



DOUBLE ROLE DE LA PROTEINE IFT57 DANS LES CILS ET LE NOYAU CHEZ LA PARAMECIE

Lei SHI

Doctorat de l'Université Paris-Sud 11

Centre de Génétique Moléculaire
CNRS, avenue de la Terrasse
91198 Gif-sur-Yvette

Soutenance le 20 Septembre 2013 à Gif-sur-Yvette devant le jury :

Roland Pérasso, *Président*

Philippe Bastin, *Rapporteur*

Eric Meyer, *Rapporteur*

Jean Cohen, *Directeur de Thèse*

RESUME EN FRANÇAIS

Introduction

Les cils et flagelles eucaryotes sont des extensions cellulaires dont le squelette microtubulaire est enveloppé par un prolongement de la membrane plasmique. Ils sont nucléés par une structure centriolaire, le corps basal, dont la structure à symétrie 9 est prolongée dans le cil. Les cils et les centrioles sont vraisemblablement des organites anciens qui peuvent être tracés jusqu'aux eucaryotes ancestraux, et perdu dans certains phyla comme les plantes terrestres et certains champignons supérieurs. Chez les métazoaires, les cils se retrouvent dans presque tous les types cellulaires, soit en nombre dans les cellules multiciliées, soit de façon unique dans le cas de cils primaires. Une fonction commune à tous les cils est la sensorialité (perception de l'environnement, transduction de signaux). De plus, certains types de cellules ont des cils motiles qui provoquent un flux extracellulaire nécessaire au mouvement de la cellule dans le cas de cellules uniques ou au mouvement du milieu dans le cas d'épithélia (). L'aspect ubiquitaire des cils fait que tout dysfonctionnement aboutit à des désordres multiples. Sachant que le nombre de protéines impliquées dans la biogenèse et le fonctionnement des cils est de plusieurs centaines, de nombreuses mutations chez l'homme provoquent des syndromes ciliaires collectivement appelés ciliopathies.

Bien qu'en continuité physique avec le cytoplasme, les cils représentent un compartiment au sens large par le fait qu'à leur base, à l'extrémité distal du corps basal, se trouve une zone dite de transition servant de filtre aux composants cellulaires (solubles et membranaires) destinés à entrer dans le cil. Cette zone de transition a une structure variable d'un type cellulaire à un autre, mais une composition protéique assez conservée dans l'évolution (Reiter et al., 2012). On retrouve en particulier des protéines comme CEP290, des protéines de type MKS (impliquées dans le syndrome Meckel-Grüber) et NPHP (nephronophthisis) (Williams et al., 2011). Des protéines comme les centrines 2 et 3 ou la protéine FOR20 sont aussi présentes dans la zone de transition mais semblent plutôt être impliquées dans l'ancrage des corps basaux que dans le processus de filtrage de protéines (Aubusson-Fleury et al., 2012).

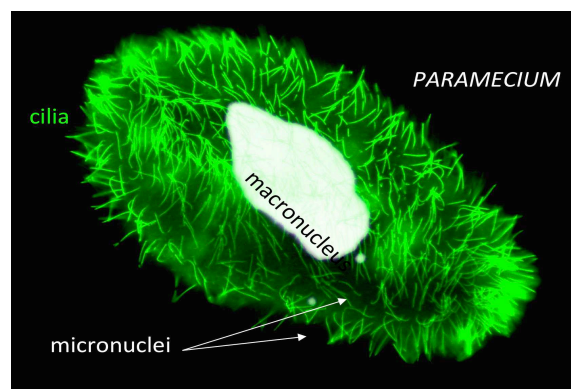
De façon intéressante, des observations récentes sur l'import ciliaires analogue à l'import nucléaire (Dishinger et al., 2010) et la structure tridimensionnelle des composants de la zone de transition comparée à celle des composants du pore nucléaire

ont permis d'imaginer une origine commune au cil et au noyau lors de l'apparition des premiers eucaryotes (Obado et Rout, 2012). Les liens fonctionnels entre cils et noyaux étaient déjà envisagés depuis plusieurs années, et c'est cet aspect qui m'a attiré vers le sujet.

La biogenèse des cils implique des complexes protéiques spécifiques (IFT pour intraflagellar transport) véhiculés par des moteurs moléculaires, la kinésine pour le transport antérograde, de la base vers la pointe, et la dynein pour le transport rétrograde (de la pointe vers la base). Le complexe IFT est composé de deux sous-complexes, le complexe A associé au transport rétrograde et à la dynéine et le complexe B associé au transport antérograde et à la kinésine.

Parmi les protéines de l'IFTB, IFT57 aussi appelée HIPPI chez l'homme a été trouvée avec une localisation et un rôle nucléaire, au moins dans certaines conditions pathologiques, la maladie de Huntington. Chez les personnes saines, la Huntingtin interagit avec Hip1 et le complexe est cytoplasmique. Dans le cas d'une Huntingtin mutée, Hip1 interagit moins bien avec elle et devient disponible pour une interaction forte avec IFT57/HIPPI et le complexe entre dans le noyau et stimule l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose (). Dès le début de mon travail de thèse sur la biogènes ciliaire chez la paramécie, j'ai observé que la protéine IFT57 avait une double localisation, dans les cils et dans le noyau. J'ai donc focalisé mon travail sur l'étude de cette protéine et étudié les interactions avec quelques autres (IFT172, IFT46, qilin, associées à l'IFTB et IFT139 associée à l'IFTA).

Mon modèle d'étude est la paramécie, unicellulaire cilié vivant en eau douce. Cette cellule possède plus de 4000 cils à sa surface qui servent à sa motilité et à la capture de nourriture.



Ces cil peuvent être détachés de façon vitale de sorte qu'il est possible de voir la ciliogénèse de façon synchrone. La paramécie offre l'avantage de pouvoir être transfectée facilement pour permettre l'expression de protéines fusionnées à la GFP (green fluorescent protein) et l'avantage de pouvoir éteindre facilement ses gènes par ARN interférence (RNAi) en lui faisant ingérer des bactéries produisant des ARN double brins correspondant au gène ciblé (méthode dite de 'feeding'). L'appareil nucléaire de la paramécie est typique du phylum des ciliés avec deux types de noyaux, micronoyaux et macronoyaux. Les micronoyaux sont des noyaux diploïdes subissant des mitoses et des méioses classiques mais silencieux tout au long du cycle. Les macronoyaux sont hautement polyploïdes (800n) et sont le siège de l'expression des gènes. Les macronoyaux ont une durée de vie limitée entre deux événements sexuels (conjugaison entre deux cellules ou autogamie au sein d'une cellule) : à la suite de la méiose et de la fécondation, deux des noyaux dérivés du noyau zygotique lors de deux mitoses se différencient en macronoyau tandis que les deux autres restent diploïdes et deviennent des micronoyaux. Pendant ce temps, l'ancien macronoyau dégénère pour disparaître lors des premières divisions cellulaires qui s'ensuivent. La différenciation en macronoyau implique une série de réarrangements de l'ADN, en parallèle avec l'amplification. Les réarrangements consistent en des délétions de 2 types. 1- Délétions imprécises qui conduisent à la fragmentation en chromosomes plus courts que les chromosomes micronucléaires. 2- Délétions précises à la base près, dans les gènes ou à l'extérieur des gènes, d'éléments appelés IES pour 'internally eliminated sequences'.

Mon travail de thèse a été d'essayer de comprendre le rôle de la protéine IFT57 chez la paramécie, d'une part dans la biogénèse et le fonctionnement des cils, et d'autre part dans les événements nucléaires chez la paramécie.

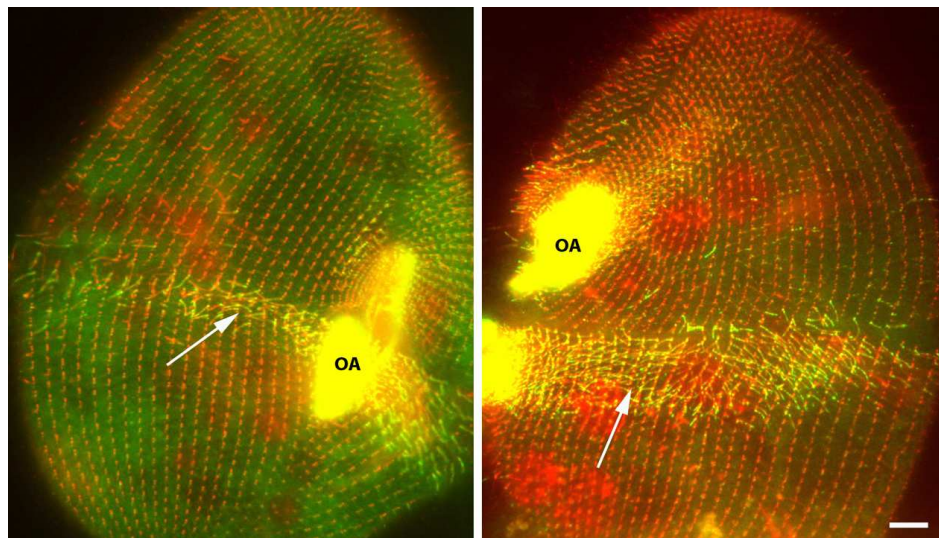
Résultats

Le génome de la paramécie *Paramecium tetraurelia* possède 4 gènes codant des protéines de type IFT57, en conséquence de deux duplications globales de génome qu'a subies cette espèce au cours de l'évolution. Les gènes issus de la duplication la plus récente (WGD1) sont très proches entre eux en séquence protéique et ont en général la même fonction. Les gènes issus de la duplication WGD2 plus ancienne peuvent avoir des divergences de fonction. Pour étudier la famille IFT57, j'ai fusionné à la GFP IFT57A et IFT57C issus de la duplication WGD2 et transformé des paramécies avec ces fusions. Les

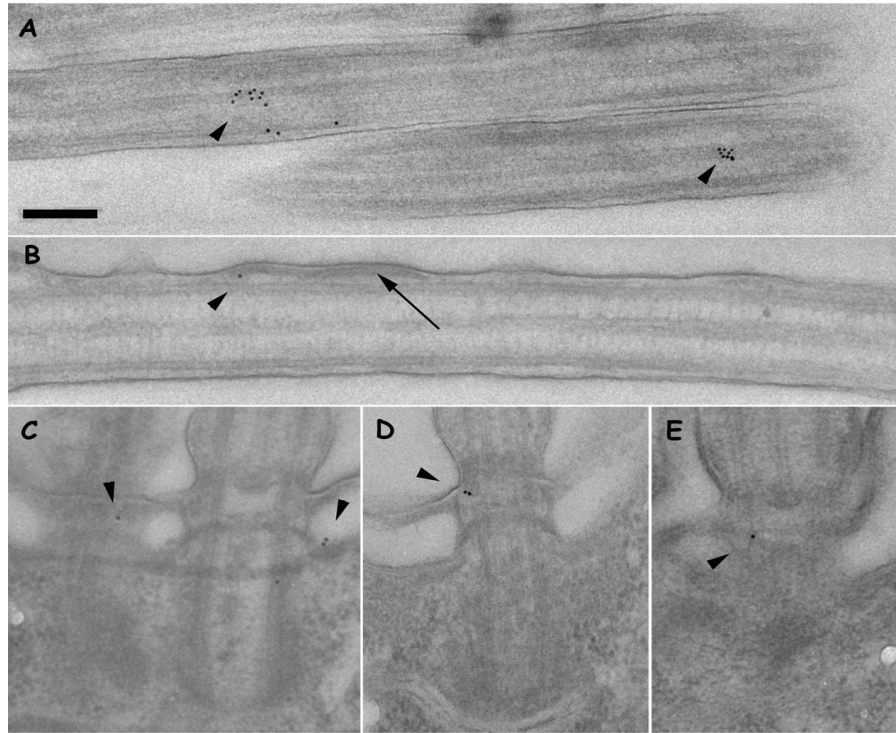
deux protéines fusion marquent le système ciliaire, et l'une d'entre elles, IFT57A-GFP marque aussi le macronoyau. J'ai donc étudié parallèlement ces deux aspects pour essayer de comprendre la fonction d'IFT57 et les différences entre IFT57A et IFT57C.

1. Rôle ciliaire d'IFT57

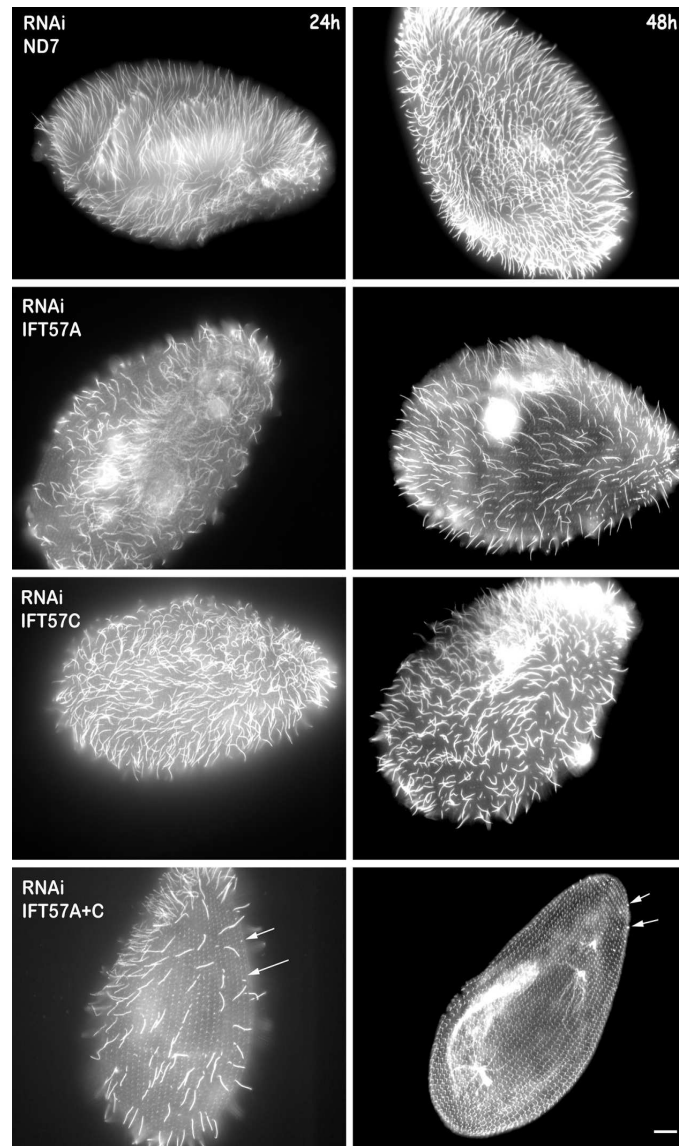
La première observation est que les 2 protéines IFT57A-GFP et IFT57C-GFP marquent très légèrement les cils et les corps basaux, mais plus fortement quelques cils courts épars sur la cellule. L'étude de cellules en division où les zones de ciliogénèse active sont connues ont permis de voir que c'étaient les cils en cours de croissance qui étaient fortement marqués.



Un traitement chimique et mécanique permet la déciliation des cellules et l'observation de la croissance de nouveaux cils. Ces cils en cours de biogenèse sont aussi fortement marqués par les protéines fusion IFT57-GFP. Les mouvements de l'IFT dans ces cils en croissance sont clairement visibles en vidéo-microscopie. L'examen de ces mêmes cellules en microscopie électronique avec un marquage anti-GFP a montré que le marquage ciliaire était au niveau de 'trains' IFT visibles entre l'axoneme et la membrane.

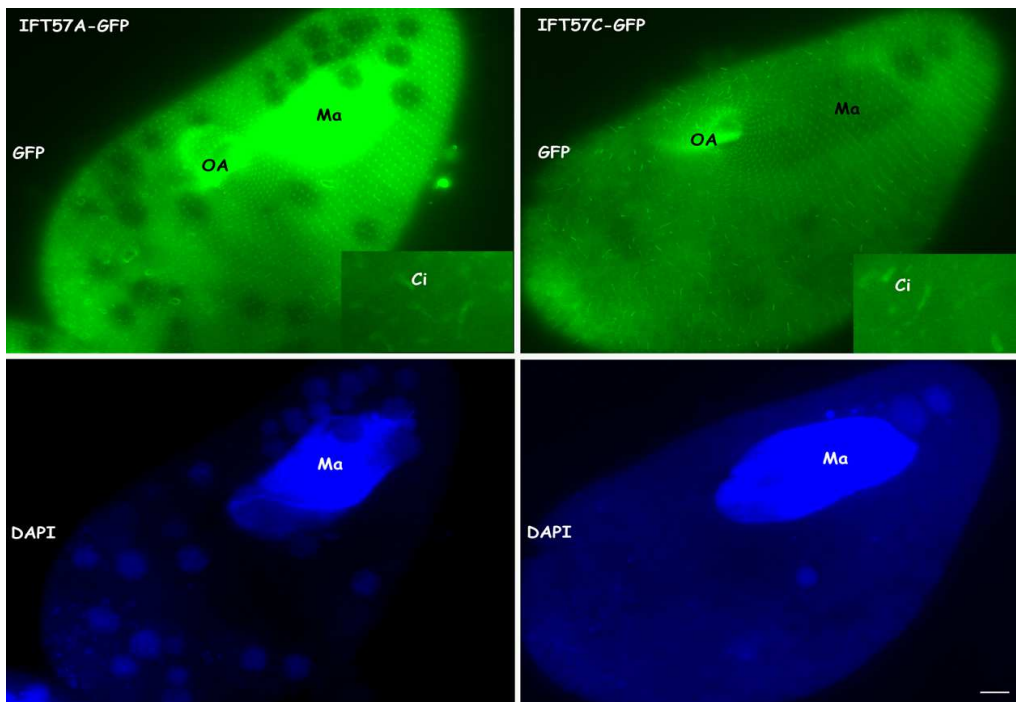


L'étude fonctionnelle par RNAi montre que l'extinction des 4 gènes est létale pour la cellule après 48h de traitement, avec une disparition totale de ses cils. L'extinction d'une paire de gènes à la fois produit un effet moins fort et ne provoque qu'une perte partielle des cils et un ralentissement de la croissance. Ceci montre qu'IFT57 est impliqué dans la croissance ciliaire. Par comparaison avec la déplétion d'une autre protéine de l'IFTB (transport antérograde), j'ai observé que IFT57 n'était pas impliqué dans la maintenance, car les cils ne raccourcissent pas en longueur quand on l'inactive (à l'opposé des cils qui raccourcissent en cas d'inactivation d'IFT46), mais les cils de taille normale sont dilués à la surface au cours des divisions cellulaires.

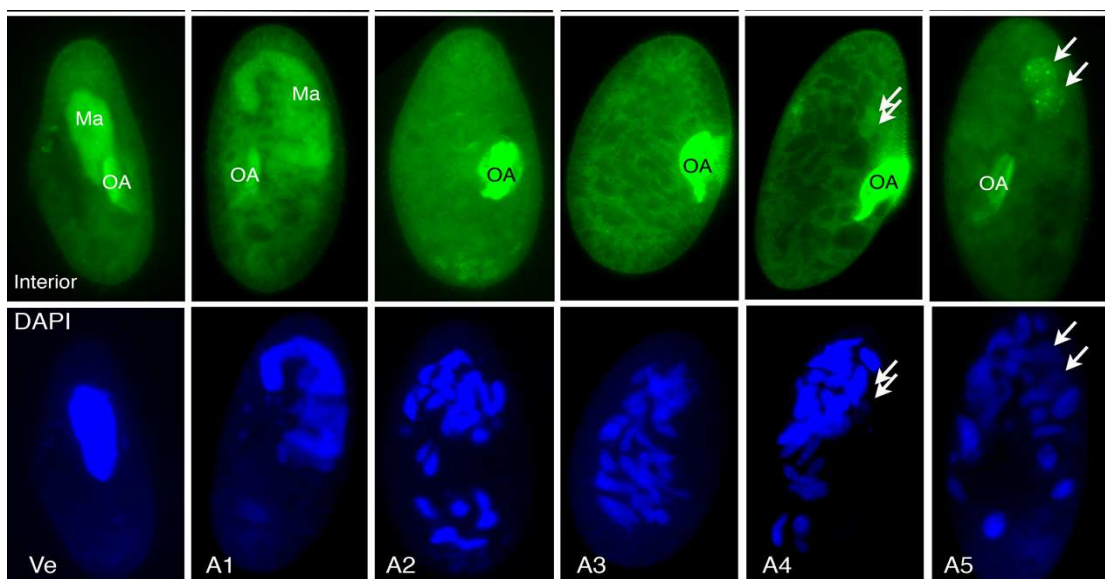


J'ai aussi abordé les interactions entre protéines de l'IFT en combinant des études de marquage par fusion GFP et de RNAi. Quand des cellules exprimant IFT57A-GFP sont soumises au RNAi du gène IFT139 (codant une protéine de l'IFT1 rétrograde), la fluorescence s'accumule au niveau de la pointe des cils, illustrant bien les deux aspects directionnel du transport ciliaire. A l'inverse, le RNAi d'IFT172 (codant une protéine de l'IFTB, antérograde) sur ces mêmes cellules empêche l'entrée de la fluorescence dans les corps basaux et les cils. Une particularité dans ces expériences a été observée avec la déplétion d'IFT46, aussi membre de l'IFTB, où le défaut d'entrée de la fluorescence dans les corps basaux est précédé par une accumulation sous la forme de particules entre les rangées ciliaires, puis à l'intérieur de la cellule. Ceci peut suggérer qu'il existe une interaction entre membres de l'IFT dans le cytoplasme avant l'entrée dans le cil.

2. Rôle nucléaire d'IFT57



Les cellules exprimant IFT57A-GFP, contrairement à celles qui expriment IFT57C-GFP, présentent une forte fluorescence de leur macronoyau. J'ai suivi ce marquage au cours des événements sexuels (autogamie) et j'ai observé un transfert de la fluorescence de l'ancien macronoyau en cours de dégradation vers le cytoplasme puis vers les nouvelles ébauches macronucléaires en formation.



Ce phénomène évoque très fortement le comportement de certaines protéines nucléaires impliquées dans l'autogamie comme PTIW109 ou NOWA1, toutes deux associées au transport de petits ARNs. Le rôle de transporteur qu'a IFT57 dans le cil permet d'émettre l'hypothèse que IFT57A est associé au transport de PTIW109, de NOWA1 ou d'autres éléments essentiels pendant l'autogamie.

J'ai donc essayé de comprendre le rôle d'IFT57 dans le noyau pendant l'autogamie en élaborant des stratégies pour inactiver les gènes sans introduire de létalité avant le déclenchement de l'autogamie.

J'ai tout d'abord essayé de mettre au point une nouvelle stratégie de silencing par expression d'ARN en épingle à cheveux (hairpin RNAi). J'ai testé que l'expression d'ARN hairpin pour la séquence du gène NSF (gène impliqué dans la fusion membranaire et la sécrétion cellulaire) sous promoteur constitutif donnait bien le phénotype attendu de létalité en 24h. J'ai ensuite exprimé ce gène sous le promoteur du gène NOWA1, spécifique de l'autogamie. J'ai bien observé une létalité au moment de l'entrée en autogamie. J'ai donc construit un vecteur d'expression du gène IFT57A sous promoteur NOWA1 pour voir si l'ARN hairpin exprimé pendant l'autogamie pouvait interférer avec le transfert d'un noyau à l'autre de PTIW109-GFP. Cependant, un phénomène inattendu est apparu. Au moment de l'entrée en autogamie, l'expression de PTIW109-GFP a bien lieu, mais le processus reste bloqué avant même l'entrée en méiose. Et ceci n'est pas spécifique d'IFT57 car j'ai pu reproduire le phénomène avec une autre séquence hairpin.

Je suis revenu à des techniques plus classiques de RNAi par 'feeding' en incubant les paramécies un temps limité dans le milieu contenant les bactéries chargées d'ARN double brin et en induisant l'autogamie par lavage et transfert dans un milieu épuisé. Dans ces conditions, l'autogamie a bien lieu, mais je n'ai pas observé de défaut majeur dans le transport de PTIW109-GFP d'un noyau vers l'autre, ni dans l'excision des IES. En revanche, le repiquage des cellules ayant subi l'autogamie dans ces conditions révèle une forte létalité post-autogame, ce qui indique que le processus a dû être perturbé d'une façon ou d'une autre.

Par ailleurs, constatant la différence de localisation entre IFT57A et IFT57C, pourtant de séquences très similaires, j'ai cherché à déterminer quel était la partie de la séquence qui déterminait la localisation nucléaire ou non d'IFT57A versus IFT57C. J'ai

construit des chimères entre ces deux gènes et j'ai réussi à cerner la région L129-N219 comme responsable de cette localisation différentielle.

Le séquençage récent des génomes de différentes espèces de paramécie ont montré que certaines espèces comme *Paramecium caudatum*, n'ont pas subi les deux dernières duplications globales de génome qu'a subies *Paramecium tetraurelia*. Il y a donc un seul gène IFT57 au lieu de quatre. J'ai entrepris l'analyse du gène IFT57 de *Paramecium caudatum* et montré que la protéine n'allait pas dans le macronoyau, comme IFT57C de *Paramecium tetraurelia*. La propriété nucléaire d'IFT57A est donc peut-être une acquisition récente postérieure aux duplications globales de génome.

Discussion

Mon travail de thèse a permis tout d'abord de révéler l'existence d'un système de transport intra ciliaire chez la paramécie conforme à ce qui est connu dans d'autres organismes, mais aussi à préciser la fonction d'IFT57, protéine peu étudiée en particulier dans les cellules multiciliées. J'ai montré qu'IFT57 était impliqué dans la ciliogénèse mais probablement pas dans la maintenance des cils, à moins qu'un blocage au sein du compartiment ciliaire au moment du RNAi ne masque sa fonction de maintenance car sa concentration intra ciliaire n'est pas affectée.

J'ai également pu mettre en évidence des interactions probables entre protéines de l'IFT au sein du cytoplasme, avant leur entrée dans le cil. Ceci est en accord avec des travaux réalisés sur la synapse immunologique de lymphocytes T.

J'ai déterminé une séquence dans la protéine IFT57A expliquant sa localisation nucléaire par comparaison avec IFT57C. Il s'agit d'environ un quart de la séquence, L129-N219, au sein de laquelle seules 3 ou 4 substitutions sont non conservatives et donc bonnes candidates pour être responsable de la différence. Une analyse du gène unique IFT57 de *Paramecium caudatum*, dont la protéine n'est pas nucléaire, semble indiquée que la propriété de localisation dans le noyau d'IFT57A est une acquisition récente.

Le marquage nucléaire d'IFT57A pendant l'autogamie évolue d'un noyau à l'autre selon un mode rappelant le transfert de protéines spécifiques liant les petits ARNs impliqués dans le développement des nouveaux macronoyaux. J'ai essayé de comprendre quel pouvait être le rôle d'IFT57A au cours de l'autogamie et j'ai trouvé que

sa déplétion était l'étale pour les cellules ayant subi le traitement, mais je n'ai pas trouvé la cause de cette létalité.

Enfin, par analyse de l'évolution de la fluorescence au cours de l'autogamie, j'ai remarqué que le cortex, et en particulier les corps basaux, étaient particulièrement marqués au moment où le marquage de l'ancien macronoyau disparaît et avant que les jeunes ébauches ne se forment. Il se pourrait que les corps basaux soient un relai pour héberger des protéines en transit. Il avait déjà été noté que des protéines telles que PTIWI09 et Dicer-like5, toutes deux impliquées dans le processus de maturation et transport de petits ARNs impliqués dans les réarrangements de génome de l'autogamie, se localisaient aux corps basaux en plus des noyaux. La protéine IFT57 pourrait être un intermédiaire pour véhiculer ces différentes localisations.