'épiplasma (écailles) n'est pas affecté par le RNAi de l'épiplasmine p33. L'épiplasma n'est pas désassemblé au niveau de l'ébauche du sillon de division (flèche - comparer avec la fig 3B). L'utilisation de l'anticorps anti-tubuline ID5 conduit aux mêmes conclusions et révèle la présence de plusieurs appareils oraux (flèche) témoignant des différentes tentatives de division avortées de la cellule.

CONCLUSION : Les résultats présentés dans cette étude suggèrent un rôle important de la protéine p33 dans le processus de cytocinèse chez la paramécie. L'induction du phénomène de RNAi pour le gène de cette protéine affecte la genèse du sillon de division qui est un préalable à la mise en place de l'anneau de constriction. L'analyse des effets attendus au niveau moléculaire (sous-expression de la protéine p33 et dégradation de son ARNm) est actuellement en cours.

POSTER N°3

**18^e meeting du Forum Européen du Cytosquelette,
Gosau (2003).**

**POMEL S., DIOGON M., BOUCHARD P., RAVET V.,
HENOU C. et VIGUES B.**

"Membrane skeletal proteins in *Paramecium* : evidence for a role in establishing the cleavage furrow during cytokinesis".

Membrane skeletal proteins in *Paramecium tetraurelia* : evidence for a role in establishing the cleavage furrow during cytokinesis

Pomel S., Diogon M., Bouchard P., Bayle D., Ravet V., Henou C & B. Viguès
Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, U.B.P., 63177, Aubière, France

INTRODUCTION : RNA interference (RNAi) is a process triggered by double-stranded RNA (dsRNA) which lead to mRNA sequence-specific degradation and post-transcriptional silencing of a target gene. In *Paramecium* the process can be induced by feeding the cells on bacteria designed for producing dsRNA of interest. This approach was used for a functional analysis of membrane skeletal proteins, the epiplasmins, thought to maintain the pattern of cortical organization and guidelines for cell morphogenesis in *P. tetraurelia*.

CELL CORTEX, MORPHOGENESIS AND MEMBRANE SKELETON (EPIPLASM) IN *PARAMECIUM*

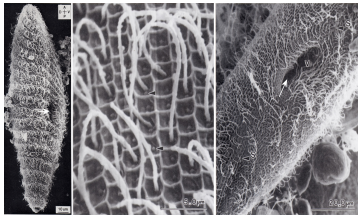


Fig 1 : Cortical organization in *Paramecium*. The cell surface of *Paramecium* is constituted of many thousands cortical units centered on basal bodies (arrow heads) and arranged in longitudinal adjacent rows. This elementary architecture is fashioned in a polarized pattern in which the main asymmetry center is the oral apparatus (arrows).

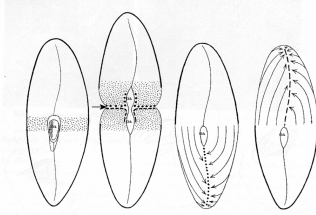


Fig 2 : Morphogenesis of division and cytokinesis. Early in cell division, a transverse furrow appears in the median region separating *Paramecium* in two half-cells of different shapes and patterns. Each daughter cell has to reconstruct the parental cell pattern by distinct and complementary "epimorphosis". OA : Oral Apparatus.

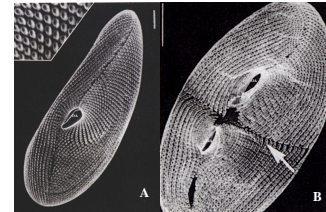


Fig 3 : The epiplasm : organization and dynamics during cell division. **A** : As visualized by immunofluorescence (mAb CTS 32), the epiplasm is discontinuous and constituted of scales superposed to the cortical units. **B** : At the time of cell division, new scales are interposed between old ones in the two future daughter cells. Epiplasmic proteins are absent from the region corresponding to the division furrow (arrow) which appears in negative in the equatorial plan of the cell. OA : Oral Apparatus

MATERIALS AND METHODS

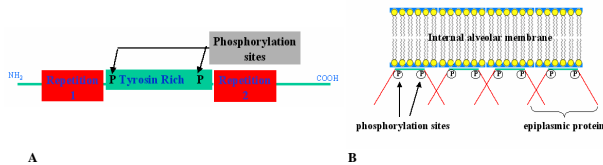


Fig 4 : Molecular characterization of two epiplasmins in *P. tetraurelia*. Two epiplasm genes have been cloned and sequenced in *P. tetraurelia*. The corresponding proteins (p33 and p34) display more than 90% homology and are characterized by a tripartite organization (A) comprising a tyrosine-rich central region (green) and two flanking regions including short repetitions (red). Two potential phosphorylation sites are located at the junction between the central regions and lateral ones. At the basis of these characteristics a theoretic model (B) has been proposed, involving a central region (green) in linkage to internal alveolar membrane and lateral regions (red) in interactions between epiplasmic proteins.

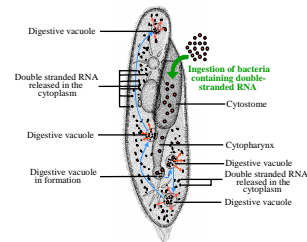


Fig 5 : RNAi can be induced by "feeding" in *Paramecium*. A convenient way to induce RNAi in *Paramecium* consists in feeding cells (green arrow) on bacteria producing double-stranded RNA (red spots). In digestive vacuoles, bacteria are lysed and double-stranded RNA is released in the cytoplasm thus triggering the RNAi process.

RESULTS

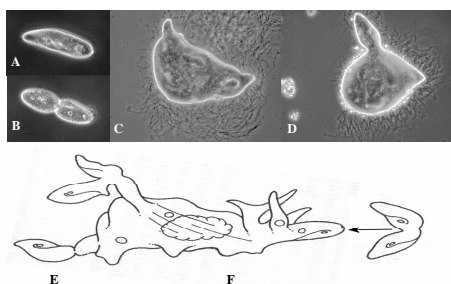


Fig 6 : Phenotype obtained by RNAi of p33 epiplasm. The phenotype is characterized by cells that are no longer capable of carrying out cytokinesis, whereas in the same conditions, cells from control samples (ingestion of bacteria transformed by the vector without insert or transformed by the vector with insert but not induced by IPTG) divide normally (A, B). C and D : phenotypes obtained 48 h after induction. E and F : Schematic representation of phenotypes obtained 24 h (E) and 60 h (F) after induction. Phenotypes (C-F) and non-induced cells (A, B) are shown at the same magnification.

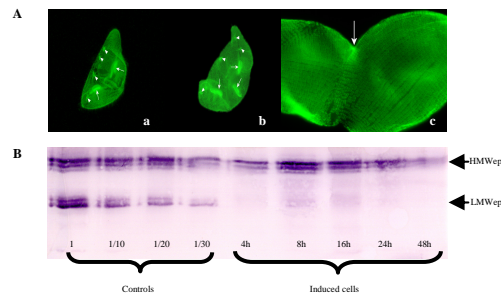


Fig 7 : Analysis of "p33 phenotype" by fluorescence microscopy and Western blot. **A**) Observations have been realized 24 hours (a and c) and 40 hours (b) after induction. Cells are labelled by ID5 anti-tubulin monoclonal antibody (a-b) which decorates basal bodies and microtubules from pulsatile vacuoles (arrow head) and post-oral fiber, and by CTS 32 anti-epiplasm monoclonal antibody (c) which decorates the epiplasmic scales. CTS 32 antibody shows that organization of epiplasmic scales is not affected by RNAi of p33 epiplasm. The epiplasm is not disassembled in presumptive region of the division furrow (arrow - compare with fig 3B). Labelling by ID5 leads to the same conclusions and reveals the presence of many oral apparatuses (arrows) which indicates successive abortive fissions. **B**) Immunodetection by CTS 32 of epiplasmins in control samples (non-induced cells) and cell populations collected at different times after induction. The antibody recognizes two sets of epiplasmins here referred to as HMWep (40-45 kDa) and LMWep to which p33 belongs. Proteins from non-induced cells were loaded at four serial dilutions. Clearly, the ratio HMWep/LMWep considerably increases in induced cells which strongly supports the view that proteins silenced by p33 epiplasm RNAi are those comprised in LMWep group.

CONCLUSION : The results presented in this study indicate an important role for epiplasmins in establishing the path of the cleavage furrow in *P. tetraurelia*. Western blot analysis suggests that abortive fissions may be correlated to a RNAi-mediated cosuppression of p33 and homologous proteins (e. g. p34 epiplasm) occurring in the LMWep group. Molecular characterization of these proteins would be of great interest. Sequencing of *Paramecium* genome, which is in progress, should help in this topic.

RESUME

Le cortex de la plupart des protozoaires ciliés contient un squelette membranaire dont le principal élément est l'épiplasme, une structure apposée à la membrane alvéolaire interne. Chez la paramécie, l'épiplasme se présente sous forme d'écailles indépendantes disposées autour de chaque appareil ciliaire et composées d'une multitude de protéines appelées épiplasmines.

Dans une première partie, nous avons contribué à l'annotation du génome macronucléaire de *Paramecium tetraurelia* à partir de la séquence de deux épiplasmines (*EPI-1* et *EPI-2*) et identifié 39 gènes supplémentaires. Deux gènes orthologues ont également été identifiés chez *Tetrahymena thermophila*. L'analyse structurale des 43 séquences indique que la signature de cette nouvelle famille multigénique est un domaine de 79 acides aminés flanqué de deux régions variables riches en résidus Q, P et V. L'analyse phylogénétique au sein de cette famille a permis de confirmer l'existence de 3 sous-familles (sur un total de 4), préalablement déterminées sur la base de critères biochimiques. L'expression de l'épiplasmine 1 couplée à la GFP confirme la localisation de cette protéine au niveau des écailles épiplasmiques ainsi qu'au niveau de structures orales apparentées.

La deuxième partie porte sur l'analyse fonctionnelle d'épiplasmines à partir d'une approche ARN interférence. Suite à l'ingestion de bactéries produisant des ARN double-brins homologues aux séquences codantes de *EPI-1* et/ou *EPI-2*, nous avons obtenu un phénotype nommé "boomerang" caractérisé par un blocage répété de la cytokinèse conduisant à des organismes "monstrueux" qui sont finalement lysés après 72 heures d'induction. L'analyse du phénotype en microscopie à fluorescence a confirmé l'absence de sillon de division et a révélé plusieurs anomalies dans les processus de morphogénèse corticale et de karyocinèse.

Enfin, la production d'un nouvel anticorps dirigé contre deux peptides issus des séquences d'épiplasmines 1 et 2 et marquant l'épiplasme de la paramécie nous a permis de mettre en évidence l'extinction d'une sous-famille d'épiplasmines suite à l'induction du phénotype "boomerang". L'épitope de l'anticorps monoclonal CTS-32 reconnaissant l'ensemble des épiplasmines n'est pas contenu dans les peptides 1 et 2.

ABSTRACT

The cortex of most ciliated protozoa encloses a membrane skeleton including the epiplasm, a sub-membranous layer extending underneath the cytoplasmic face of the inner alveolar membrane. In *Paramecium*, epiplasmic scales are centered around ciliary units and are composed of a complex set of proteins named epiplasmins.

In the first part of this study, using the sequence of two epiplasmins (*EPI-1* and *EPI-2*), we have contributed to the annotation of *Paramecium tetraurelia* macronuclear genome and identified 39 additional sequences. Two orthologous sequences were found in the *Tetrahymena thermophila* genome. Structural analysis of the 43 sequences indicates that the hallmark of this new multigenic family is a 79 amino acids domain flanked by two Q, P and V-rich stretches of sequence that are much more variable in amino-acid composition. A phylogenetic analysis confirmed the existence of 3 sub-families (on a total of 4) that were previously determined on the basis of distinct biochemical properties. The expression of GFP-tagged epiplasmin 1 showed significant labelling of epiplasmic scales and oral structures as well.

The second part concerns the functional analysis of epiplasmins using an RNA interference approach. Following the ingestion of bacteria producing double-stranded RNA homologous to the *EPI-1* and/or *EPI-2* coding sequences, we obtained a phenotype named "boomerang" characterized by repeated blockages of cytokinesis leading to monstrous organisms which are finally lysed after 72 hours of induction. The analysis of induced cells by fluorescence microscopy revealed multiple abnormalities in cortical morphogenesis and karyokinesis processes despite the normal progression of some mechanisms like oral apparatus duplication.

Finally, the production of a novel antibody raised against 2 peptides (1 and 2) included in epiplasmins 1 and 2 sequences, and decorating the epiplasm of *Paramecium*, allowed us to evidence the co-suppression of a sub-family of epiplasmins following the "boomerang" phenotype induction. The epitope of the monoclonal antibody (CTS-32) which labels the overall family of epiplasmins is not contained in peptides 1 and 2.