



HAL
open science

Les voies du transport intraflagellaire

Cécile Fort

► **To cite this version:**

Cécile Fort. Les voies du transport intraflagellaire. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066404 . tel-01597907v2

HAL Id: tel-01597907

<https://theses.hal.science/tel-01597907v2>

Submitted on 5 Oct 2017

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.

THÈSE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par Cécile Fort
Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

LES VOIES DU TRANSPORT INTRAFLAGELLAIRE

Le 27 Septembre 2016

Ecole doctorale : Complexité du vivant

Unité de recherche : Biologie cellulaire des Trypanosomes

Directeur de thèse : Philippe Bastin

Devant le jury composé de :

Mr Germain TRUGNAN

Mme Alice MEUNIER

Mme Sigolène MEILHAC

Mr Julien VERMOT

Mr Derrick Roy ROBINSON

Mr Philippe BASTIN

Président du jury

Examineur

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

À mes parents, à Anthony

Remerciements

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, le **Docteur Julien Vermot et le Docteur Derrick Robinson** qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que les examinateurs : le **Docteur Sigolène Meilhac et le Docteur Alice Meunier**. Je tiens à remercier chaleureusement le **Professeur Germain Trugnan** pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse et pour avoir soutenu mon dossier atypique lors du concours d'obtention d'une bourse de thèse à l'école doctorale pluridisciplinaire IVIV. Enfin, je tiens à remercier l'école doctorale Complexité Du Vivant (CDV) pour m'avoir accepté comme nouvel entrant.

Je remercie également le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et la Fondation pour la Recherche Médicale qui ont financé ces travaux de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Docteur **Philippe Bastin** pour m'avoir aidé à obtenir une bourse de thèse (ce qui n'était pas franchement gagné !) Philippe, tu as su me transmettre l'amour de la science, et tu m'as poussé à aller au-delà de mes doutes en me forçant, par exemple, à affronter dès le début de ma thèse la jungle des meetings et des présentations en anglais ! Je tiens aussi à te dire merci pour ta disponibilité, pour toutes ses longues discussions au laboratoire, dans le métro, ou par mail tardivement le soir ! Encore merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et tes encouragements dans les moments de doute, ce fut un réel plaisir de travailler dans ton équipe pendant ces 4 années !

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe de Biologie Cellulaire des Trypanosomes :

Thierry, tu m'as beaucoup appris au long de ces 4 années de thèse d'un point de vue technique et humain ! Ton aide m'a été précieuse, notamment dans la dernière ligne droite de cette aventure avec la gestion du projet Janelia (qui est encore un périple à l'heure actuelle !) et à ton investissement qui a contribué à la réussite de cette thèse. Thierry, merci pour ces si belles figures que tu as faites pour le second papier et le manuscrit de ma thèse, tu es incontestablement le roi de Photoshop !

Je tiens également à remercier chaleureusement **Sylvie** ! Sylvie, tu as été ma « maman » de substitution durant ces quatre années ! Les innombrables discussions du matin devant une tasse de café accompagnée de tes merveilleux petits gâteaux dont tu as le secret m'ont toujours donné le sourire ! Ta bonne humeur, ta gentillesse et tes fous rires ont été sources de joie. D'un point de vue scientifique, tu m'as aidée à approfondir mes connaissances dans le monde de l'infiniment petit, encore merci !

Je remercie également mes collègues de bureau, **Eloïse, Shahaan, Julien, Norus et Jamin** qui m'ont supportée pendant ces 4 ans ! Toutes ces discussions scientifiques et personnelles m'ont permis de progresser dans la vie au quotidien. Je remercie également **Serge, Brice, Christelle, Estefania, Constantin** pour leur bonne humeur et leurs précieux conseils. Je tiens particulièrement à te remercier Serge pour ta contribution à mon premier article de thèse et aux nombreux échanges scientifiques que nous avons eus ensemble.

Moara, encore merci pour ton investissement lors de ton arrivée au laboratoire. Tes compétences en microscopie électronique nous ont permis de compléter les analyses préliminaires obtenues pour le second article de ma thèse. Ta joie et ta bonne humeur égayent déjà le laboratoire et j'espère que tes nouveaux projets scientifiques et personnels aboutiront très prochainement ;-).

Aurélie, j'ai été très contente de faire ta connaissance ! Ton aide a été précieuse dans la réalisation des expériences en microscopie électronique et en BM ! Merci pour m'avoir écoutée dans les moments de doutes et pour m'avoir conseillée tout au long de ces années. Je te souhaite plein de bonheur à venir dans cette nouvelle page qui s'écrit. Profitez-en un maximum !

Mes remerciements vont également à **Benjamin** et à **Diego** ! Merci les gars pour votre bonne humeur, votre aide apportée au quotidien au laboratoire quand je recherchais des produits, des réactifs, des anticorps etc. Merci Benji pour les si bons repas de Noël partagés au labo (avec ce bon cou farci :p, j'en salive encore !) et pour ta capacité à expliquer les choses simplement. Merci Diego pour tes nombreux conseils sur la thèse en général, sur les manips que tu m'as aidées à sauver et pour toutes les petites soirées improvisées au labo à jouer de la guitare :D ! La réussite de la thèse passe aussi par tous ces bons moments, alors merci !

Je tiens à remercier **Anne** pour sa gentillesse, sa patience et son aide très très précieuse pour tous ce qui concerne la gestion administrative (préparation de mission, commandes, gestions des salles...).

Je tiens à remercier chaleureusement **Anne-Marie**, **Sergio** et **Sylvain** pour leurs analyses, leurs conseils et les nombreuses discussions en microscopie électronique. **Sylvain**, encore merci pour tous ce magnifique travail accompli pour l'analyse des datas en FIB et SBF-SEM. Je suis certaine que ce travail fera un très joli papier ! :D

Je tiens également à remercier **Jean-Yves**, pour m'avoir proposé cette sacrée future aventure (travailler dans le laboratoire de Eric Betzig !!! WWAAAOOOUUHHH :D !!!) et pour m'avoir formée sur le spinning disque. Je tiens également à remercier l'ensemble de la plate-forme de microscopie photonique et plus particulièrement **Gérard**, **Adeline** et **Perrine** pour leurs précieux conseils en microscopie électronique et leur soutien lors de mes innombrables séances de coloriage !

Adeline, un grand merci pour avoir accompli ce travail titanesque en FIB-SEM. La persévérance et le temps passé nous ont permis d'obtenir de très beaux résultats et j'espère un très beau papier ! Ta joie de vivre et tes fous-rires ont su me redonner la « patate » quand j'en avais besoin alors merci !

Carsten, merci pour ton aide précieuse et ta collaboration concernant le projet glutamylation. Tes connaissances et tes conseils nous ont permis d'obtenir de très jolis résultats, qui j'espère, feront l'objet d'une jolie publication ;-).

Mes remerciements vont également à **Sue, Louise, Robbie, Sam, et Katie** pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire à Oxford pendant plusieurs semaines et pour m'avoir aidée sur le projet SBF-SEM. Merci pour m'avoir fait découvrir le PIMS, boisson que j'affectionne maintenant ! Merci pour ces restos, pour cet accueil chaleureux et pour tous vos commentaires concernant la rédaction du second article de ma thèse.

Linda, je tiens également à te remercier pour tes nombreux conseils scientifiques et humains ! Les petits restos le midi m'ont permis de m'évader du laboratoire et de passer de très bons moments ! Ces discussions m'ont réconfortée dans le choix de tenter une nouvelle aventure en Angleterre ! Encore merci pour m'avoir montré ce que le mot enseigner veut dire !

Nico, Greg, merci pour votre soutien sans faille et vos encouragements lors de la rédaction de cette thèse qui est un vrai challenge ! **Greg**, merci pour tous ces nombreux échanges scientifiques et personnels qui m'ont beaucoup apporté pendant ces années ;-)! Tu as su à chaque fois trouver les mots pour m'encourager dans les moments de doute et je t'en remercie ! Sache que nos petits restos et nos discussions vont me manquer quand je partirai en Angleterre...

Je tiens à remercier l'ensemble de mes amis, **Antoine** (pour toutes ces nombreuses soirées à squatter dans ta maison, à manger tes supers et méga petits plats, à rattraper mon capital soleil au moment de la rédaction de la thèse ... Merci !), **Eline, Jeremy, Caro, Remy, Vincent, Emilie, Elodie, Arnaud, Didier, Christelle, Julia, Jessica, les trois Romain, Yohan, Pilou**, pour toutes ces innombrables soirées et discussions passées en votre compagnie.

Je tiens à remercier chaleureusement **Marylène, Sylvain, Pauline et Olivier** qui m'ont ouvert leur cœur, leur maison. Merci pour ce soutien sans faille, ces dimanches passés en famille et ces nombreux fous rires ! Vous allez me manquer, soyez en sur ! **Mon cœur**, merci de m'avoir soutenue pendant ces 4 années de thèse, ton amour, tes nombreuses petites attentions m'ont permis de m'épanouir dans la vie de tous les jours. Tous ces moments de partages, de voyage nous ont enrichis et continuerons à égayer notre quotidien.

Pour finir, je tiens à remercier l'ensemble de **ma famille**. Vous m'avez tous soutenu et aidé pendant toutes ces années ! **A ma cricri d'amour** =D qui partage ce lien si indéfectible ! Merci sœur pour tous ces chouettes moments à trainer dans les lego stores, à parcourir la capitale de long en large et en travers, à chiner des objets improbables et j'en passe ! **Papa, Maman**, merci de m'avoir permis de faire ces longues études, d'avoir cru en ma réussite et de m'avoir aidée à réaliser mes rêves !

Merci à tous !

Abréviations

AAT	African Animal Trypanosomiasis
ADPKD	Polykystose rénale autosomique dominante
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférent
ARPKD	Polykystose rénale autosomique récessive
ATP	Adenosine TriPhosphate
BBS	Syndrome de Bardet-Biedl
CATT	Card agglutination test for trypanosomiasis
CEP164	Protéine Centrosomale 160
CEP290	Protéine Centrosomale 290
CrEB1	Chlamydomonas microtubule End Binding protein 1
D1bLIC	Chaîne intermédiaire de la dynéine
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DHC	Chaîne lourde de la dynéine
DHC2	Chaîne lourde de la dynéine 2
DIC	Contraste interférentiel différentiel
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
EM-CCD	Electron multiplying charge-coupled device
FAZ	Zone d'attachement flagellaire
FLA1	Flagellar Attachment Glycoprotein 1
FLA10	Flagellar kinesin-like protein 10
FC	Connecteur flagellaire
FP	Poche flagellaire
FPC	Flagellar Pore Complex
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
HAT	Human African Trypanosomiasis
IDA	Inner Dynein Arm
Ig	Immunoglobulin
IFT	Transport intraflagellaire
KAP	Kinesin Associated Protein
KIF3A	Kinesin-like protein 3A
KIF3B	Kinesin-like protein 3B

MT	Microtubule
NPHP	Nephrocystine
ODA	Outer Dynein Arm
ODA16	Outer arm Dynein Assembly 16
ODF	Outer Dense Fiber
OSM3	Osmotic avoidance abnormal protein 3
PC1	Polycystine 1
PC2	Polycystine 2
PCD	Primary Ciliary Dyskinesia
PCM	Pericentriolar Material Protein
PFR	Fibre paraflagellaire
PFR1	Proteine 1 de la fibre paraflagellaire
PFR2	Proteine 2 de la fibre paraflagellaire
PIFTC3	Putative IntraFlagellar Transport protein C3
PIFTF6	Putative IntraFlagellar Transport protein F6
PKD	Polykystique des reins
RABL4	RAS in the brain-like 4
RABL5	RAS in the brain-like 5
RSP3	Radial Spoke Protein 3
RP2	Retinitis Pigmentosa 2
SHH	Sonic Hedge Hog
TF	Transition Fiber
TZ	Zone de transition
TRP	Transient Receptor Potential
VSG	Glycoproteines de surface variable
WHO	World Health Organization

Liste des figures

- Figure 1 : Diversité des cils
Figure 2 : La structure du centriole
Figure 3 : La ciliogenèse des cils primaires
Figure 4 : La zone de transition
Figure 5 : L'axonème.
Figure 6 : Les cils atypiques
Figure 7 : Les ciliopathies
Figure 8 : Localisation des protéines BBS
Figure 9 : Schéma de la structure d'un cil et localisation des protéines BBS
Figure 10 : Représentation de *Trypanosoma brucei*
- Figure 11 : Localisation et nombre de cas recensés par année de HAT
Figure 12 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*
Figure 13 : Ultrastructure du flagelle de *Trypanosoma brucei*
Figure 14 : Flagelle de *Trypanosoma brucei*
Figure 15 : Visualisation du connecteur flagellaire (FC) au niveau de l'extrémité distale du nouveau flagelle
Figure 16 : La nage en avant de *T. brucei* est nécessaire pour le déplacement des IgG-VSG vers la poche flagellaire
Figure 17 : Rôle du flagelle dans l'adhésion de *T. brucei* à l'épithélium des glandes salivaires
Figure 18 : Localisation de la tubuline tyrosinée en fonction du cycle cellulaire et duplication du FAZ chez *T. brucei*
Figure 19 : Position du connecteur flagellaire dans les cellules de type sauvage et dans les cellules *IFT88^{RNAi}* induites
Figure 20 : Modèle du transport intraflagellaire
- Figure 21 : Représentation schématique des complexes IFT-A et IFT-B chez *C. reinhardtii*
Figure 22 : L'absence d'IFT52 bloque la formation du flagelle
Figure 23 : Accumulation des protéines IFT dans le flagelle
Figure 24 : Structure et localisation du moteur kinésine II responsable du mouvement antérograde
Figure 25 : Déplacement de la tubuline dans le flagelle par IFT ou diffusion
Figure 26 : L'inhibition de l'expression de DHC1b bloque la construction du nouveau flagelle mais l'ancien flagelle reste présent
Figure 27 : Les protéines IFT-A et IFT-B sont indispensables à la formation du flagelle mais arborent différentes fonctions
Figure 28 : Localisation des nucléoporines à la base du flagelle
Figure 29 : Dynamique des IFT à la base du flagelle et dans le cil
Figure 30 : Schéma représentant les deux hypothèses du trafic des trains IFT chez *T. brucei*

- Figure 31 : Schéma de photoconversion de la KAEDE
- Figure 32 : Localisation des pools de protéines IFT dans le flagelle et proposition de schémas pour le recyclage des trains rétrograde
- Figure 33 : Dynamique de la protéine Kaede::IFT81 dans les cellules WT avant et après photoconversion
- Figure 34 : Recyclage des protéines IFT à la base du flagelle
- Figure 35 : Expression de l'ARNm codant pour les protéines flagellaires au cours du cycle cellulaire de *T. brucei*
- Figure 36 : Observation de la protéine eGFP::IFT52 au niveau des microtubules pelliculaires du corset chez *T. brucei*.
- Figure 37 : Les protéines IFT forment un anneau
- Figure 38 : Visualisation de l'expression de la protéine eGFP::IFT52 au cours du temps dans la souche eGFP::IFT52 +TdTomato::IFT81
- Figure 39 : Hypothèses de recyclage des IFT en fonction de la localisation des pool IFT
- Figure 40 : Distribution des trains IFT dans les cellules sauvages et dans la souche *IFT88^{RNAi}* induite pendant 2 jours
- Figure 41 : Suivi de l'IFT après photoblanchiment du bout distal chez la souche GFP::IFT52
- Figure 42 : Visualisation de l'accumulation des trains IFT chez le mutant *IFT140^{RNAi}*
- Figure 43 : Visualisation du transport intraflagellaire eGFP::IFT52 chez des cellules adhérentes à la poly-lysine par microscopie SIM

Introduction	1
1.1 Cils et flagelles.....	1
1.1.1 Structures.....	2
1.1.2 Les cils primaires « 9+0 »	5
1.1.3 Les cils mobiles « 9+2 »	6
1.1.4 Les autres types de cils.....	6
1.1.5 Assemblage du cil.....	7
1.2 Cils et ciliopathies.....	7
1.2.1 Fonctions liées à la motilité.....	8
1.2.2 Fonctions sensorielles	9
1.3 Construction des cils et flagelles	11
1.4 <i>Trypanosoma brucei</i> : un modèle d'étude du flagelle.....	12
1.4.1 Un parasite.....	12
1.4.2 Structure et réplication du flagelle chez le trypanosome	16
1.4.3 Fonctions du flagelle chez <i>T. brucei</i>	23
1.5 Biogénèse des cils et flagelles	27
1.5.1 Le transport intraflagellaire	29
1.5.2 Les particules IFT.....	29
1.5.3 Les moteurs IFT	33
1.5.4 Régulation de l'IFT	34
2 Problématique	39
2.1 Rôle de l'IFT dans les flagelles en maintenance	39
2.2 Entrée des IFT dans le flagelle, recyclage et échange avec le cytoplasme.....	40
2.3 Transport de la tubuline par les IFT.....	43
2.4 Les voies du transport intraflagellaire.....	44
3 Matériels et méthodes	47
4 Résultats.....	70
4.1 Le transport intraflagellaire maintient la composition du cil	70
4.1.1 Résumé de l'article.....	70
4.1.2 <i>Intraflagellar transport is required for the maintenance of the trypanosome flagellum composition but not length</i>	71
4.2 Recyclage des protéines IFT et échange avec le cytoplasme	101
4.3 Transport de la tubuline par les IFT.....	110
4.3.1 Résumé de l'article	110
4.3.2 <i>Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81</i>	110
4.4 Les voies du transport intraflagellaire.....	118
4.4.1 Résumé de l'article	118
4.4.2 Article en soumission	119
5 Conclusion et perspectives.....	157
5.1 Production des protéines IFT	157
5.2 Association et positionnement à la base du flagelle	159
5.3 Formation des trains IFT.....	162
5.4 Voyage des trains antérogrades sur les doublets 4 et 7.....	165
5.5 Contrôle de la glutamylation sur les doublets 4 et 7.....	166
5.6 Intérêt d'individualiser des doublets pour l'IFT.....	168
5.7 Transport intraflagellaire, remaniement à la pointe distale du flagelle et utilisation des microtubules A et B des doublets 4 et 7	171
5.8 Retour à la base et recyclage du matériel IFT	174
5.9 Rôle de l'ATP ?.....	175

INTRODUCTION

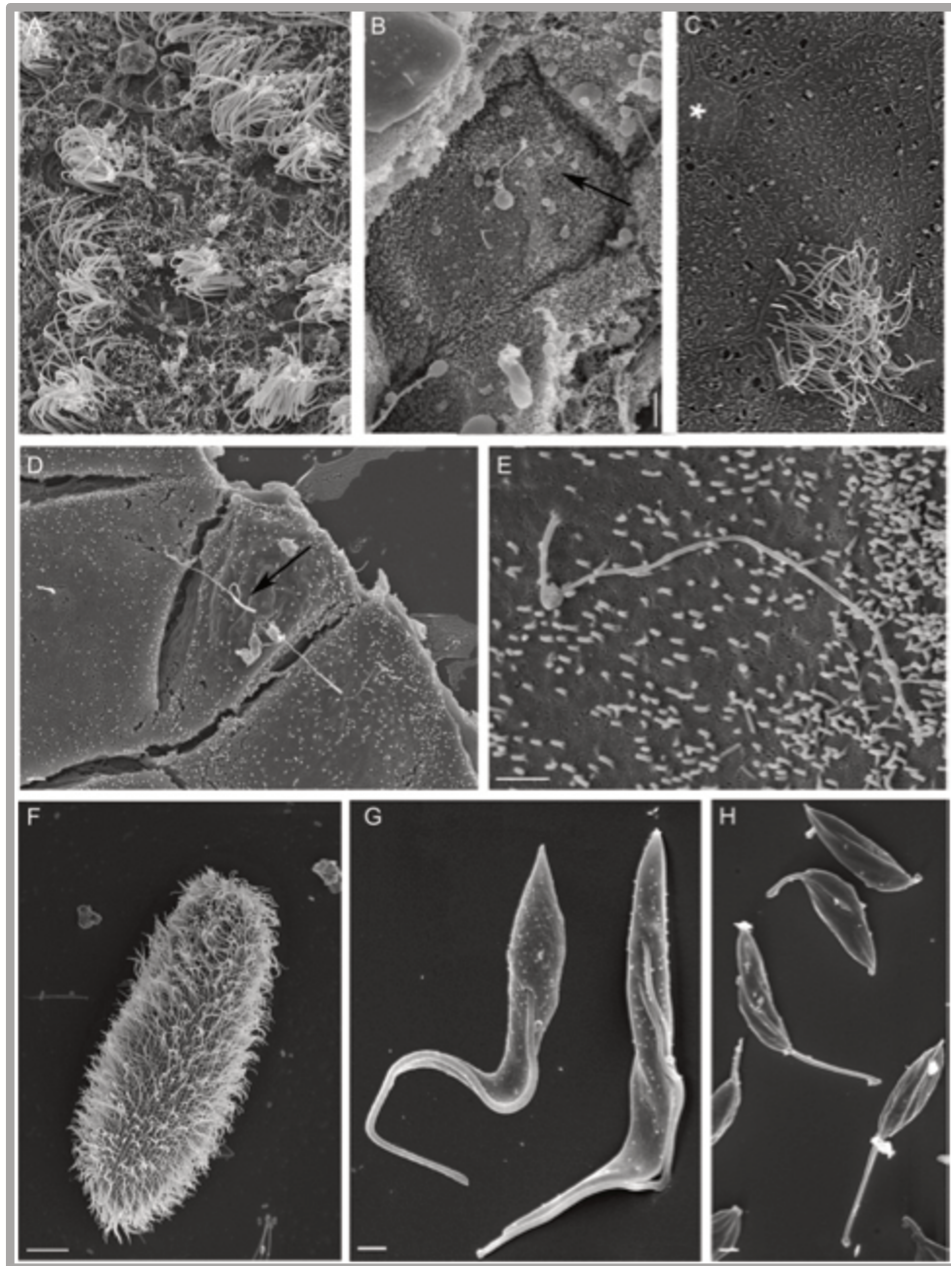


Figure 1 : Diversité des cils

A) Des touffes de cils mobiles tapissent l'épithélium du ventricule du cerveau de souris. B) Cil unique de tubule de rein de souris visualisé après cryo-fracture mécanique. C) Epithélium mucociliaire de l'épiderme de *Xenopus* (y compris une cellule multi-ciliée, une petite cellule sécrétoire (marquée par un astérisque) et plusieurs grandes cellules caliciformes). D) Cil primaire à la surface de cellules IMCD (partie interne du canal collecteur médullaire) en culture et E) d'une cellule MDCK (Mardin Darby Canine Kidney). F) *Paramecium tetraurelia* possède plus de 2 000 cils. G) *Trypanosoma brucei* forme procyclique et H) *Leishmania donovani* stade promastigote possédant chacun un seul flagelle.

Les barres d'échelles représentent 1 μm sauf pour la figure F où la barre d'échelle est de 10 μm . (Vincensini, Blisnick et al. 2011).

Introduction

Les cellules eucaryotes sont délimitées par une membrane (pour les animaux) ou une paroi (pour les végétaux) et possèdent un noyau dans lequel le génome est conservé. Le cytosol contient différents organites comme le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les lysosomes et les peroxysomes. La plupart des organismes uni ou pluricellulaires présentent à leur surface un organite complexe appelé cil ou flagelle (le terme est interchangeable) (Figure 1). Ces organites ont probablement été observés pour la première fois par Antoni van Leeuwenhoek en 1675 lorsque qu'il regarde des protistes au microscope. Selon sa description, ces organismes possèdent « des pieds incroyablement minces ou petites jambes, qui sont déplacés très prestement ». Un siècle plus tard, Otto Muller introduisit le terme de « cil » (Müller, 1786), suivi par le terme « flagelle » qui fut introduit par Dujardin (Dujardin, 1841). Dans la première moitié du 19^{ème} siècle, les cils et flagelles ont été définis par leur fonction de locomotion et de motilité. Ce n'est que dans la seconde moitié du 19^{ème} siècle qu'une nouvelle classe de cils a été décrite : les cils immobiles (Langerhans, 1876). Ces cils (appelés à l'époque « flagelles centraux ») ont été observés pour la première fois en 1898 à la surface des cellules épithéliales chez le lapin et l'homme (Zimmermann, 1898). Au cours du 20^{ème} siècle, Sorokin utilise le terme de cil primaire pour les désigner (Sorokin, 1962).

1.1 Cils et flagelles

Les cils et flagelles ont une structure commune qui est conservée au cours de l'évolution. Cette structure peut être divisée en trois zones différentes suivant un axe longitudinal. De la base au sommet se trouvent le corps basal, la zone de transition et l'axonème, une structure cylindrique composée de neuf doublets de microtubules périphériques. La longueur, la position et le nombre de cils et flagelles peuvent varier d'un organisme à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre au sein d'un même organisme. Ces organelles peuvent être classés en deux catégories : les cils mobiles et immobiles. La plupart des cils mobiles présentent une structure en « 9+2 » dans laquelle les neuf doublets de microtubules entourent une paire centrale de singulets de microtubules. Les cils non mobiles présentent en générale une structure dite en « 9+0 », sans la paire centrale.

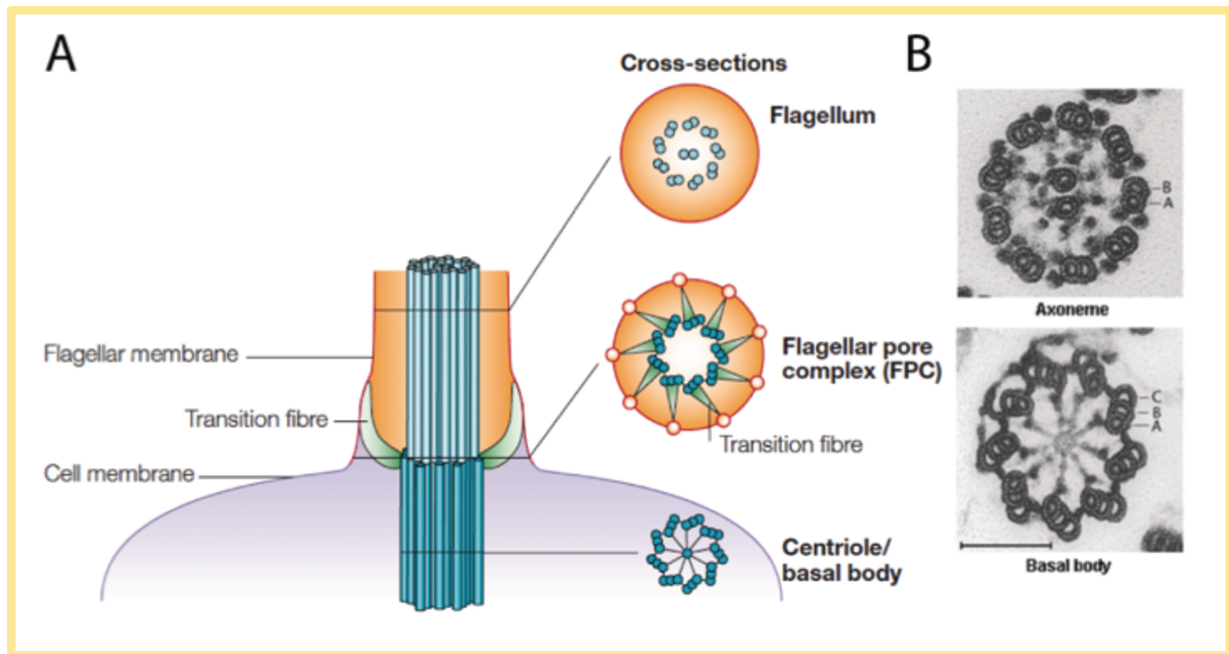


Figure 2 : La structure du centriole

- A) La base de l'axonème est en continuité avec le corps basal, qui se compose d'un cylindre de neuf triplets de microtubules. Les compartiments cytoplasmiques et flagellaires sont séparés par les fibres de transition qui s'étendent de l'extrémité distale du corps basal à partir de chacun des neuf triplets de microtubules (chez *Chlamydomonas*) et reliées à la membrane flagellaire (Figure de Rosenbaum and Witman (2002).
- B) Sections transversales chez *Chlamydomonas* du corps basal et de l'axonème analysés par microscopie électronique à transmission. Barre d'échelle : 0,95 μ m
Figure de (Linck and Stephens 2007).

1.1.1 Structures

Corps basal et centriole

Le centrosome est constitué de deux centrioles et qui forment une unité fonctionnelle. Le centrosome est le centre d'organisation des microtubules de la cellule et est nécessaire pour la formation du fuseau mitotique (Sluder and Rieder, 1985) alors que le corps basal organise les microtubules axonémaux des cils et flagelles. Les centrioles sont disposés perpendiculairement, ne se touchent pas et orchestrent l'organisation du centrosome. S'il porte un cil ou un flagelle, le centriole est appelé corps basal. Les corps basaux et centrioles sont constitués de neuf triplets de microtubules disposés sous forme d'un réseau cylindrique. Tous les triplets sont constitués de tubules appelés A, B et C. Le tubule A est constitué de 13 protofilaments, le tubule B est incomplet (11 protofilaments) et fusionné au tubule A et le tubule C est lui aussi incomplet (11 protofilaments) et fusionné au tubule B (Figure 2). Cette configuration est conservée à quelques exceptions près comme dans l'embryon de *Drosophila melanogaster* dont les centrioles ont neuf doublets de microtubules (Callaini, Dallai et al. 1997) ou chez *Caenorhabditis elegans*. Chez ce dernier, les cils ne possèdent pas de corps basaux aisément identifiables (O'Connell, 2000). Dans la configuration en triplets, le tubule C prend fin à la partie distale du corps basal alors que les tubules A et B se prolongent constituant la zone de transition et l'axonème (Figure 2). Le centrosome est composé de deux centrioles positionnés de façon orthogonale et est entouré d'une matrice péricentriolaire. Le centriole mature est appelé centriole père et l'immature, qui est souvent plus court, est appelé centriole fils (Chretien, Buendia et al. 1997). Le centrosome est le centre primaire d'organisation des microtubules dans la plupart des cellules animales et est nécessaire pour la formation du fuseau mitotique (Sluder and Rieder, 1985). Le corps basal organise les microtubules au sein des cils et flagelles. L'étude de l'algue verte biflagellée *Chlamydomonas* a montré qu'au cours de l'interphase, la cellule perd ses flagelles et duplique ses corps basaux qui se transforment en centrioles. Ils migrent vers la périphérie du noyau et les microtubules du fuseau mitotique sont nucléés (Cavalier-Smith, 1974). Au contraire, la plupart des protistes ciliés conservent leurs corps basaux et leurs flagelles au cours de leur cycle cellulaire. Lors de leur division, ils synthétisent un nouveau corps basal pour construire chaque nouveau flagelle (Brugerolle, 1992).

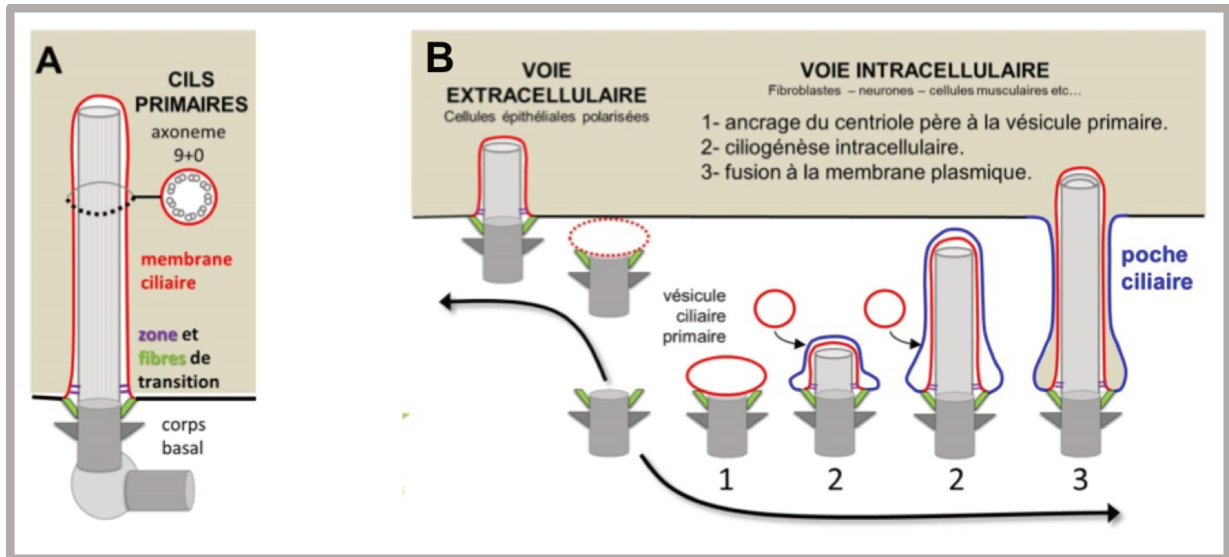


Figure 3 : La ciliogénèse des cils primaires

- A) Les cils primaires sont formés d'un corps basal, d'un axonème et d'une membrane. Le centriole père est ancré à la membrane par l'intermédiaire d'appendices distaux (gris foncé) ou fibres de transition (vert) qui forment avec la zone de transition (violet) une barrière limitant les échanges cil / cytoplasme.
- B) Deux voies distinctes permettent la formation des cils primaires : une voie extracellulaire dans laquelle le corps basal s'ancre à la membrane cellulaire et le cil grandit directement vers le milieu extracellulaire, et la voie intracellulaire où le corps basal s'ancre à une vésicule dans le cytoplasme, le cil grandit au sein de cette vésicule et atteint le milieu extracellulaire lorsque la vésicule fusionne avec la membrane plasmique. Le relargage incomplet du cil après la fusion de la vésicule à la membrane donne naissance à un domaine membranaire à la base du cil, la poche ciliaire.

Figures de la revue de Benmerah (2014).

Lors de la ciliogenèse des cils primaires, deux voies sont distinguées en fonction du type cellulaire : la voie extracellulaire et la voie intracellulaire. Pour la première d'entre elle, le corps basal vient s'associer à la membrane apicale et le bourgeon ciliaire se développe dans la cavité de l'épithélium. Ce modèle, proposé par Sorokin, pourrait expliquer la formation des cils primaires dans les cellules épithéliales (Figure 3B). La voie intracellulaire est privilégiée chez les fibroblastes ainsi que chez les myocytes, permettant l'accroissement du cil au sein même du cytoplasme. Le centriole père vient s'associer par l'intermédiaire de son extrémité distale à une vésicule cytoplasmique (Figure 3 B1). L'axonème croît au sein de cette même vésicule et s'allonge par l'intermédiaire d'un apport supplémentaire de membranes (fusion avec d'autres vésicules, Figure 3 B2). La vésicule ciliaire englobant le cil primaire vient alors fusionner avec la membrane plasmique (Figure 3 B3) (Benmerah, 2014). La présence d'une poche ciliaire à la base des cils indiquerait que les cils se forment soit par la voie intracellulaire ou soit par la voie extracellulaire et pourraient être « rétractés » par l'actine du cytosquelette.

Au cours de la dernière décennie, des études ont démontré que des mutations de protéines associées au corps basal entraînaient des maladies génétiques tel que le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) (Ansley, Badano et al., 2003), la dégénérescence rétinienne, l'obésité ou des défauts rénaux (Pan, Wang et al. 2005). Cette partie sera détaillée à partir de la page 7.

Fibres de transition et zone de transition

La zone de transition est une région complexe qui est constituée de structures bien définies telles que les fibres de transitions, les fibres en Y (Y-links) et la plaque basale. Bien que la zone de transition soit conservée, son apparence varie souvent entre les espèces. A la base de la zone de transition, les fibres de transition (denses aux électrons) ancrent le corps basal à la membrane ciliaire. Ces fibres de transition constituent la première séparation entre le compartiment flagellaire et le reste de la cellule. La base du flagelle forme un complexe appelé flagellar pore complex (FPC) qui permettait de filtrer les molécules entre le cytoplasme et le compartiment flagellaire (Rosenbaum and Witman., 2002). Ces fibres rayonnent à partir du tubule B juste après les extrémités du tubule C ((Gibbons and Grimstone, 1960) ; (Ringo, 1967)). Ces fibres abritent les protéines ODF2 (Outer dense fibre 2) et CEP164 (protéine centrosomale 164), deux protéines essentielles à la ciliogenèse. Les souris knock-out *Odf2* sont dépourvues des fibres de transition et l'allongement axonémal est aboli (Ishikawa, Kubo et al., 2005). ODF2 et CEP164 sont requis pour l'ancrage du corps basal à la membrane cellulaire

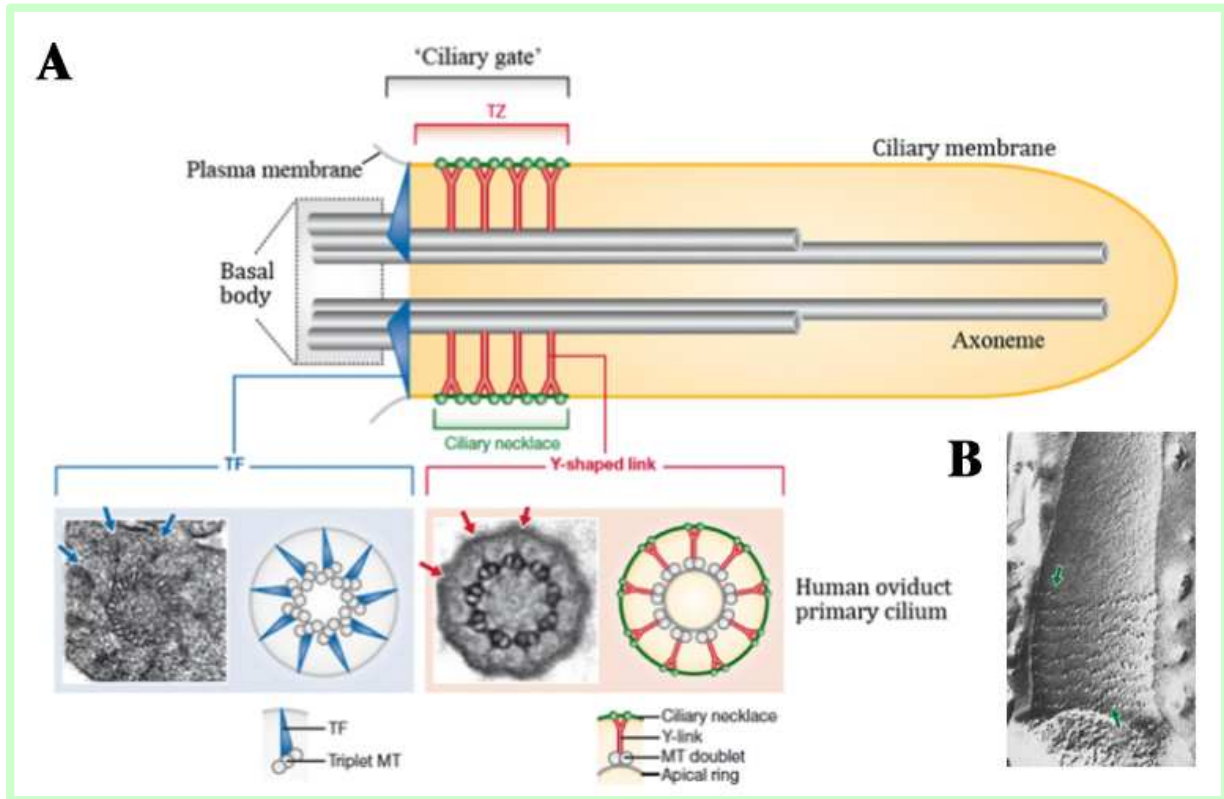


Figure 4 : La zone de transition

- A) La zone de transition est constituée de fibres de transition (Transition Fiber (TF)) qui relie le corps basal à la membrane plasmique, de structures en forme de Y et du collier ciliaire (B). Les détails ultra-structuraux représentés sont issus des cellules de l’oviducte humain.
- B) Cryo-fracture d’un cil de l’épithélium respiratoire de hamster montrant le collier ciliaire. Les flèches indiquent les points de début et de fin du collier ciliaire (Gilula and Satir 1972).

Figure de Reiter, Blacque et al. (2012).

mais aussi pour la ciliogenèse chez la souris et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (Graser, Stierhof et al. 2007).

La seconde partie de la zone de transition est délimitée par les fibres en Y (O'Toole, Giddings et al. 2003) et le collier ciliaire (Gibbons, 1961). La base des fibres en Y est ancrée aux doublets de microtubules et les pointes en Y sont associées à la membrane ciliaire (Figure 4A). CEP290 est une protéine se localisant au niveau des fibres en Y (Chang, Khanna et al. 2006). Chez le mutants CEP290 de *Chlamydomonas*, les fibres en Y sont essentielles pour le contrôle de la composition des protéines flagellaires ((Graser, Stierhof et al., 2007) ; (Craig, Tsao et al. 2010)). Une seconde protéine de 210 kDa est localisée à l'extrémité distale du corps basal, la Nephrocystine (NPHP1). Cette protéine est impliquée dans la formation de la zone de transition et participe à l'accès des particules IFT (transport intraflagellaire défini comme le mouvement bi-directionnel de complexes protéiques appelés particule IFT, voir chapitre 1.5.1) dans le cil ((Jauregui, Nguyen et al. 2008) ; (Jiang, Chiou et al. 2009)). Ces deux protéines sont également mutées dans les ciliopathies humaines (anomalies de formation ou de fonction de cils) (revue de Wolf et Hildebrandt, 2011).

L'axonème

L'axonème est constitué de neuf doublets de microtubules périphériques dont l'ultrastructure a été établie par des études en microscopie électronique à transmission (Hoops and Floyd 1983) et par cryo-tomographie en microscopie électronique (Sui and Downing, 2006)) (Figure 5A-C). Ces neuf doublets de microtubules sont disposés à intervalle régulier et sont composés d'hétérodimères de tubuline (α et β tubuline) qui sont assemblés à l'extrémité distale. Comme vu précédemment, le microtubule A se compose de 13 protofilaments et le microtubule B de 11 protofilaments (B) (Figure 5B). Les doublets sont attachés les uns aux autres par des liaisons de nexine constituée d'un complexe de régulation de la dynéine impliqué dans le contrôle de la motilité flagellaire (Heuser, Raytchev et al. 2009) (Figure 5B). Ces liaisons confèrent une très grande stabilité à l'édifice flagellaire, notamment en comparaison avec les microtubules cytoplasmiques.

Le tubule A porte les bras de dynéine interne (IDA : Inner Dynein Arm) et externe (ODA : Outer Dynein Arm). Ces bras de dynéines sont des moteurs moléculaires qui génèrent la force nécessaire au battement du cil. Etant donné que les liens de nexine connectent les

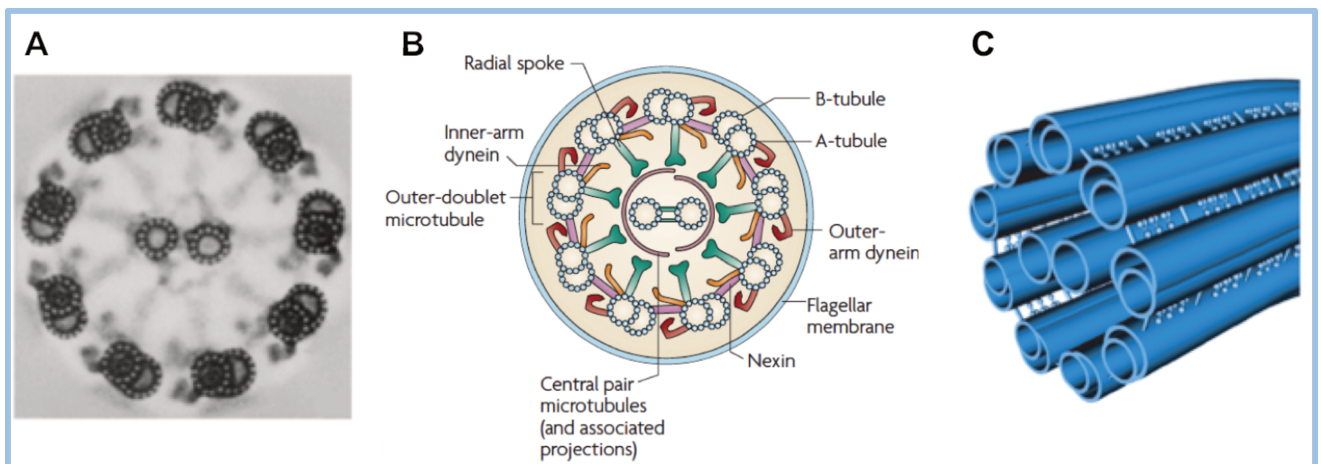


Figure 5 : L'axonème

- A) Moyenne de 20 micrographies individuelles de la queue du sperme humain montrant les aspects canoniques de la structure. Les bras de dynéine externes sont distincts tandis que les bras de dynéines internes ont un aspect diffus (Figure adaptée de Afzelius (2004)).
- B) Illustration représentant les éléments structuraux de l'axonème. L'axonème possède les bras de dynéines internes et externes qui génèrent la force nécessaire à la motilité. Les ponts radiaires (radial spoke) et les projections de la paire centrale régulent l'activité de la dynéine (adapté de Ginger, Portman et al. (2008)).
- C) Structure axonémale en trois dimensions où les ponts radiaires ne sont pas représentés

Figure faite par Hilfinger A de l'Institut Max-Planck, 2005.

doublets de microtubules entre eux et que les microtubules sont ancrés dans la cellule au niveau du corps basal, le glissement interdoulet (sliding-model) entraîne le fléchissement du flagelle. Plus précisément, les bras de dynéines internes contrôlent l'amplitude de fléchissement entre la paire centrale et les ponts radiaires tandis que les bras de dynéine externe régulent la vitesse de glissement et contribuent à déterminer la fréquence de battement ((Takada and Kamiya, 1997) ; (Satir and Christensen, 2007)). En absence de la nexine, le mouvement des doublets est désolidarisé et n'induit pas d'incurvation : il n'y a plus de battement. Les doublets de microtubules portent au niveau du tubule A des ponts radiaires (ou Radial Spoke complex : RSP) qui viennent réguler l'activité de la dynéine (Figure 5B). Ils sont composés d'au moins 23 polypeptides et sont conservés à travers l'évolution (Yang, Compton et al., 2005). En absence de la protéine RSP3, la formation des ponts radiaires est inhibée et les flagelles sont paralysés ((Williams, Velleca et al. 1989) ; (Afzelius, 1998)). Les ponts radiaires sont probablement aussi impliqués dans la liaison du calcium suggérant un rôle supplémentaire comme chimio et mécano-transducteurs ((Patel-King, Gorbatyuk et al. 2004) ; (Smith and Yang, 2004)).

Membrane flagellaire

L'axonème est enveloppé par la membrane ciliaire qui est en continuité avec la membrane plasmique et possède un ensemble de protéines uniques. Par exemple, elle contient des molécules responsables de la transduction du signal de divers signaux extracellulaires tels que les voies Sonic hedgehog (SHH), Notch et Wnt dans les cellules de mammifères. On pense que la zone de transition limite leur diffusion (Hu, Milenkovic et al. 2010). La membrane ciliaire reçoit de nombreux signaux qui viennent conditionner la morphologie cellulaire, la croissance ou l'adhésion. La composition de la membrane flagellaire est différente de la membrane cellulaire de par sa composition lipidique. Il a été proposé que les radeaux lipidiques contribuent à la localisation de certaines protéines flagellaires comme la calflagine ((Tyler, Fridberg et al. 2009) ; (Serricchio, Schmid et al. 2015)).

1.1.2 Les cils primaires « 9+0 »

Le cil primaire est capable de détecter certains éléments de l'environnement comme la lumière via les récepteurs ciliés tel que la rhodopsine et l'opsine ((Calvert, Strissel et al. 2006); (Wallingford and Mitchell, 2011)), et des signaux internes de l'organisme tels que l'écoulement des fluides (Brain, 1977) et les facteurs de croissance. Les cils primaires sont présents chez

presque toutes les cellules de vertébrés et sont impliqués dans de nombreuses voies de transduction du signal ((Huangfu, Liu et al. 2003) ; (Nozawa, Lin et al. 2013)). Chez l'humain, les cils primaires remplissent des fonctions sensorielles pour le développement de la vie. Leur dysfonctionnement entraîne un large éventail de pathologies appelé ciliopathies ((Barnes, 1961) ; (Grillo and Palay, 1963) ; (Sorokin, 1962) ; (Waters and Beales, 2011)). Aujourd'hui, la recherche biomédicale est indispensable pour comprendre le rôle et le fonctionnement des cils primaires.

1.1.3 Les cils mobiles « 9+2 »

Les cils mobiles sont caractérisés par une structure dite en « 9+2 » : ils possèdent une paire centrale de microtubules qui commence au niveau de la plaque basale et qui s'allonge jusqu'à l'extrémité distale du flagelle. Les cils mobiles possèdent des bras de dynéines internes et externes décrits précédemment. Cette configuration est trouvée chez de nombreux protistes comme par exemple les ciliés où les cils peuvent être présent en grand nombre au sein d'une même cellule comme chez les ciliés (plus de 4 000 cils chez la paramécie) et les kynétoplastidés où le battement flagellaire permet la mobilité de la cellule. Chez les mammifères, les cils mobiles sont présents dans de nombreux tissus et ont diverses fonctions : les cils de l'épendyme, qui tapissent les ventricules cérébraux, permettent le mouvement du liquide céphalo-rachidien, les cils de la trachée et des bronches font remonter le mucus et les cils des trompes de Fallope permettent le mouvement des ovocytes. Les gamètes mâles quant à eux utilisent leur unique flagelle pour se déplacer. Par conséquent, les défauts de ces organites conduisent à une grande variété de maladies et de troubles du développement (voir le second chapitre). Les cils en « 9+2 » peuvent avoir des fonctions chimio-mécano sensorielles comme le suggère la localisation des récepteurs de goût amer sur la surface des cils des cellules épithéliales des voies aériennes (Shah, Ben-Shahar et al. 2009).

1.1.4 Les autres types de cils

Lors du développement embryonnaire, certains cils nodaux de type « 9+0 » possèdent des bras de dynéines et sont mobiles, permettant de générer un courant dans le milieu interstitiel. Ceci engendre une différenciation asymétrique des territoires cellulaires et permet l'établissement de l'asymétrie droite/gauche chez la souris mais aussi chez d'autres espèces de vertébrés (Nonaka, Tanaka et al. 1998). Le dysfonctionnement de ces cils mène, dans 50 % des cas à une inversion de la disposition des organes (*situs inversus* : Cf ciliopathies, Figure 7B).

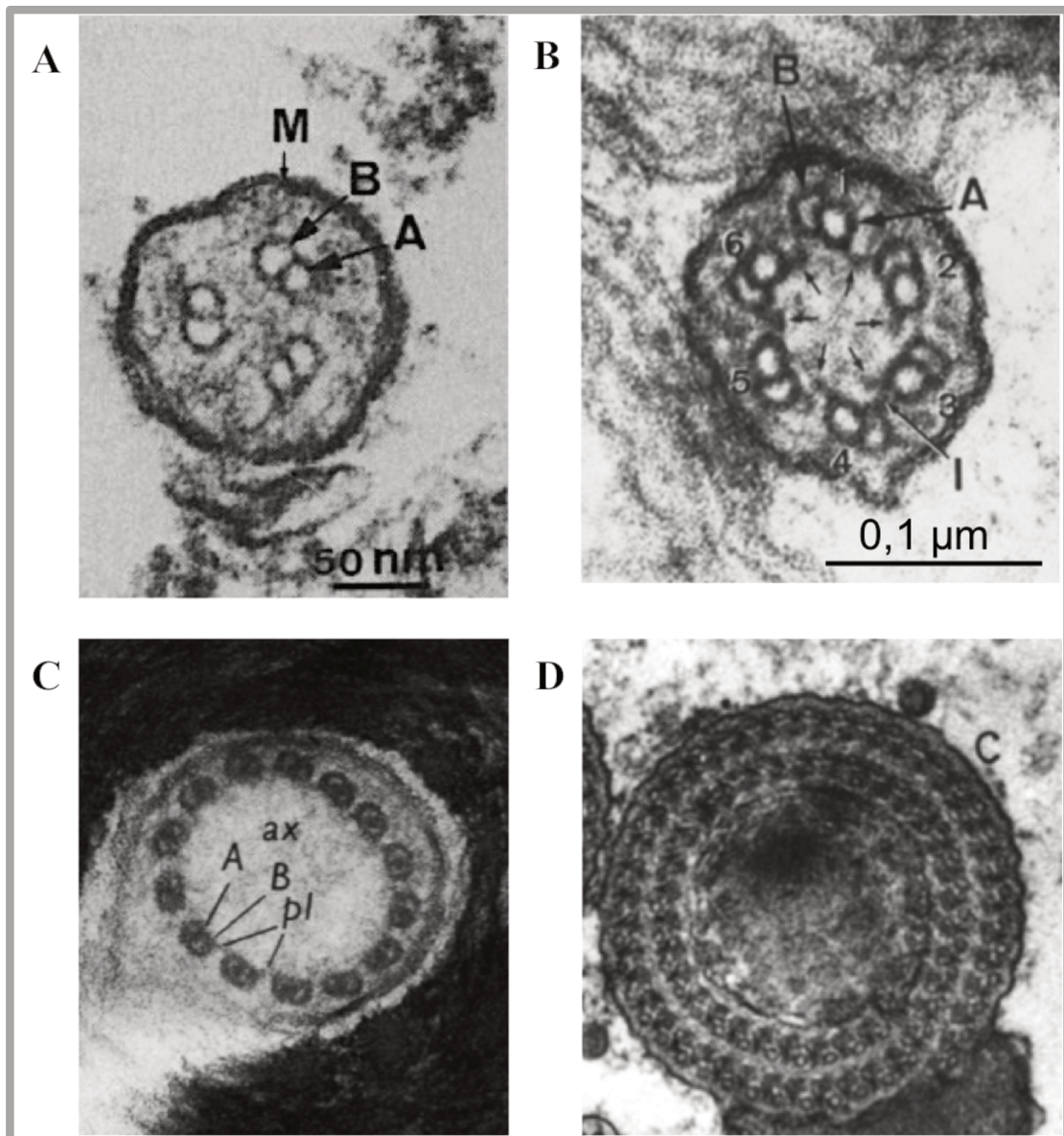


Figure 6 : Les cils atypiques

- A) Flagelle de *Diplauxis hatti* constitué de trois doublets de microtubules (Prensier, Vivier et al. (1980)). M représente la membrane flagellaire ; A et B indiquent respectivement le microtubule A et B.
- B) Flagelle de *Lecudina tuzetae* constitué de six doublets de microtubules (Schrevel and Besse (1975)). A et B indiquent respectivement le microtubule A et B. 1 à 6 indiquent le sens de lecture et le positionnement des doublets de microtubules, définis par le positionnement horloger des bras des dynéines.
- C) Coupe transversale du spermatozoïde mature d'*Acerentomon majus*. La chromatine correspond à la masse dense aux électrons autour du flagelle. L'axonème contient 14 doublets de microtubules. Grandissement x 54 000.
A et B indiquent respectivement le microtubule A et B ; pl : le lien périphérique.
- D) Section transversale du flagelle du spermatozoïde de *Sciara coprophila*. Grandissement x54 000 (D. M Phillips, 1966).

Si la structure en neuf doublets périphériques est la plus connue, il existe néanmoins des exceptions remarquables. Le flagelle des spermatozoïdes de certains protistes possède une structure axonémale non conventionnelle. Le flagelle mobile le plus simple connu a une structure en « 3+0 » et est retrouvé chez le gamète mâle de la grégarine *Diplauxis hatti* (Figure 6A) et est capable de produire un battement régulier (Prensier, Vivier et al. 1980). Une autre espèce de grégarine nommée *Lecudina tuzetae* possède un cil dont l'axonème est constitué de 6 doublets de microtubules et est également dépourvu d'une paire centrale (Figure 6B) (Schrevel and Besse, 1975). Ces flagelles génèrent un battement semblable à un mouvement de balancier de faible fréquence permettant de brasser le milieu environnant et de favoriser le mélange des gamètes mâles et femelles. Par ailleurs, les spermatozoïdes appartenant à la famille des proturans, de petits insectes de 2 mm de long, possèdent des flagelles dont la structure peut varier d'une structure « 12+0 », « 13+0 » à « 14+0 » (Figure 6C) ou « 9+9+2 » (Baccetti, Dallai et al. 1973) mais sont apparemment immobiles.

Plus spectaculaire encore, le flagelle des spermatozoïdes de la mouche *Sciera coprophila*, possède un axonème d'au moins 70 doublets de microtubules sans paire centrale mais est immobile (Figure 6D) (Phillips, 1966). Chez certains spermatozoïdes des insectes (diptères, nématocères) cette structure peut atteindre jusqu'à 2500 doublets (Dallai, Lupetti et al. 2006).

1.1.5 Assemblage du cil

L'assemblage du flagelle s'effectue à l'extrémité distale du flagelle et dépend du transport intraflagellaire (IFT) qui sera défini plus en détail dans la section 1.5 page 29.

1.2 Cils et ciliopathies

Les ciliopathies sont des maladies génétiques liées à des défauts de fonctionnement du cil qui affectent 1 individu sur 400. Chez l'homme, la majorité des cellules possède un ou plusieurs cils qui sont impliqués dans la motilité ou des fonctions sensorielles. Un défaut ciliaire peut donc affecter de nombreux organes. Le dysfonctionnement des cils mobiles entraîne la dyskinésie ciliaire primitive et celui des cils sensoriels est responsable d'une diversité de maladies comme des maladies polykystiques des reins, la dégénérescence rétinienne, le syndrome de Bardet-Biedl, le syndrome de Meckel-Gruber ou le syndrome d'Alstrom. Toutes ces mutations vont affecter la fonction du cil. L'absence de cil n'a jamais été décrite, suggérant que ces organites sont essentiels pour le développement.

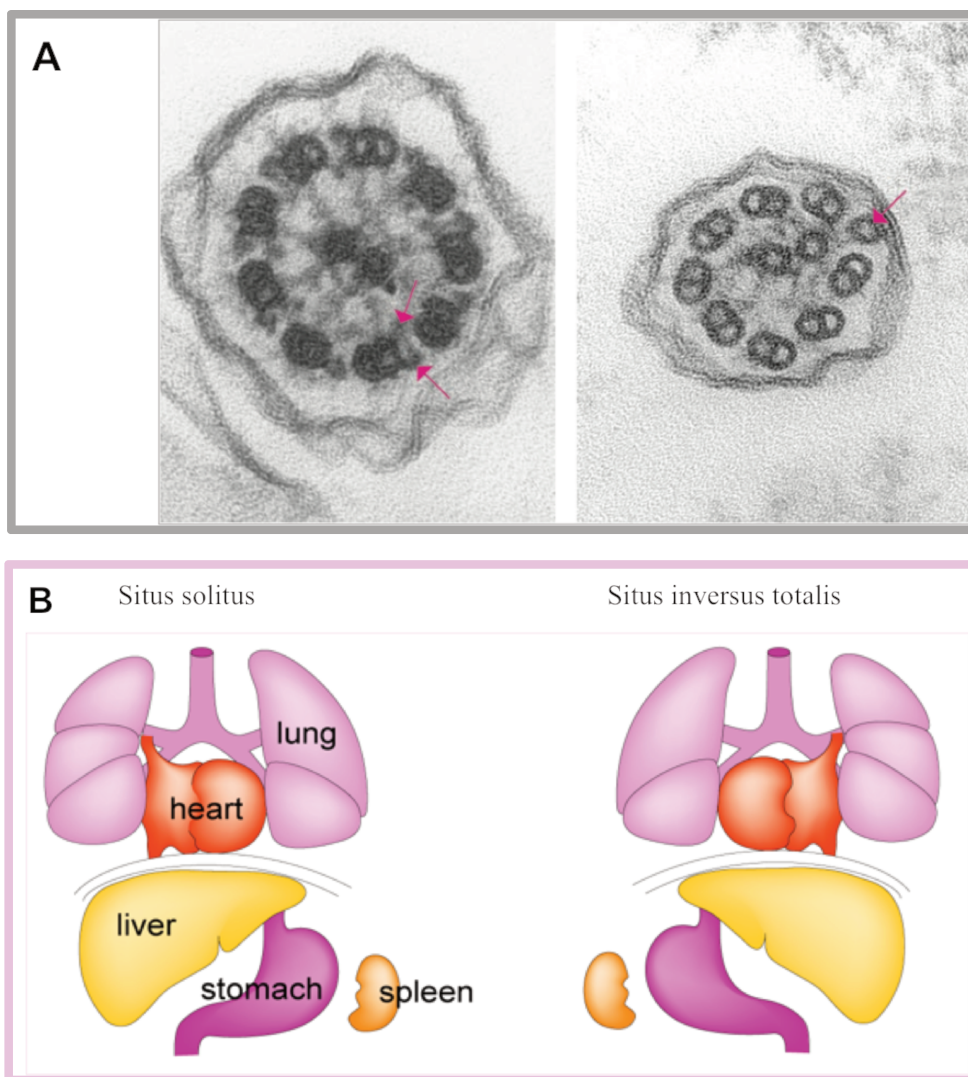


Figure 7 : Les ciliopathies

- A) A gauche, vue en coupe transversale d'un cil humain normal entouré de la membrane cellulaire. Le cil est constitué de 9 doublets de microtubules périphériques autour d'une paire centrale de microtubules. Les microtubules périphériques portent des « bras » de dynéines indiqués à l'aide de flèches roses.
- A droite, vue d'une coupe transversale d'un cil anormal dans le syndrome de dyskinésie ciliaire primitive. La disposition des microtubules est irrégulière. Il n'y a que 8 doublets périphériques et un microtubule isolé (visualisé par la flèche rose). Les bras de dynéines sont absents et les cils ne battent pas.
- B) A gauche, la position normale des organes est appelée *situs solitus*. Le schéma représente le foie sur le côté droit, l'estomac, la rate et l'apex des points du cœur sont sur le côté gauche. A droite, le *situs inversus* se réfère à l'inversion miroir-image complète de l'asymétrie de l'organe.

Figure de Capdevila, Vogan et al. (2000).

1.2.1 Fonctions liées à la motilité

La dyskinésie ciliaire primitive (DCP)

La première ciliopathie fut caractérisée il y a 40 ans lors de la mise en évidence du dysfonctionnement des cils mobiles comme étant responsable de la dyskinésie ciliaire primitive (DCP) (Afzelius, 1976). Cette maladie rare survient chez environ une personne sur 60 000 ((Afzelius, 1976) ; (Storm van's Gravesande and Omran, 2005)) et peut-être diagnostiquée à la naissance en fonction de sa sévérité. Elle se manifeste chez les nouveaux nés par des difficultés respiratoires et des infections pulmonaires. Chez les enfants plus âgés ou chez les adultes, la maladie se caractérise par des infections respiratoires à répétition (rhinites, bronchites, sinusites...). Cette maladie est expliquée par une anomalie du battement des cils (situés à la surface des muqueuses du nez et des bronches (Tamalet, Clement et al., 2001). Du nez aux bronchioles terminales, les voies aériennes sont tapissées par un épithélium cilié. Les cellules ciliées (environ 200 cils par cellule) assurent la progression du mucus produit par les cellules calciformes et participent donc à la première ligne de défense de l'appareil respiratoire. La plupart des individus masculins atteints de la DCP sont stériles à cause de l'immobilité des spermatozoïdes. La moitié des patients présentent une inversion gauche-droite des organes internes du thorax et de l'abdomen (*situs-inversus*) nommé syndrome de Kartagener (Figure 7B). Ce syndrome s'explique par le rôle du cil nodal lors de l'établissement de l'asymétrie gauche-droite. Dans le nœud embryonnaire, certains cils nodaux (9+0) possèdent des bras de dynéines externes et sont capables de créer un mouvement de rotation produisant un écoulement des fluides vers la gauche, appelé flux nodal. Sur la périphérie du nœud, des cils immobiles peuvent détecter ce flux, conduisant ainsi à l'activation d'une voie de transduction dépendante du Ca^{2+} dans les cellules situées uniquement du côté gauche du nœud. Cette activation de la voie de signalisation asymétrique définira le côté gauche de l'embryon (McGrath and Brueckner, 2003). L'inversion artificielle du flux nodal chez les embryons de souris renverse totalement la symétrie interne menant au *situs-inversus* (McGrath and Brueckner, 2003). Il existe des cas intermédiaires où seulement certains organes sont inversés comme le *situs inversus thoracalis* (transposition des poumons et du cœur) ou le *situs-inversus abdominalis* (seuls le foie, l'estomac et la rate sont transposés) (Fliegauf, Benzing et al. 2007). Pour le moment, aucun traitement n'est disponible pour rétablir le battement des cils. Des physiothérapies sont mises en place pour soulager le patient tel que le drainage des sécrétions bronchiques et la mise à disposition d'antibiotiques en cas d'infection.

1.2.2 Fonctions sensorielles

La polykystose rénale

Les troubles engendrés par les cils mobiles et les défauts de cils sensoriels peuvent créer des phénotypes pléiotropes : une mutation dans un seul gène qui affecte plusieurs tissus ou organes et engendre des effets variés. Prenons l'exemple le plus frappant : la maladie polykystique des reins (PKD), une cause fréquente de l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte. Elle touche environ une personne sur 1 000 en France et 12,5 millions de personnes dans le monde (Wilson, 2004). La PKD est caractérisée par la formation de kystes multiples à la surface du rein, du foie et du pancréas. Les gènes en cause ont été identifiés mais les mécanismes en jeu sont mal compris. Il existe deux types de PKD définis par leur mode de transmission : la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) et la polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD). Près de 85 % des malades présentent une mutation sur le gène *PKD1* et environ 15 % sur *PKD2* codant respectivement pour les protéines transmembranaires PC1 et PC2. Aucun traitement n'est actuellement disponible hormis la dialyse ou la greffe. Pazour et ses collègues découvrirent le rôle des cils par l'analyse des cellules du rein chez la souris mutante Tg737orpk (Pazour, Dickert et al. 2000). Le gène muté dans cette souche de souris est l'homologue de IFT88 chez *Chlamydomonas*, un gène essentiel à l'assemblage du flagelle. Les cellules de rein ont été analysées par microscopie électronique à balayage chez la souris mutante Tg737orpk quelques jours après la naissance. Cette étude a relevé que les cils primaires sont plus courts et lie le phénotype rénal au défaut ciliaire. Cette hypothèse a été confirmée lorsque les deux protéines transmembranaires polycystines 1 et 2 (PC1 et PC2) ont été localisées au cil primaire où elles forment un canal calcique de TRP (*transient receptor potential*) (Pazour, San Agustin et al. 2002).

Le syndrome de Bardet-Biedl

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) est un syndrome rare (prévalence de 1/160 000 en Amérique du Nord et en Europe (Moore, Green et al., 2005) caractérisé par un ensemble de symptômes tels que l'obésité, le diabète, un retard mental ou une rétinopathie. Chez certains patients, on retrouve également une atteinte cérébrale puisqu'ils présentent une hypoplasie au niveau du corps calleux. Il s'agit d'une maladie génétique hétérogène, et, à ce jour, des mutations dans une vingtaine de gènes sont connues pour être associées à ce syndrome

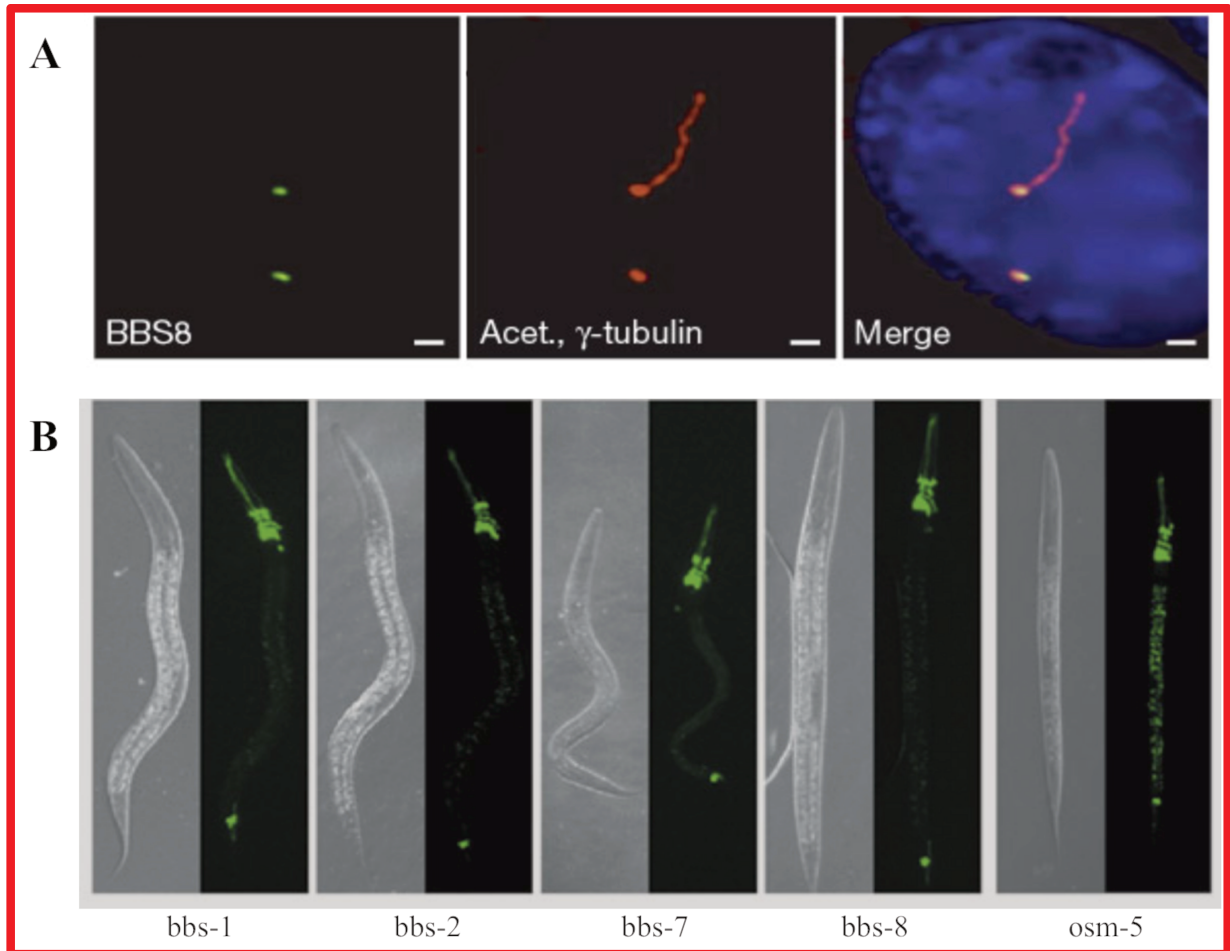


Figure 8 : Localisation des protéines BBS

- A) BBS-8 est localisé au niveau du centrosome ou de corps basal dans les cellules IMCD3 (murine Inner Medullary Collecting Duct) mais pas dans le cil primaire.
Barre d'échelle, 1µm
- B) Chez *C. elegans* les protéines BBS fusionnées à la GFP sont localisées au cil et à sa base comme pour osm-5 (IFT88).

Figure de (Ansley, Badano et al. 2003).

((Ansley, Badano et al. 2003) ; (Blacque and Leroux, 2006) ; (Stoetzel, Laurier et al. 2006)). L'analyse des gènes par génomique comparative des organismes avec ou sans flagelle a montré qu'environ 200 gènes sont conservés exclusivement dans les espèces ciliées. Plusieurs gènes BBS ont été identifiés exclusivement dans les organismes ciliés chez *C. elegans* et dans des protistes tels que *Chlamydomonas* ou *Trypanosoma brucei* (Li, Lees-Murdock et al. 2004).

Chez *C. elegans*, au moins huit gènes (BBS-1 à BBS-5 et BBS-7 à BBS-9) sont conservés et exprimés dans les neurones ciliés ((Ansley, Badano et al. 2003) ; (Blacque and Leroux, 2006)) (Figure 8A). Les protéines BBS couplées à une protéine de fusion GFP (BBS1, BBS5, BBS7 et BBS8) sont localisées à la base du cil et se déplacent le long de l'axonème dans ces neurones ((Ansley, Badano et al. 2003) ; (Blacque, Reardon et al. 2004) ; (Blacque and Leroux, 2006)) (Figure 8B) ce qui suggère que les protéines BBS sont associées dans le transport intraflagellaire. La mutation des protéines *bbs-1*, *bbs-7* et *bbs-8* entraîne des défauts structuraux (absence du segment distal) et fonctionnels du cil (Blacque, Reardon et al., 2004). Le déplacement du moteur antérograde et le transport des complexes IFT-A et IFT-B (BBS-7 et BBS-8) a été examiné à l'aide de protéines de fusion GFP chez les vers sauvages ainsi que chez les mutants BBS. Ces expériences suggèrent que les protéines BBS-7 et BBS-8 stabilisent les complexes IFT lors du déplacement par la kinésine 2 et OSM-3 (Ou, Blacque et al. 2005) (Figure 9A).

La purification d'un complexe appelé le BBSome a été réalisée chez les cellules humaines et chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Cinq protéines BBS (BBS1, BBS4, BBS5, BBS7 et BBS8) sont associées au transport intraflagellaire. Dans le mutant BBS4, l'assemblage du cil et le transport intraflagellaire ne sont pas affectés mais les flagelles accumulent anormalement plusieurs protéines de signalisation qui peuvent perturber la phototaxie (Lehtreck, Johnson et al. 2009). Les auteurs suggèrent que les BBSomes sont transportés par les complexes IFT mais qu'ils ne font pas partie intégrante du mécanisme de l'IFT. Les BBS contribueraient au transport de certaines protéines. L'étude de la fonction du BBSome chez *T. brucei* a également été entreprise et indique que le complexe interagit avec la clathrine et est localisé sur les membranes de la poche flagellaire et des vésicules cytoplasmiques (Langousis, Shimogawa et al. 2016).

Chez l'homme, les protéines BBS4, BBS6 et BBS8 s'associent avec la *pericentriolar material protein 1* (PCM1), une protéine du centrosome impliquée dans la réplication centriolaire (Figure 9B) ((Ansley, Badano et al. 2003) ; (Kim, Ou et al. 2005)). Cet assemblage

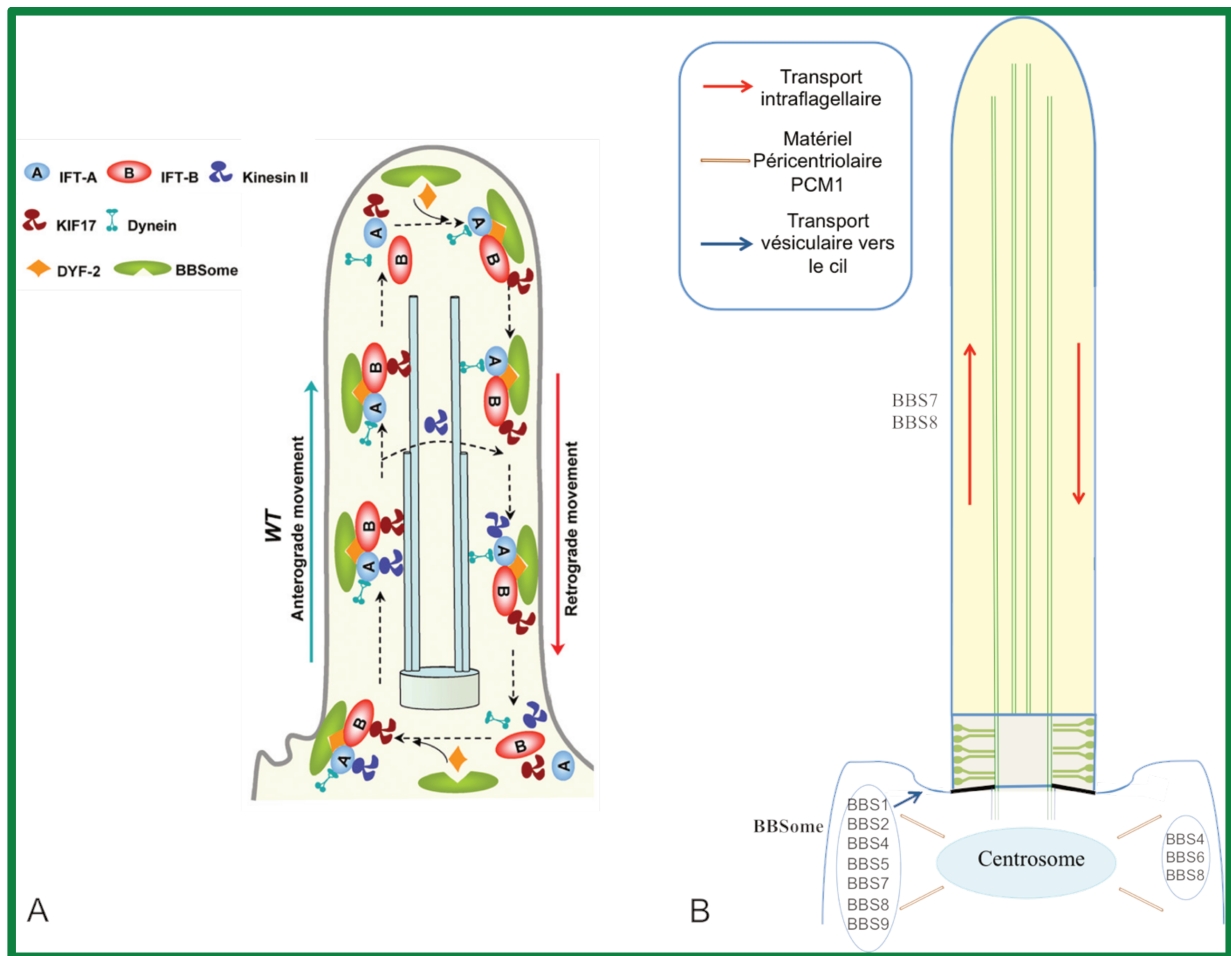


Figure 9 : Schéma de la structure d'un cil et localisation des protéines BBS

- A) Modèle d'assemblage du BBSome avec les particules IFT. A la base du cil, dans les cellules de type sauvage, les moteurs kinésine II, KIF 17 ainsi que la dynéine sont présents. Le complexe BBSome et DYF-2 sont également localisés à la base du cil. DYF-2 stabilise l'association entre les BBSome et le complexe IFT. Les particules IFT se dissocient à l'extrémité distale du cil puis le complexe BBSome et DYF-2 se réassocient pour réorganiser l'ensemble du complexe IFT afin de permettre le retour du complexe via le transport rétrograde (figure adaptée de (Wei, Zhang et al. 2012)).
- B) Représentation schématique d'un cil mobile représentant une structure de type « 9+2 » chez l'homme. A la base, le cil possède un corps basal formé de neuf triplets de microtubules. Le complexe BBSome est impliqué dans le transport vésiculaire vers le cil. BBS4, BBS6 et BBS8 s'associent au *pericentriolar material protein 1* (PCM1), une protéine impliquée dans la réplication centriolaire

Figure adaptée de la revue de (Rooryck and Lacombe 2008).

ne s'effectue pas dans toutes les cellules et expliquerait un phénotype spécifique en fonction des types cellulaires (Bisgrove and Yost, 2006). Les protéines BBS6, BBS10 et BBS12 sont des protéines chaperonnes et leur suppression combinée chez le poisson zèbre entraîne un phénotype très sévère (embryon présentant des phénotypes incluant le détachement cellulaire le long de l'axe embryonnaire et une mauvaise définition de la tête de l'embryon) démontrant l'importance de ces protéines dans le bon développement de l'embryon ((Badano, Kim et al. 2003) ; (Stoetzel, Muller et al. 2007)).

1.3 Construction des cils et flagelles

La construction des cils et flagelles repose sur le transport intraflagellaire (IFT) qui sera décrit en détail au chapitre 1.5 page 29. De nombreuses mutations trouvées chez des patients atteints de ciliopathies affectent des gènes IFT. Elles sont hypomorphiques (fonctionnent moins bien que la protéine sauvage) et les cellules de patients assemblent encore des cils mais leur longueur, leur nombre et leur composition peuvent être modifiés. Ces mutations conduisent à différents types de ciliopathies et il est difficile d'établir une relation évidente entre les mutations et le type de maladie engendrée. Il est donc crucial de comprendre le mécanisme de l'IFT et de l'étudier chez divers organismes, afin d'essayer d'en comprendre les rouages.

Notre équipe utilise le protiste *Trypanosoma brucei* comme modèle d'étude du transport intraflagellaire. Cet organisme présente plusieurs avantages biologiques : il possède un flagelle mobile, l'ensemble des gènes IFT est conservé et il a la particularité de maintenir le flagelle existant durant l'assemblage du nouveau, offrant ainsi la possibilité de comparer l'organite en construction et l'organite en maintenance. Les trypanosomes ont également la capacité d'assembler naturellement des flagelles de longueurs différentes en fonction du stade du cycle de vie, en particulier lors de l'infection de la mouche tsé-tsé. Les trypanosomes se prêtent facilement à la génétique inverse et le marquage endogène permet l'expression de protéines fluorescentes dans des conditions presque normales. L'ensemble de ces critères fait de *T. brucei*, un excellent modèle d'étude du transport intraflagellaire (Vincensini, Blisnick et al. 2011).

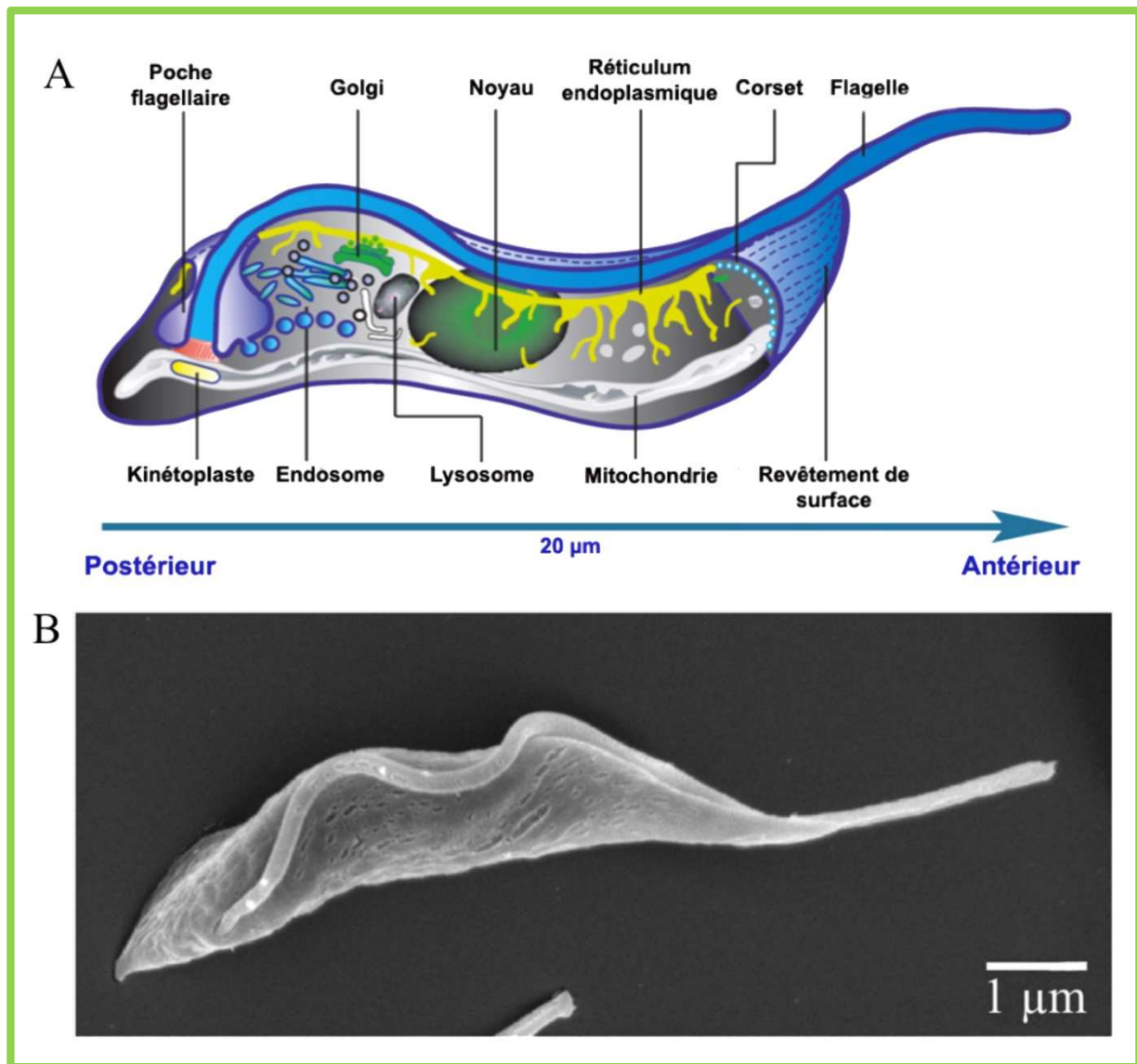


Figure 10 : Représentation de *Trypanosoma brucei*

A) Représentation simplifiée de la localisation des principaux organites de *T. brucei*.
Figure adaptée de (Overath and Engstler 2004).

B) Image de la forme procyclique de *T. brucei* prise par microscopie électronique à balayage (T. Blisnick et P. Bastin, image non publiée).

1.4 *Trypanosoma brucei* : un modèle d'étude du flagelle

1.4.1 Un parasite

La maladie du sommeil

Le trypanosome est un protiste (Figure 10) d'abord connu pour être responsable de la maladie du sommeil ou trypanosomiase humaine africaine (HAT) ou animale (AAT). Il est transmis par la piqûre de la mouche tsé-tsé ce qui explique la restriction de la maladie en Afrique centrale (Figure 11). Cette maladie a été décrite par David Livingstone en 1857 lors de ses voyages exploratoires dans le Sud-Est de l'Afrique (Livingston, 1857). A la fin du 19^{ème} siècle, David Bruce fait le lien entre la mouche tsé-tsé et le parasite trouvé dans le sang des animaux atteints (Bruce, 1895). Au début du 20^{ème} siècle, ces parasites ont également été identifiés dans le sang et le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la maladie du sommeil. Dix ans plus tard, Kleine et ses collègues décrivent la transmission cyclique du trypanosome entre les mammifères et la mouche tsé-tsé (Figure 11).

Aujourd'hui, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) estime que cette maladie menace plus de 60 millions de personnes et moins de 10 % des populations à risque sont actuellement sous surveillance, dans une vingtaine de pays endémiques des zones rurales d'Afrique sub-saharienne (Figure 11A). Plusieurs épidémies en Afrique ont été recensées au cours du siècle dernier. L'épidémie de 1920 a été contrôlée grâce à des équipes mobiles qui ont organisé le dépistage chez les personnes à risque. La maladie a presque disparu dans les années 1960 grâce à un programme de lutte contre le vecteur, la mouche tsé-tsé. Malheureusement, l'instabilité politique des différents pays a conduit à l'arrêt de ce programme et à l'abandon de la surveillance de la maladie. Au cours des trente dernières années, elle est réapparue dans plusieurs pays avec un pic dans les années 90 (Figure 12B). En 2013, 6 228 cas ont été notifiés, cependant l'OMS estime que le nombre de personnes infectées atteint les 20 000 (Franco, Simarro et al., 2014) (Figure 11B). La nagana, ou trypanosomiase animale africaine, met en péril 50 millions de tête de bétail et menace l'agriculture avec un impact économique grave estimé à 1,5 milliard de dollars américain par an (Kennedy, 2008). Ces quinze dernières années, la maladie du sommeil a régressé après des efforts continus de l'OMS, des programmes de contrôle nationaux et des organisations non gouvernementales.

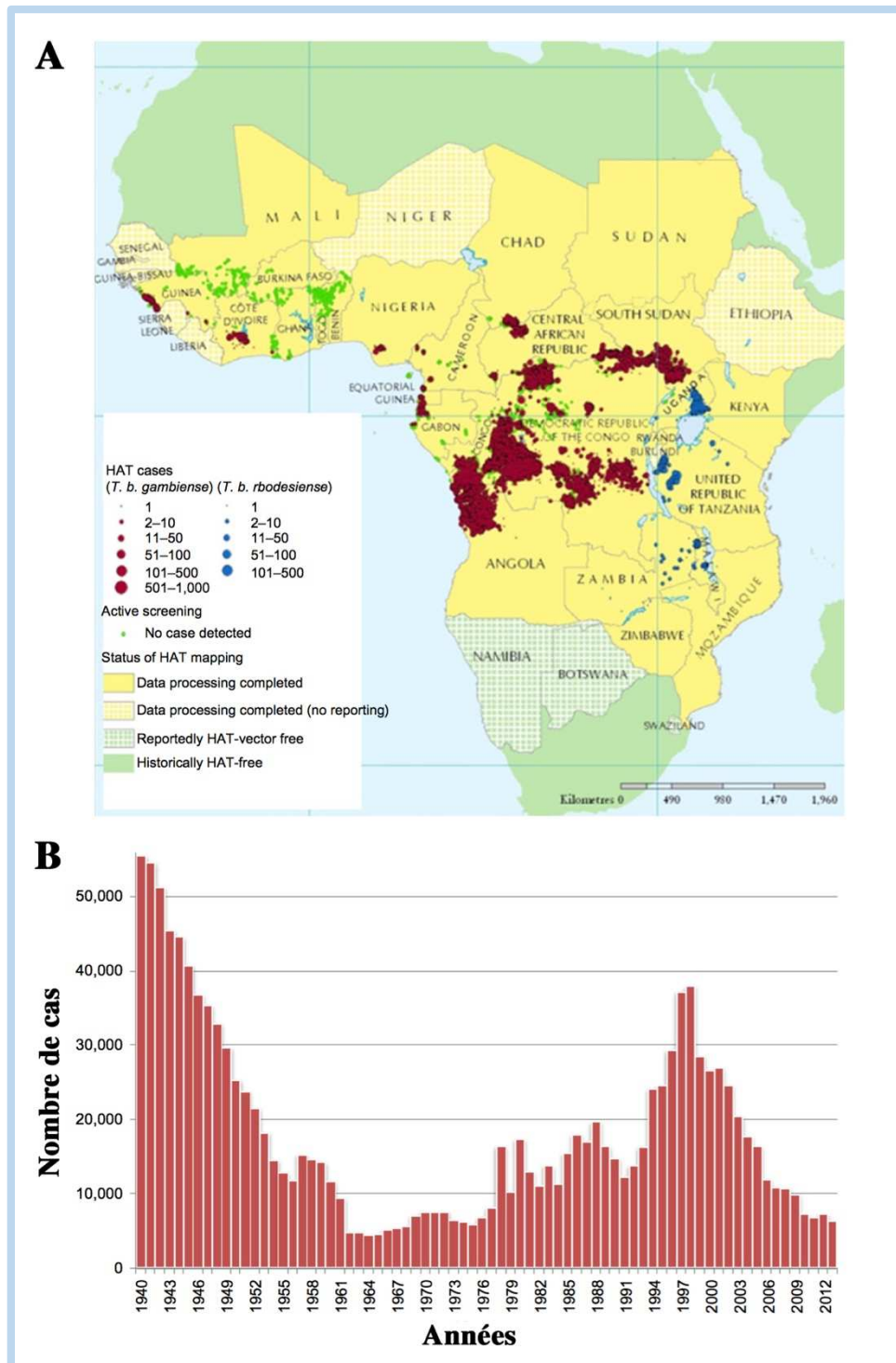


Figure 11 : Localisation et nombre de cas recensés par année de HAT

- A) Répartition géographique des deux sous-espèces de *Trypanosoma brucei* dans l'Est et l'Ouest africain entre les années 2000 et 2009. Figure de (Franco, Simarro et al. 2014).
- B) Notification de cas annuels de la maladie du sommeil signalés à l'Organisation mondiale de la santé. Figure de The World Health Organization.

Les trypanosomes sont des organismes eucaryotes appartenant à l'ordre des kynétoplastidés. Ils sont caractérisés par la présence d'une unique mitochondrie. Le kinétoplaste contient l'ADN mitochondrial qui est condensé et est visible par microscopie optique. Le genre *Trypanosoma* est subdivisé en deux groupes en fonction du comportement du vecteur. Les stercoraires, dont *Trypanosoma cruzi*, l'agent de la maladie de Chagas, également appelé trypanosomiase américaine (Rassi, Rassi et al. 2010) sont transmis par les réduves, des insectes hématophages. Lors du repas sanguin les parasites défèquent sur la peau de l'hôte et lorsque qu'il y a démangeaison, l'hôte se gratte et la plaie se contamine via les excréments. Les salivaires comprennent *Trypanosoma brucei*, dont les formes infectieuses sont présentes dans la salive, pénètrent dans la circulation sanguine de leur hôte lors d'un repas sanguin. Deux sous-espèces de *T. brucei* causent les différentes formes de la maladie du sommeil (Figure 11). *T. brucei gambiense* se trouve en Afrique centrale et en Afrique de l'Ouest et provoque des infections chroniques. *T. brucei rhodesiense* est présent dans le Sud et l'Est de l'Afrique et conduit à une forme plus aiguë de la maladie. Les autres sous-espèces, *T. brucei brucei*, *T. congolense* et *T. vivax* sont responsables de la trypanosomiase animale chez les bovins, les animaux domestiques et sauvages. L'ordre des kynétoplastidés comprend d'autres agents pathogènes humains tels que *Leishmania* qui provoque les leishmanioses viscérales et cutanées (Kobets, Grekov et al. 2012).

Cycle parasitaire et différenciation

Le cycle parasitaire de *Trypanosoma brucei* alterne entre l'insecte vecteur (la glossine) et des hôtes mammifères (bétails, humains...). Les trypanosomes doivent donc adapter rapidement leur métabolisme ainsi que leur surface à leur nouvel environnement (Figures 12) (Matthews, 2005). Plusieurs étapes du cycle parasitaire ont été décrites et étudiées. Dans les mammifères, les trypanosomes se multiplient dans le sang de l'hôte et se présentent sous une forme élancée dont la longueur atteint environ 27 µm. Ces cellules possèdent à leur surface un manteau de glycoprotéines appelé Variant Surface Glycoprotein (VSG) qui les protège très efficacement contre la réponse immunitaire de l'hôte. Pour échapper au système immunitaire, la variation antigénique permet de changer régulièrement le revêtement de surface à partir d'un pool de 1000 à 2000 gènes (Horn, 2014). Le stade trypomastigote est défini par la position postérieure du kinétoplaste. Le flagelle gagne l'avant du corps où il peut soit s'arrêter (trypomastigote trapu ou « stumpy ») soit se prolonger sous forme de flagelle libre (trypomastigote allongé ou « slender »). Ces formes se déplacent librement dans le sang, la

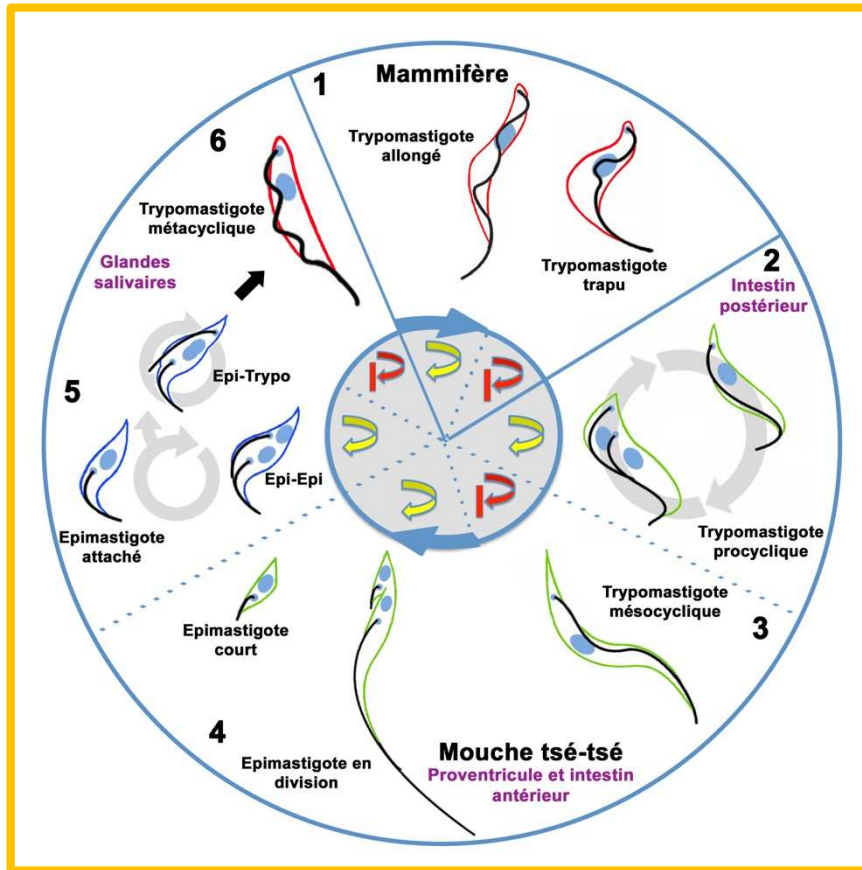


Figure 12 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*

- 1) Lors de l'absorption par la mouche tsé-tsé d'un repas sanguin infecté, les trypomastigotes allongés et trapus sont présents dans l'intestin moyen.
- 2) Les trypomastigotes se différencient en forme procyclique (PC) pour continuer dans le cycle cellulaire sans que les formes longues meurent. Les formes PC sont prolifératives et établiront l'infection dans l'intestin de la mouche tsé-tsé. Les parasites traversent l'espace ectopéritrophique et migrent le long du canal alimentaire de la glossine.
- 3) L'infection progresse et la forme trypomastigote mésocyclique se trouve dans l'intestin antérieur.
- 4) Les parasites mésocycliques gagnent le proventricule où sont localisées les formes épimastigotes en division. Les formes épimastigotes en division donnent naissance à un épimastigote court et à un épimastigote long.
- 5) La population parasitaire s'établit avec succès dans les glandes salivaires, les épimastigotes attachés sont ancrés à l'épithélium des glandes salivaires et prolifèrent via le cycle Epi-Epi. Le cycle Epi-Epi permet aux formes épimastigotes attachés d'établir une population infectieuse dans les glandes salivaires. Plus tard, la division cellulaire Epi-Trypo se produit, donnant naissance à un nouveau stade trypomastigote.
- 6) Ces trypomastigotes forment ensuite dans les glandes salivaires, une population infectieuse de trypomastigotes métacycliques. Quand une mouche tsé-tsé infectée au niveau des glandes salivaires se nourrit sur l'hôte, les trypomastigotes métacycliques sont injectés dans le derme.

Redessiné à partir de (Rotureau, Subota et al. 2012) ; (Ooi and Bastin 2013).

forme allongée (slender) se multipliant et se reproduisant en 6h par division binaire et la forme trapue (stumpy) émergeant uniquement lors du pic de parasitémie. Après ingestion par la mouche tsé-tsé, les formes trapues se différencient rapidement en trypomastigotes du stade procyclique et colonisent l'intestin moyen où ils se multiplient. Lors de cette étape, la synthèse d'une nouvelle couche de glycoprotéines est engagée. Elle est composée de deux types de procyclines avec soit des répétitions Glu-Pro (EP procycline) ou Gly-Pro-Glu-Thr (GPEET procycline) (Roditi and Liniger, 2002) qui remplacent la couche de VSG (Vassella, Den Abbeele et al. 2000). Tout comme les VSG, les procyclines sont des protéines attachées à la membrane par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol à leur extrémité C-terminale. Par la suite, les trypomastigotes au stade mésocyclique migrent dans l'intestin antérieur et une modification de la longueur des parasites s'effectue (jusqu'à 45 µm). Ils continuent leur migration vers le proventricule où les formes épimastigotes, caractérisée par le positionnement du kinétoplaste qui se situe entre le noyau et le pôle antérieur de la cellule (Vickerman, 1985) se divisent asymétriquement. Elles donnent lieu à un court et long épimastigote. Certains de ces parasites migrent jusqu'au glandes salivaires. Ils s'attachent à l'épithélium via leur flagelle et prolifèrent sous la forme épimastigote, puis suite à une division asymétrique, les trypanosomes se différencient en cellules minces appelées métacycliques, où le kinétoplaste se trouve à l'extrémité postérieure de la cellule (Rotureau, Subota et al. 2012). Ces cellules non prolifératives ont acquis une couche de VSG en préparation pour l'inoculation à un nouvel hôte mammifère où ils commenceront à proliférer probablement via la lymphe avant d'envahir la circulation sanguine. Les différents stades de développement peuvent être définis par leur taille, la position relative du noyau et du kinétoplaste ainsi que par la longueur du flagelle (Figure 12).

Infection et symptômes

Le parasite est transmis après la piqûre d'une mouche tsé-tsé infectée qui injecte environ une centaine de trypanosomes lors d'un repas sanguin. Les parasites se multiplient au niveau du site d'inoculation ce qui conduit à un nodule inflammatoire appelé chancre. Par la suite, les parasites atteignent la circulation sanguine, la lymphe et les tissus et provoquent des symptômes non spécifiques tels que des fièvres, des maux de tête, des faiblesses ou douleurs articulaires ou encore une perte de poids. Quelques semaines après la piqûre, des symptômes plus graves peuvent se développer avec l'élargissement de la rate et du foie, des complications ophtalmologiques et endocriniennes ainsi qu'une myocardite. Dans le cas d'infection par *T. brucei rhodesiense* cette phase est aiguë, d'une durée de quelques semaines à quelques mois et la détection est facilitée puisque leur densité est élevée. Au contraire, *T. brucei gambiense*

provoque une maladie chronique qui peut persister plusieurs années sans symptômes majeurs et le parasite est difficilement détectable dans le sang (Brun, Blum et al. 2010). Pour diagnostiquer la maladie, la recherche d'anticorps anti trypanosomes dans le sérum des sujets se fait par un test d'agglutination sur carte (CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis). Le CATT sur sang total consiste à mettre en présence des antigènes de trypanosomes (*T. brucei gambiense*) entiers et lyophilisés avec le sang de la personne à examiner. Si cette personne possède des anticorps ou est atteinte de la THA, les antigènes du CATT rentrent en contact avec les antigènes et provoquent leur agglutination, qui se traduit par des granulations à la lecture du test (Magnus, Vervoort et al. 1978).

La seconde phase de la maladie est initiée quelques semaines ou quelques mois après l'infection, lors du passage de la barrière hémato-encéphalique par les trypanosomes qui se développent dans le système nerveux central. Cette phase est connue sous le nom de phase méningo-encéphalique, avec des symptômes et des signes neurologiques (altération de l'état mental), des troubles sensoriels ainsi que des problèmes de coordination. A ce stade, la maladie perturbe le rythme circadien d'où le nom de « maladie du sommeil ». La progression naturelle de la maladie sans traitement entraîne la somnolence et le coma avant d'aboutir à la mort de l'hôte (Kennedy, 2008).

Immunité et résistance

Les parasites échappent aux défenses immunitaires de leurs hôtes mammifères grâce à la variation continue de leur antigène de surface, la VSG (Variant Surface Glycoprotein) (Cross, 1978). Les parasites se multiplient et changent régulièrement de revêtement de surface exprimant un nouveau gène codant une protéine VSG avec des épitopes antigéniques différents, ce qui lui permet d'avoir en permanence une avance sur la réponse anticorps. Les parasites sont également capables de modifier le programme d'expression des cytokines par les macrophages et les lymphocytes, ce qui réduit considérablement l'efficacité du système immunitaire (Salmon, Vanwalleghem et al. 2012).

La VSG est une glycoprotéine qui s'ancre à la membrane plasmique du trypanosome par un radical glycosylphosphatidylinositol, qui est un phospholipide modifié. Les VSGs sont les composants majeurs du parasite (environ 10^7 molécules par cellule) et forment un manteau dense recouvrant la totalité du corps cellulaire, y compris le flagelle. Un seul type de VSG est synthétisé à un moment donné par l'expression sélective d'un seul gène de VSG à partir d'un répertoire de 1 000 à 2 000 gènes différents. Ce répertoire de gènes est si grand et dynamique

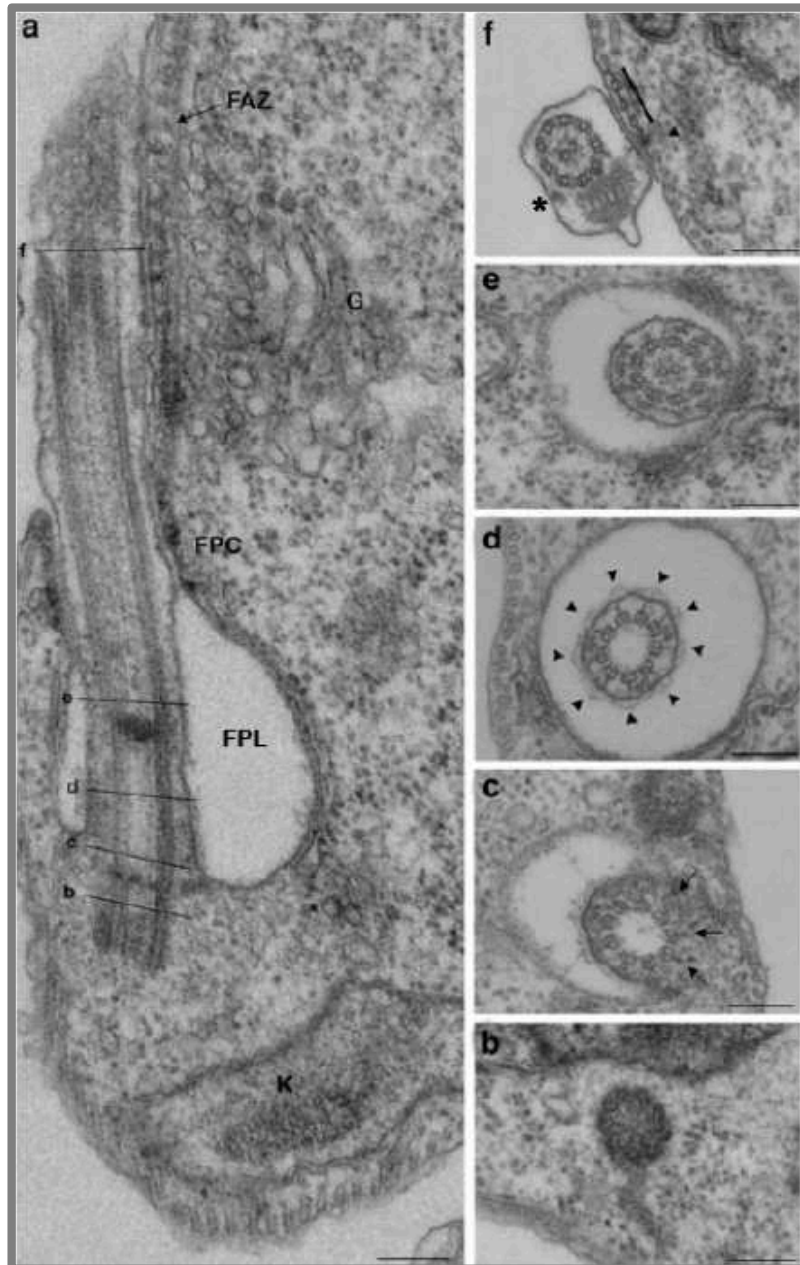


Figure 13 : Ultrastructure du flagelle de *Trypanosoma brucei*

(a) Coupe longitudinale de la base du flagelle. Le corps basal immature n'est pas visible sur cette section. (b-f) Sections transversales à travers le flagelle des domaines indiqués en (a). (b) Corps basal. (c) Le début de la zone de transition avec les fibres de transition dont l'extrémité est indiquée par des flèches. (d) La portion centrale de la zone de transition. Les têtes de flèche indiquent la collerette. (e) Axonème dans la lumière de la poche flagellaire. Du matériel dense aux électrons est fréquemment observé entre les doublets périphériques et la membrane. (f) Le flagelle contient l'axonème et la fibre paraflagellaire après sa sortie de la poche flagellaire. L'étoile indique une particule IFT. FAZ : zone d'adhésion du flagelle ; FPC : collier de la poche flagellaire ; K : kinétoplaste ; G : appareil de Golgi. Barres d'échelle : 100 nm.

Figure issue de la revue de Buisson J et Bastin.P.

que l'idée de développer un vaccin contre les protéines VSG a été définitivement abandonnée (Berriman, Ghedin et al. 2005).

Traitements

Le traitement est déterminé en fonction du stade de la maladie. Les traitements au cours de la première phase de la maladie sont plus faciles d'administration et sont moins toxiques que ceux utilisés dans la seconde phase. Lors de la première phase, la Pentamidine, découverte en 1941, est utilisée et est en général tolérée par les patients. Le second médicament, la Suramine, découverte en 1921, est utilisée lors de la trypanosomiase causée par *T. brucei rhodesiense* et provoque certains effets indésirables au niveau des voies urinaires et peut entraîner des allergies. Lors de la seconde phase, le Mélarsoprol, un dérivé de l'arsenic découvert en 1949, est utilisé contre les deux formes de l'infection puisqu'il traverse la barrière hémato-encéphalique. Cette molécule est hautement trypanocide mais peut entraîner une encéphalopathie potentiellement mortelle chez 5 à 10 % des patients. On observe une résistance accrue à ce médicament en Afrique centrale. Il est administré à une dose de 2,2 mg/kg par voie intraveineuse pendant 10 jours. L'Eflornithine est un composé moins toxique que le Mélarsoprol mais doit être injecté par voie intraveineuse toutes les 6 h pendant quatorze jours. Ce traitement est difficile à appliquer sur le terrain vu que la plupart des patients sont en zone rurale, loin de tout support hospitalier (Chappuis, Lima et al. 2010). Ce médicament est uniquement efficace contre *T. brucei gambiense*.

1.4.2 Structure et réplication du flagelle chez le trypanosome

Description structurale

Le flagelle (Figure 13) émerge d'une invagination de la membrane plasmique appelée poche flagellaire (Flagellar Pocket : FP) et représente environ 5 % de la surface totale de la cellule (Overath and Engstler, 2004). Le flagelle est composé de différentes structures tel que l'axonème et la fibre paraflagellaire (PFR). Il est fixé au corps cellulaire par la zone d'attachement flagellaire appelée FAZ et suit une trajectoire hélicoïdale gauche-droite à l'exception de son extrémité distale qui n'est pas attachée (Figure 10B, 13A). Comme chez les autres eucaryotes, il s'agit d'un organite très complexe. L'analyse protéomique de la fraction squelettique du flagelle de trypanosome a permis d'identifier 380 polypeptides (Broadhead,

Dawe et al., 2006). La purification du flagelle intact a mis en évidence 600 protéines ((Oberholzer, Langousis et al. 2011) ; (Subota, Julkowska et al. 2014)).

La poche flagellaire

Le flagelle émerge au niveau de la poche flagellaire (Figure 13a), une dépression de la surface de la membrane plasmique qui adopte une forme de demi-cœur et qui représente le seul site d'échange de vésicules entre le cytoplasme et la surface cellulaire ((Overath and Engstler 2004) ; (Field, Natesan et al. 2007)). Le col de la poche flagellaire est fermé par le collier ciliaire où une seule protéine a été identifiée nommée BILBO1. Cette protéine est spécifique aux trypanosomes et contient un domaine EF-hand. En son absence, la poche flagellaire est absente et le trafic vésiculaire est interrompu. Le flagelle continue d'être assemblé mais est plus court et détaché du corps de la cellule. La zone d'attachement flagellaire (FAZ) est absente et le corps basal migre vers l'extrémité postérieure de la cellule (Bonhivers, Nowacki et al. 2008). Dans le cas où le flagelle est absent, la poche flagellaire est présente mais plus petite ce qui entraîne une réduction de l'activité d'endocytose et une mauvaise localisation des protéines de la poche flagellaire (Absalon, Blisnick et al. 2008).

Le corps basal

Le corps basal est le centre organisateur des microtubules du flagelle. Son positionnement varie au cours du cycle parasitaire, où il peut être trouvé dans des positions antérieure ou postérieure par rapport au noyau (Figure 12). La partie proximale du corps basal mature est constituée de neuf triplets de microtubules (A, B, C) organisés en une structure de type cylindrique autour d'un axe central (Figure 13b). A la partie distale du corps basal mature, les microtubules (MT) C s'arrêtent et les MT A et B continuent pour former la zone de transition puis l'axonème. Le corps basal est lié au kinétoplaste (ADN mitochondrial) par un réseau de filaments appelé complexe d'attachement tripartite (Tripartite Attachment Complex: TAC) ((Robinson and Gull, 1991) ; (Ogbadoyi, Robinson et al. 2003)) (Figure 13a).

La zone de transition

La zone de transition est située dans la poche flagellaire et, est comprise entre les extrémités distales des microtubules C et le début de la paire centrale de microtubules de

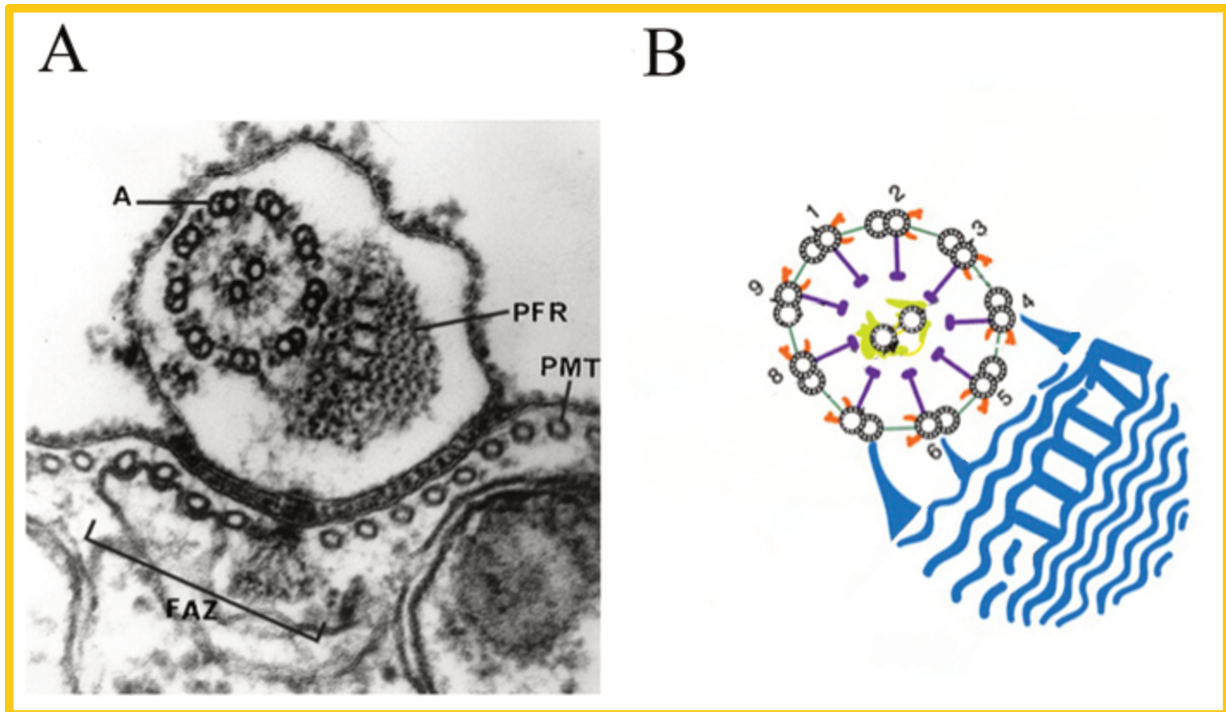


Figure 14 : Flagelle de *Trypanosoma brucei*

A) Section transversale du flagelle de *T. brucei* observé par microscopie électronique à transmission. L'ultrastructure de l'axonème (A) en « 9+2 » et la fibre paraflagellaire (PFR) sont aisément reconnaissables. On retrouve également les quatre microtubules spécialisés (PMT) appelés quartet dont le rôle serait d'établir un premier contact entre le cytosquelette et la membrane de la poche flagellaire. La zone de fixation du flagelle est annotée FAZ (Flagellar Attachment Zone).
Figure de (Sherwin and Gull 1989).

B) Schéma représentatif d'une coupe transversale du flagelle de *T. brucei*, indiquant les microtubules en noir, les liens de nexine en vert, les ponts radiaux en violet, les bras de dynéines en orange et les projections de la paire centrale en jaune. La PFR est représentée en bleu avec ses domaines proximal, intermédiaire et distal.
Figure de (Branche, Kohl et al. 2006).

l'axonème (Figure 13c, d). A la base de la zone de transition, des projections denses aux électrons connectent chaque doublet de microtubules à la membrane (flèches sur la Figure 13c). Ces fibres radiaires forment un collier qui pourrait jouer un rôle dans la séparation physique du flagelle et du cytoplasme (Stephan, Vaughan et al. 2007). Un second élément, situé dans la lumière de la poche flagellaire et au niveau de la zone de transition est appelé collerette (flèches sur la Figure 13d). Elle a été visualisée pour la première fois chez *T. vivax* (Vickerman, 1973) puis de nouveau observée à l'aide de la reconstruction en 3D de tomogrammes de *T. brucei* (souche 427) (Lacomble, Vaughan et al. 2009). Cette structure est complexe incluant neuf sous-unités régulièrement espacées et semble être conçue pour agir comme un manchon externe, afin d'envelopper l'axonème. Sa fonction est inconnue mais elle pourrait représenter une barrière de filtration.

L'axonème

L'axonème du flagelle de *T. brucei* présente une ultrastructure dite en « 9+2 » avec 9 doublets de microtubules périphériques entourant une paire centrale de singulets de microtubules (Figure 13 e,f et 14A). Il est la continuité de la zone de transition et débute à partir de la plaque basale et s'étend jusqu'à l'extrémité distale du flagelle. Les doublets périphériques portent les bras de dynéines internes et externes qui sont responsables du mouvement flagellaire, les ponts radiaires ancrés au MT-A et orientés vers la paire centrale et des liens de nexine qui relient les doublets de microtubules périphériques entre eux (Figure 14B). La comparaison du génome a révélé que la grande majorité des protéines axonémales sont conservées chez *T. brucei* ((Branche, Kohl et al. 2006) ; (Ralston, Kabututu et al. 2009)). Par exemple, la protéine PF16 de la paire centrale est similaire à 82 % avec son homologue humain. L'extinction de la protéine chez *T. brucei* conduit à une absence partielle ou totale de la paire centrale entraînant la paralysie du flagelle, un phénotype retrouvé chez les souris knock-out ((Zhang, Sapiro et al. 2002) ; (Branche, Kohl et al. 2006)). Les sous-unités de microtubules α et β -tubuline subissent des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la glutamylation ((Schneider, Sherwin et al., 1987) ; (Casanova, de Monbrison et al., 2015)), mais pas la glycylation (Weber, Schneider et al. 1997). Des tubulines moins abondantes tels que γ -, ϵ -, δ -, tubuline sont présentes chez les trypanosomatidés, probablement au corps basal (Vaughan, Attwood et al. 2000). La γ -tubuline est localisée à la base du flagelle chez *T. brucei*. L'extinction de la γ -tubuline entraîne une réduction de la mobilité du nouveau flagelle. Pour

comprendre cette réduction, des observations de coupes transversales de flagelles ont été réalisées par microscopie électronique à transmission. Ces analyses ont révélé l'absence de la paire centrale dans plus de 45 % des cas, ce qui laisse suggérer que la γ -tubuline est essentielle pour la nucléation des microtubules de la paire centrale (McKean, Baines et al. 2003).

Chez *T. brucei*, l'orientation de l'axonème a été défini en fonction de la paire centrale. La visualisation de la PFR permet le tracé d'une ligne verticale passant entre les microtubules de la paire centrale. Par la suite, la visualisation des bras de dynéines permet de déterminer l'orientation du flagelle : si les bras de dynéines sont orientés dans le sens horloger, le premier doublet de microtubule rencontrant la diagonale sera annoté 1, puis le second doublet de MT le n°2 et ainsi de suite (Figure 14B).

La fibre paraflagellaire

Après émergence du flagelle de la poche flagellaire, une structure en forme de treillis appelée fibre paraflagellaire (PFR) longe l'axonème jusqu'à l'extrémité distale (Figure 15A et B). Les images en coupes transversales obtenues en microscopie électronique montrent trois domaines, définis par leur position par rapport à l'axonème. Le domaine le plus proche de l'axonème est appelé domaine proximal qui est lié à ce dernier par des robustes fibres de fixation au niveau des doublets 4 et 7. Ces fibres sont résistantes à la plupart des procédures d'extraction biochimique ce qui rend la purification de la PFR difficile. Seule une digestion à la trypsine permet de séparer physiquement l'axonème de la PFR (Russell, Newsam et al. 1983). Le domaine proximal est suivi du domaine intermédiaire qui est constitué de filaments perpendiculaires aux plaques et est suivi par le domaine distal (Farina et al., 1986). Des études de protéomique révèlent que la PFR comprend au moins vingt protéines, et la plupart d'entre elles sont spécifiques aux trypanosomatidés (Portman, Lacomble et al. 2009) à l'exception notable de la calmoduline (Ginger, Collingridge et al. 2013). Les deux protéines majeures sont appelées PFR1 et PFR2 et sont codées par des gènes répétés (cinq exemplaires chacun), respectivement sur les chromosomes III et VIII (Berriman, Ghedin et al. 2005). Les protéines de la PFR1 et PFR2 sont très riches en « coiled-coil » et contiennent un domaine de liaison à la calmoduline (Schlaeppli, Deflorin et al., 1989) qui suggère un rôle du calcium dans la fonction de la PFR (Ruben, 1987). La PFR pourrait être impliquée dans la motilité des flagelles vu que l'extinction de la PFR2 chez *T. brucei* ou la délétion du gène chez *Leishmania mexicana*

entraîne une absence partielle de la structure de la PFR et un phénotype de motilité fortement diminuée ((Santrich, Moore et al. 1997) ; (Bastin, Sherwin et al. 1998) ; (Maga and LeBowitz, 1999)). En 2004, deux adénylates kinases ont été identifiées au niveau de la PFR (Pullen, Ginger et al., 2004). Ces enzymes sont en général cytoplasmiques ou mitochondriales mais la présence de deux isoformes de l'adénylate kinase dans le flagelle soulève la question de leur fonction. Malheureusement, l'extinction de ces protéines n'a produit aucun phénotype visible.

La zone d'attachement flagellaire (FAZ)

A la sortie de la poche flagellaire, le flagelle est attaché au corps cellulaire et suit sa trajectoire hélicoïdale à l'exception de l'extrémité distale. Le site de fixation définit une région spécialisée appelée zone d'attachement du flagelle (FAZ) ((Kohl and Gull, 1998) ; (Sunter and Gull, 2016)). Le FAZ est constitué de deux structures distinctes : un filament FAZ et un groupe de 4 microtubules spécialisés. Le filament FAZ est composé d'une quinzaine de protéines ((Sun, Wang et al. 2013) ; (Sunter, Varga et al. 2015)) et est positionné dans un espace entre deux microtubules du corset sous-pelliculaire et le quartet est situé à côté de lui. Une immunisation de souris avec des préparations squelettiques (qui contiennent l'axonème, le FAZ et le noyau) de flagelles extraites au moyen de Ca^{2+} ont permis de produire plusieurs anticorps monoclonaux dont certains reconnaissent des composants moléculaires du FAZ (Kohl, Sherwin et al. 1999). L'analyse par Western blot révèle des protéines de haut poids moléculaires (> 200 kDa) contenant des domaines répétés (Kohl, Sherwin et al. 1999). La protéine FAZ1 contient 36 à 70 répétitions d'un domaine unique de 14 acides aminés. Elle ne semble pas nécessaire pour l'assemblage du filament mais contribue à la progression du cycle cellulaire (Vaughan, Kohl et al. 2008). Le FAZ comprend également un groupe de quatre microtubules spécialisés qui sont associés au réticulum endoplasmique lisse (barre Figure 14f et 15A). Ils sont distincts des autres microtubules du cortex sous-pelliculaire par différents aspects. La polarité de ces microtubules (l'extrémité « + » des microtubules) est opposée à l'ensemble des microtubules sous-pelliculaires (Robinson, Sherwin et al. 1995) c'est-à-dire la même que celles des microtubules du flagelle. Par ailleurs, ces microtubules sont distincts des autres microtubules sous-pelliculaires par leur haute stabilité en présence de concentrations élevées en NaCl (Sherwin and Gull, 1989). La nature moléculaire de ces microtubules reste très peu connue. L'anticorps monoclonal 1B41 anti β -tubuline reconnaît spécifiquement le quartet en immunofluorescence sans réactivité croisée avec les microtubules cytoplasmiques (Gallo, Precigout et al. 1988) et la γ -tubuline semble également abondante (Scott, Sherwin et al. 1997).

L'observation de coupes transversales du flagelle montre également la présence d'une structure filamenteuse qui relie la membrane associée au FAZ avec le domaine proximal de la PFR (Sherwin and Gull, 1989). Une glycoprotéine transmembranaire appelée FLA1 est essentielle à la fixation du flagelle chez *T. cruzi* (Cooper, de Jesus et al. 1993) et *T. brucei* (LaCount, Barrett et al. 2002) et celle-ci agirait comme un agent de liaison entre la surface de la cellule et le flagelle. Récemment, une nouvelle protéine de liaison à FLA1 (FLA1BP) a été identifiée dans le flagelle de *T. brucei*. Cette nouvelle protéine est nécessaire pour joindre la membrane flagellaire à la membrane cellulaire et lier l'élongation du FAZ à la biogenèse du flagelle (Sun, Wang et al. 2013). Du côté de l'axonème, la protéine FLAM3 est essentielle à l'adhésion (Rotureau, Blisnick et al. 2014).

Le filament FAZ et les quatre microtubules sont aussi présents dans les espèces de *Leishmania* (Alexander and Phillips 1978) mais leur longueur est plus courte par rapport au gène Trypanosoma (Weise, Stierhof et al. 2000, Sunter, Varga et al. 2015). Les gènes codant FLA1 et FAZ1 sont présents dans les génomes de toutes les sous-espèces de *Leishmania* (Kohl and Bastin 2005).

La membrane flagellaire

La membrane plasmique chez *T. brucei* comporte trois domaines distincts : la membrane pelliculaire, la membrane flagellaire et celle de la poche flagellaire (Figure 14A). Ces trois domaines diffèrent de manière significative à la fois dans la composition lipidique et protéique. Une étude récente a mis en évidence pour la première fois que le flagelle de *T. brucei* a une composition très différente en phospholipides et en sphingolipides comparé à la membrane cellulaire ce qui suggère l'existence d'un environnement membranaire distinct (Serricchio, Schmid et al. 2015).

Plusieurs protéines ont été localisées dans la poche flagellaire et la membrane flagellaire. Dans la membrane flagellaire de *T. brucei*, certaines adénylates cyclases (Paindavoine, Rolin et al. 1992), la calflagine, une famille de protéines liant le calcium (Wu, Haghghat et al. 1992) et de petites protéines myristoylées (SMP-1), importantes dans la signalisation cellulaire, ont été retrouvées. Ces deux dernières protéines peuvent intégrer la membrane flagellaire grâce à leur extrémité amino-terminale qui sont tous deux myristoylées et palmitoylées (Godsel and Engman 1999). Chez *T. brucei*, la calflagine s'associe aux radeaux lipidiques de la membrane flagellaire. Après infection de souris, l'inhibition de la famille des

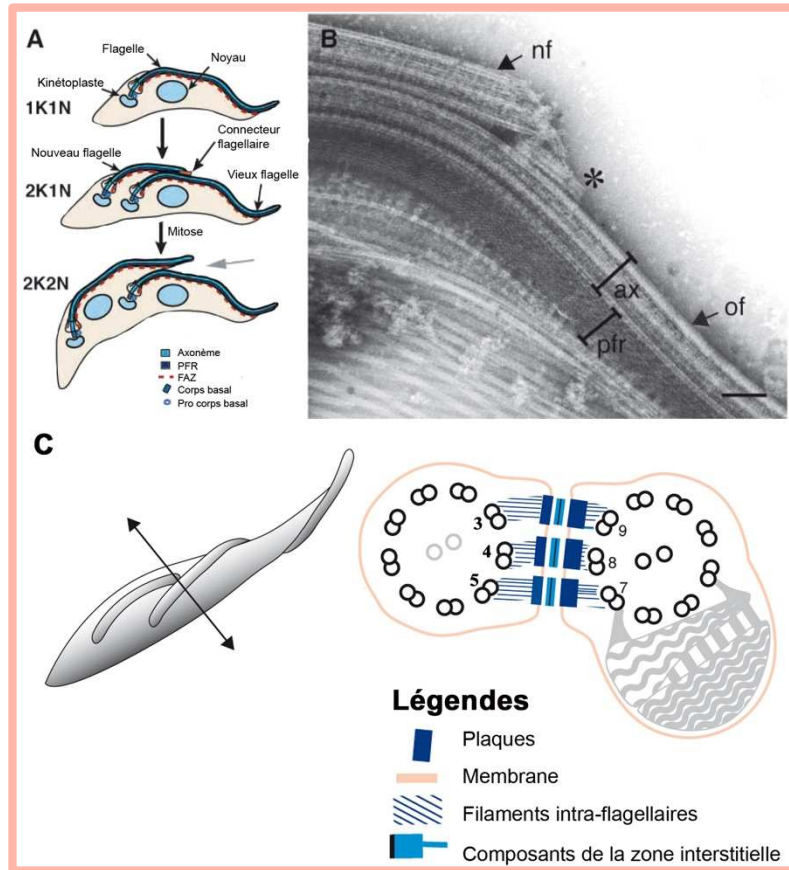


Figure 15 : Visualisation du connecteur flagellaire (FC) au niveau de l'extrémité distale du nouveau flagelle

- A) Représentation schématique du cycle cellulaire des trypanosomes au stade procyclique. Au stade G1, le trypanosome possède un kinétoplaste et un noyau (1K1N) avec un seul flagelle fixé le long du corps cellulaire. Lors du cycle cellulaire, l'élongation du nouveau flagelle coïncide avec la duplication et la ségrégation du kinétoplaste (stade 2K1N). Le nouveau flagelle est physiquement attaché à l'ancien flagelle via le connecteur flagellaire (FC). Après la mitose (stade 2K2N) et l'initiation de la cytokinèse, cette connexion est libérée.
- B) Coloration négative de cytosquelette d'un trypanosome procyclique. Le connecteur flagellaire (montré par un astérisque) est positionné à la pointe du nouveau flagelle (nf) et le long du côté de l'axonème (ax) de l'ancien flagelle (of : old flagellum) et non à la fibre paraflagellaire (pfr). Le connecteur flagellaire est composé de trois couches distinctes (couches 1, 2, 3) avec une extension filamenteuse (marquée par une barre), s'étendant jusqu'à l'extrémité distale du nouveau flagelle formant ainsi une structure triangulaire.
- C) Figure illustrant la structure du FC en coupe transversale. La flèche indique un plan théorique passant par la section de la zone du connecteur flagellaire. Ce modèle est basé sur des données obtenues sur des sections transversales en microscopie électronique à transmission. Les doublets extérieurs de l'axonème sont liés au connecteur flagellaire.

Figure adaptée de (Briggs, McKean et al. 2004 , Hoog, Lacomble et al. 2016).

calflagines par ARNi amène à une augmentation de la survie de l'hôte et à une atténuation de la parasitémie. L'analyse *in vitro* du phénotype a montré une prolifération normale avec une morphologie et une mobilité flagellaire équivalentes au contrôle (Emmer, Daniels et al. 2010). *T. brucei* possède une grande famille de récepteurs transmembranaires de type adénylate cyclase dont l'activation nécessite la dimérisation du domaine catalytique. L'utilisation d'une stratégie de dominant négative a permis de réduire de moitié l'activité enzymatique, ce qui réduit la capacité du parasite à contrôler la défense immunitaire innée de l'hôte (Salmon, Vanwalleghem et al. 2012).

Le connecteur flagellaire (FC)

Dans la forme procyclique de *T. brucei*, le connecteur flagellaire (Flagellar Connector ou FC) relie l'extrémité distale du nouveau flagelle sur le côté de l'ancien flagelle (Moreira-Leite, Sherwin et al. 2001) (Figure 15A). Cette structure est très solide et résiste aux contraintes mécaniques exercées par le battement des deux flagelles. Elle reste intacte après traitement au détergent et extraction avec de hautes concentrations en NaCl. La structure du connecteur flagellaire a été caractérisée par microscopie électronique sur des cytosquelettes de *T. brucei* (Figure 15B). Cette structure est définie en trois couches en partant du nouveau flagelle : (1) la couche la plus mince d'environ 13 nm d'épaisseur, (2) la couche centrale d'environ 18 nm et (3) une couche d'environ 16 nm (Figure 15C) (Briggs, McKean et al. 2004). En coupe transversale, le FC apparaît comme une région dans laquelle les membranes de l'ancien et du nouveau flagelle sont juxtaposées. Le FC établit trois liaisons au niveau des doublets externes 7, 8, 9 du vieux flagelle. Remarquablement, le connecteur flagellaire n'est pas présent dans les formes sanguines de *T. brucei* et *T. cruzi* mais aussi dans les espèces de *Leishmania*.

Duplication du flagelle au cours du cycle cellulaire

Les formes sanguines (provenant du sang de mammifère) et les formes procycliques (issus de l'intestin moyen de la mouche tsé-tsé) sont cultivées dans des milieux de culture spécifique et peuvent atteindre des densités élevées ($5 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^7$) avec un temps de doublement de 6 h pour les formes sanguines et 8 h pour les formes procycliques. Ces deux formes se divisent par fission binaire après la duplication de tous les organites dans une chronologie très bien définie. Le premier organite à se dupliquer est le corps basal qui conduit à la formation d'un nouveau flagelle qui se trouve initialement dans une position antérieure par rapport à

l'ancien flagelle (Sherwin and Gull 1989). Lors de son élongation, le nouveau flagelle tourne autour de l'ancien pour se replacer en position postérieure et émerger d'une nouvelle poche flagellaire. Peu avant la phase S, la réplication de l'ADN du kinétoplaste commence (Woodward and Gull 1990) et la ségrégation des kinétoplastes est visible bien avant la mitose nucléaire. Il en résulte une cellule avec deux kinétoplastes et un noyau (2K1N). Cette ségrégation est gouvernée par la migration des corps basaux (Robinson and Gull 1991). L'allongement du corset de microtubules se déroule au niveau postérieur de la cellule (Sherwin and Gull 1989) et s'accompagne d'une augmentation de plus de 20 % du volume initial de la cellule (Rotureau, Subota et al. 2011). Le bout distal du nouveau flagelle reste attaché à l'ancien par le connecteur flagellaire (Moreira-Leite, Sherwin et al. 2001). Cette configuration particulière, associée à l'allongement du flagelle, conduit à la relocalisation du nouveau complexe kinétoplaste / corps basal au niveau postérieur de la cellule (Absalon, Kohl et al. 2007). La construction du flagelle est accompagnée par la formation d'un nouveau FAZ (Figure 19D), qui assure l'adhésion du nouveau flagelle. La mitose se produit sans rupture de la membrane nucléaire, conduisant à une cellule avec deux kinétoplastes et deux noyaux (2K2N). Lorsque le nouveau flagelle a atteint une certaine longueur, l'extrémité antérieure du nouveau FAZ définit la position du sillon de clivage (Kohl, Robinson et al. 2003). Le sillon s'effectue de la partie antérieure vers la partie postérieure, de telle manière que chaque cellule fille hérite d'une copie de chaque organite. Au cours de la cytokinèse, la pointe distale du nouveau flagelle se sépare de l'ancien (Briggs, McKean et al. 2004) et deux cellules filles sont visibles, maintenues par une fine membrane. La mobilité de chacun des flagelles contribue à la séparation des cellules filles qui peuvent à leur tour réintégrer le processus de division cellulaire ((Branche, Kohl et al. 2006) ; (Broadhead, Dawe et al. 2006)).

1.4.3 Fonctions du flagelle chez *T. brucei*

Fonction de mobilité

Le flagelle du trypanosome permet au parasite de se déplacer. La motilité se définit par la propagation d'ondes flagellaires qui est initiée de l'extrémité distale du flagelle vers la base de l'organite assurant la nage en avant. Ces ondes alternent avec celles qui se propagent de la base à l'extrémité et qui assurent les changements d'orientation ((Walker, 1961) ; (Branche, Kohl et al. 2006)). Les ondes propulsives sont de haute fréquence et de basse amplitude au contraire de celles de la nage inverse. Ils alternent entre le mouvement de propulsion et la culbute (tumbling), ce qui provoque une réorientation de la nage (Hutchings, Donelson et al.

2002). Les trypanosomes sont très mobiles et lorsqu'ils sont cultivés en milieu liquide, ils peuvent se déplacer à une vitesse de 20 μm par seconde. Le flagelle est attaché le long du corps cellulaire et des observations utilisant des approches de vidéo microscopie, permettent de caractériser la motilité ((Rodriguez, Lopez et al. 2009) ; (Heddergott, Kruger et al. 2012) ; (Bargul, Jung et al. 2016)). Le mécanisme proposé par le mouvement du flagelle a été corroboré par des simulations informatiques et montrent que le mouvement du flagelle de *T. brucei* est une adaptation à son environnement dense comme le sang ou les tissus.

La motilité du parasite est influencée par l'environnement qu'il rencontre chez son hôte. Bien que non formellement prouvé, il est possible que le mouvement de *T. brucei* à travers les tissus hôtes sont cruciaux pour le développement ou la transmission. Dans l'hôte mammifère, *T. brucei* peut pénétrer dans l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique en vue de progresser jusqu'au système nerveux central (SNC). Deux voies d'invasion du SNC ont été proposées : dans le premier modèle, les parasites pénétreraient les jonctions serrées de l'épithélium de la barrière hémato-encéphalique pour entrer dans le liquide céphalo-rachidien, où ils envahissent la pie-mère et le cerveau ((Mulenga, Mhlanga et al. 2001) ; (Wolburg, Mogk et al. 2012)). Dans le second modèle, les parasites pénétreraient dans les jonctions serrées des cellules endothéliales de la barrière encéphalique du cerveau et envahiraient directement le cerveau (Frevert, Movila et al. 2012). Dans les deux modèles, la mobilité des parasites est supposée faciliter la pénétration des tissus, bien que ce modèle n'ait pas encore été testé directement.

Chez l'insecte, *T. brucei* se déplace dans une séquence ordonnée à travers plusieurs tissus, voyageant de l'intestin moyen vers les glandes salivaires où les parasites se différencient en stade métacyclique. Ils parcourent une grande distance et doivent pénétrer la matrice pérित्रophique et le proventricule suggérant un rôle important de la mobilité. Ceci a été démontré *in vivo* par l'étude du mutant *DNAIL-/-*. DNAIL est une protéine indispensable à l'assemblage des bras de dynéines externes et son absence entraîne un défaut de mobilité des parasites qui battent leur flagelle mais ne réussissent pas à nager en avant (Branche, Kohl et al. 2006). Les cellules restent viables en culture et réussissent à infecter l'intestin postérieur de la mouche tsé-tsé mais ne parviennent pas à atteindre l'intestin antérieur et ne se différencient pas. Ceci est la première démonstration *in vivo* que la mobilité du trypanosome est essentielle à la réalisation du cycle parasitaire (Rotureau, Ooi et al. 2014). Le stade métacyclique, produit dans les glandes salivaires est le seul capable d'infecter un hôte mammifère ((Vickerman, 1985) ; (Rotureau,

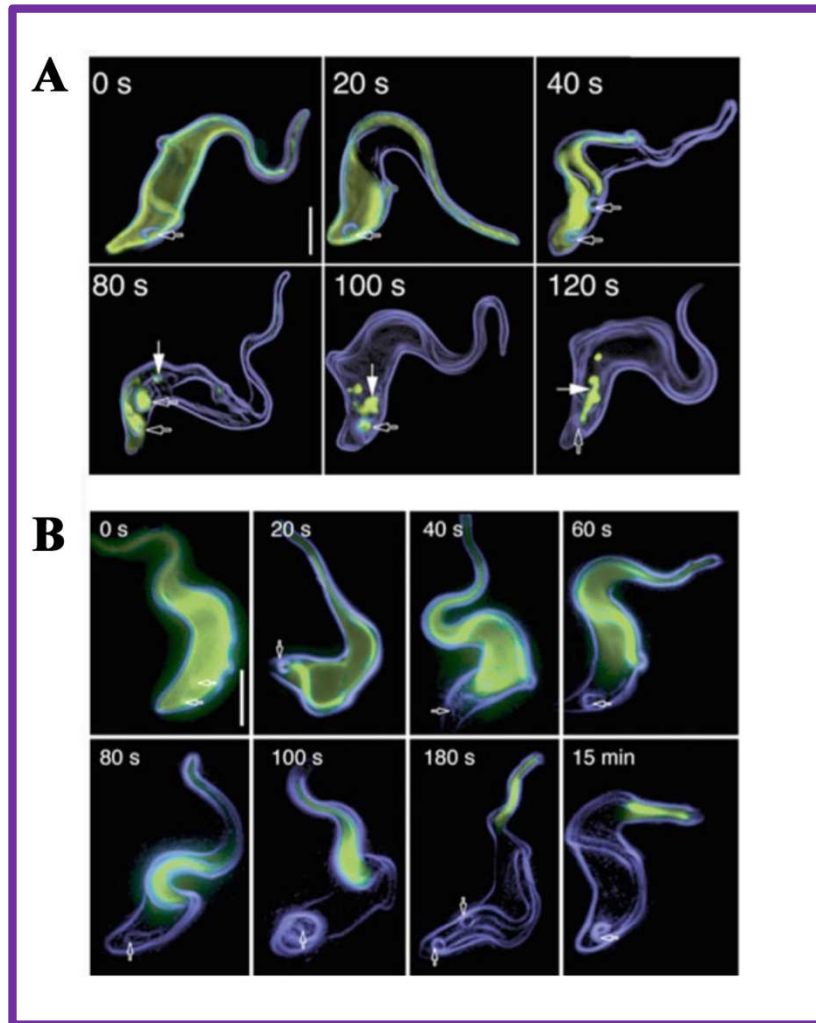


Figure 16 : La nage en avant de *T. brucei* est nécessaire pour le déplacement des IgG-VSG vers la poche flagellaire

A) Visualisation de l'anticorps de surface. La surface des cellules a été marquée avec un colorant bleu fluorescent et incubées sur la glace pendant 10 min avec un IgG anti-VSG spécifique (marqueur fluorescent vert). Après 3 min d'incubation à 37°C, les cellules ont été fixées. Les flèches ouvertes indiquent la poche flagellaire et les flèches pleines le lysosome. Barre d'échelle 3 mm.

B) La direction de la nage indique l'itinéraire de déplacement des IgG-VSG au niveau de la surface cellulaire. En absence des bras de dynéines externes (DNAI1), les cellules nagent en arrière (Branche, Kohl et al. 2006) et les IgG-VSG s'accumulent à la partie antérieure.

Figure de (Engstler, Pfohl et al. 2007).

Subota et al. 2012)). Cependant, l'importance de la motilité des parasites à ce stade lors de la transmission de la maladie par la mouche tsé-tsé n'a pas été directement testé. Des mutations dans la sous-unité LC1 de la tubuline entraînent des perturbations dans la mobilité propulsive mais ne portent pas atteinte à la viabilité cellulaire. L'utilisation de ce mutant *LC1* a permis de déterminer qu'une perturbation de la mobilité du trypanosome n'a pas d'effet visible sur l'infection de la souris (Kisalu, Langousis et al. 2014).

Le flagelle de *T. brucei* est essentiel pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Le battement flagellaire est nécessaire pour dégager de la surface les immunoglobulines qui se fixent en permanence aux VSG (Engstler, Pfohl et al. 2007). L'écoulement hydrodynamique généré par le battement flagellaire provoque un mouvement directionnel de complexes immuns Immunoglobulines-VSG vers la poche flagellaire à la partie postérieure de la cellule où ils sont internalisés et éliminés (Figure 16A). Chez le mutant *DNAIL*, les cellules nagent vers l'arrière entraînant un déplacement opposé des IgG-VSG qui s'accumulent à la partie antérieure de la cellule (Figure 16B).

Fonction d'adhésion

La fixation du flagelle aux microvillosités des cellules épithéliales (Vickerman, Tetley et al. 1988) (Figure 17) permet au parasite d'établir une infection permanente au niveau des glandes salivaires, ce qui modifie le comportement alimentaire de la mouche, en favorisant leur transmission aux hôtes mammifères (Van Den Abbeele, Caljon et al. 2010). L'attachement du flagelle est aussi corrélé au cycle cellulaire et au début de la différenciation chez les mammifères, en trypomastigotes infectieux (Rotureau, Subota et al. 2012). Cette étape n'a pas pu être reproduite *in vitro* et les composants moléculaires impliqués restent inconnus. Il est possible que la fixation du flagelle soit cruciale au cycle parasitaire vu que le relargage dans la salive de parasites non matures ne permettrait pas la transmission chez l'hôte.

Fonction sensorielle

Récemment, le rôle des cils et flagelles comme organes de détection a été mis en évidence chez les organismes unicellulaires ou pluricellulaires (Singla and Reiter, 2006). Les cils peuvent être comparés à des antennes ayant des fonctions sensorielles associées à des récepteurs et des effecteurs, dont certains pourraient être contrôlés par l'action de l'IFT

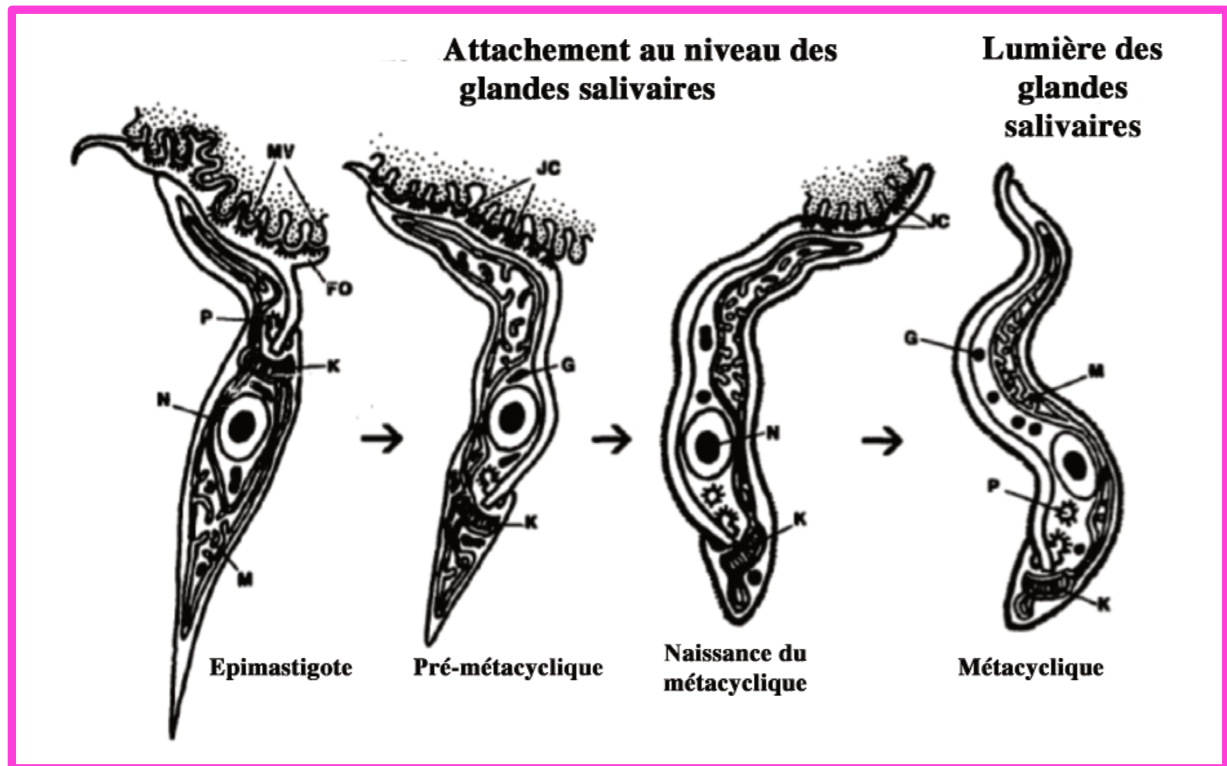


Figure 17 : Rôle du flagelle dans l'adhésion de *T. brucei* à l'épithélium des glandes salivaires

Les trypanosomes utilisent leur flagelle pour s'attacher aux microvillosités (MV) de l'épithélium des glandes salivaires de la mouche tsé-tsé. Pour ce faire, l'excroissance de la membrane flagellaire (FO) forme des jonctions évoquant des hémidesmosomes (JC). M : mitochondrie ; N : noyau ; K : kinétoplaste ; P : poche flagellaire, G : glycosomes.

Figure adaptée de (Vickerman, Tetley et al. 1988).

(Marszalek, Liu et al. 2000). L'IFT déplace certaines protéines membranaires dans les cils primaire de cellules de mammifères (Kovacs, Whalen et al. 2008), dans les cils des neurones sensoriels chez *C. elegans* (Qin, Burnette et al. 2005) ou dans les flagelles de *Chlamydomonas* (Wang, Melzer et al. 2005). Le transport intraflagellaire pourrait contribuer à la fonction sensorielle des cils et flagelles en concentrant les récepteurs et effecteurs impliqués dans la perception de l'environnement et en échangeant des molécules de signalisation avec le corps cellulaire. Chez *T. brucei*, le flagelle serait également un organite sensoriel car il interagit directement avec les tissus hôtes (Oberholzer, Langousis et al. 2011).

Fonction de morphogénèse

Les trypanosomes sont des cellules fortement polarisées avec l'extrémité + des microtubules situés à la partie postérieure. Seule la tubuline néo-synthétisée est tyrosinée et l'anticorps monoclonal YL1/2 reconnaît spécifiquement la tyrosination C-terminale de l' α -tubuline et permet de détecter l'incorporation de celle-ci après synthèse. Chez les cellules en cours de réplication cellulaire, l'anticorps marque les corps basaux, l'extrémité postérieure de la cellule et la partie distale du nouveau flagelle (Figure 18A). Le pattern de fluorescence change lorsqu'il y a séparation des kinétoplastes. A ce moment, l'intensité de fluorescence décroît au niveau postérieur de la cellule et la fluorescence est réduite de moitié au niveau du nouveau flagelle puisque ce dernier est moins tyrosiné (Figure 18B). Après la mitose, YL1/2 marque uniquement les corps basaux et la partie postérieure de la cellule tandis qu'aucun des deux flagelles n'est détecté (Figure 18C). Ces expériences ont démontré que les microtubules s'allongent à l'extrémité postérieure de la cellule et que le flagelle grandit bien par incorporation de la tubuline au bout distal (Sherwin, Schneider et al. 1987).

Au cours du cycle cellulaire, les trypanosomes dupliquent leur flagelle et différentes structures associées à la biogenèse du flagelle ont été étudiées en particulier le FAZ et le connecteur flagellaire. Lorsqu'un nouveau flagelle se construit, un nouveau filament FAZ émerge et se prolonge vers l'extrémité antérieure de la cellule (Figure 18D). Afin de permettre la division cellulaire, un sillon de clivage s'initie entre l'ancien et le nouveau flagelle et progresse vers l'extrémité postérieure de la cellule en suivant l'axe du nouveau FAZ qui pourrait donc être essentiel pour la formation du sillon de clivage (Robinson, Sherwin et al. 1995). La pointe du nouveau filament FAZ est toujours positionnée au point d'initiation de la

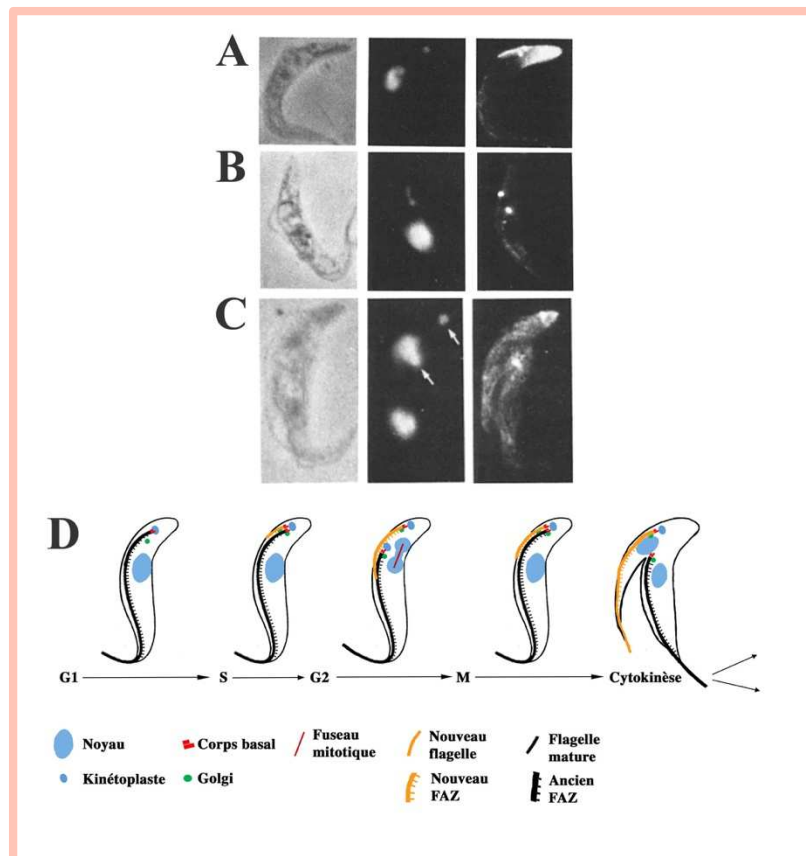


Figure 18 : Localisation de la tubuline tyrosinée en fonction du cycle cellulaire et duplication du FAZ chez *T. brucei*

Les cellules sont disposées en fonction de leur cycle cellulaire. La première partie du panneau A, B et C représente la photographie de la cellule observée en contraste de phase, puis le marquage des noyaux et kinétoplastes colorés avec le DAPI, et les trois dernières images représentent le marquage obtenu après l'utilisation de l'anticorps anti-YL1/2. Les flèches montrent les deux kinétoplastes.

- A) Marquage avec l'anticorps anti YL1/2 des corps basaux, de l'extrémité postérieure de la cellule et de l'extrémité distale du nouveau flagelle.
- B) Après séparation des kinétoplastes, l'intensité de fluorescence décroît au niveau postérieur de la cellule et le bout distal du nouveau flagelle est tyrosiné.
- C) Dans le stade 2K2N, les corps basaux et la partie postérieure de la cellule (surtout de la cellule fille) sont marqués avec l'anticorps anti YL1/2.
- D) La progression dans le cycle cellulaire est représentée lors des phases G1, S, G2, M et la cytokinèse. Les organites présents sont indiqués : les kinétoplastes et les noyaux sont indiqués en bleu, le corps basal en rouge, l'appareil de Golgi en vert, le vieux flagelle en noir et le nouveau flagelle en orange. Le FAZ suit les flagelles le long du corps cellulaire (indiqué en traits pointillés dans la même couleur que le flagelle correspondant). Le fuseau mitotique est représenté en rouge foncé dans le noyau.

Figure de (Sherwin, Schneider et al. 1987).

cytokinèse (Kohl, Robinson et al. 2003) et la pointe du nouveau flagelle est physiquement connectée à l'ancien flagelle par le connecteur flagellaire (Moreira leite, 2001) (Figure 16A). Un antisérum anti-FC marque uniquement la pointe du nouveau flagelle, l'ancien n'étant pas marqué (Figure 19 A-C). Fait surprenant, en absence de nouveau flagelle chez les cellules *IFT88^{RNAi}* induits pendant 36h, 30 % des cellules ont toujours le connecteur flagellaire dans le vieux flagelle suggérant qu'au moins quelques éléments de cette structure pourraient être encore présents et déplacés, même en absence du nouveau flagelle (Figure 19D) (Kohl, 2003). A l'heure d'aujourd'hui, la composition du connecteur flagellaire ainsi que son mode de déplacement dans le flagelle mature sont toujours inconnus.

En absence de construction du flagelle, des défauts majeurs dans l'organisation cellulaire et la polarité ont également été rapportés. L'utilisation d'un anticorps anti-clathrine (un marqueur de la polarité) (Morgan, Allen et al. 2001) permet de localiser cette protéine à l'extrémité postérieure des cellules autour de la poche flagellaire, entre le kinétoplaste et le noyau. Dans les mutants *IFT88^{RNAi}* (protéines flagellaires) et *DHC1b^{RNAi}* (moteur rétrograde), la clathrine est dispersée dans le cytoplasme, suggérant des défauts de polarité. Les cellules non flagellées ne parviennent pas à se diviser : l'absence de l'ancien flagelle empêche la formation du nouveau filament FAZ mais la mitose a encore lieu, produisant des cellules multi-nucléées. Ces données montrent que la formation du nouveau filament FAZ est nécessaire pour la cytokinèse (Kohl, Robinson et al. 2003). Des études supplémentaires ont montré que l'extinction par ARNi des protéines RSP3, PF16 et PF20 donne lieu à des défauts sévères dans la mobilité cellulaire. La perte de motilité est suivie d'un défaut de division cellulaire, entraînant des amas cellulaires reliés par leur extrémité postérieure. L'agitation de la culture cellulaire restaure la division, rétablit la vitesse de croissance cellulaire et empêche la formation d'amas cellulaires. (Ralston, Lerner et al. 2006). Ces données indiquent que les forces de rotation et de traction générées par le battement flagellaire sont nécessaires pour la séparation des cellules ((Branche, Kohl et al. 2006) ; (Ralston, Lerner et al. 2006)).

1.5 Biogénèse des cils et flagelles

Les cils et flagelles sont des organites très complexes sur le plan structural et moléculaire. Des analyses protéomiques ont identifié plusieurs centaines de protéines que ce soit dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (Ostrowski, Blackburn et al. 2002), chez *Chlamydomonas* (Pazour, Agrin et al. 2005), *T. brucei* (Broadhead, Dawe et al. 2006);

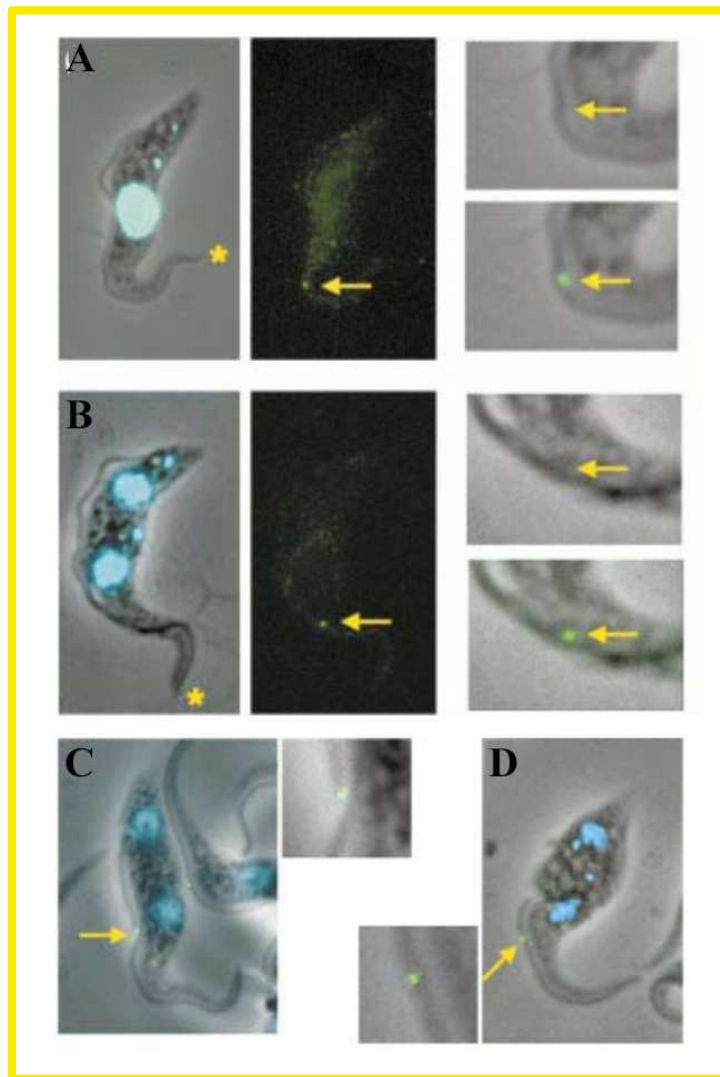


Figure 19 : Position du connecteur flagellaire dans les cellules de type sauvage et dans les cellules *IFT88^{RNAi}* induites

(A-D) Les cellules ont été marquées avec un anti-sérum anti-FC (Flagellar connector). Les panneaux de gauche représentent les cellules en contraste de phase et fusionnées avec le marquage DAPI (bleu). Les panneaux centraux montrent uniquement le marquage avec l'anti-sérum anti-FC (vert). Les étoiles jaunes indiquent l'extrémité du vieux flagelle et les flèches jaunes pointent le connecteur flagellaire. (A-B) Les cellules possèdent deux flagelles : la pointe du nouveau flagelle est marquée tandis que la pointe de l'ancien flagelle n'est pas allumée. (C-D) Cellules *IFT88^{RNAi}* induites pendant 36h. (C) Le nouveau flagelle est trop court mais le marquage du connecteur flagellaire est toujours présent à l'extrémité distale du flagelle bien qu'il soit trop court pour ce stade du cycle cellulaire. (D) Cellules binucléées sans nouveau flagelle. Le marquage du connecteur flagellaire est toujours présent sur l'ancien flagelle sur environ 30% des cellules observées.

Figure de (Kohl, Robinson et al. 2003).

(Subota, Julkowska et al. 2014) ou *Tetrahymena* (Smith, Northey et al. 2005). Dans ce chapitre, nous allons discuter de la biogenèse du flagelle.

Les premières expériences réalisées afin de comprendre le mécanisme d'assemblage des flagelles ont été réalisées par Joël Rosenbaum dans les années 60 ((Rosenbaum and Child, 1967) ; (Rosenbaum and Carlson, 1969)). L'utilisation de quatre espèces de protistes flagellés (*Ochromonas*, *Euglena*, *Astasia* et *Chlamydomonas*) a permis d'analyser la régénération flagellaire suite à leur amputation. La cinétique de ce processus commence par une phase de latence qui est suivie d'une croissance rapide du flagelle puis, par une phase plus lente jusqu'à atteindre la longueur finale. Cette phase de latence est reproductible quel que soit la technique utilisée pour l'amputation des flagelles et pourrait donc représenter un processus physiologique nécessaire avant l'allongement flagellaire. L'ajout de cycloheximide (un inhibiteur de la synthèse protéique) après amputation flagellaire inhibe la croissance flagellaire. L'ajout de cycloheximide après la phase de latence n'interfère pas avec la croissance rapide du flagelle. La synthèse de protéines flagellaires est donc indispensable et a lieu pendant la phase de latence (Rosenbaum and Child, 1967), démontrant la présence de précurseurs flagellaires. Des études auto-radiographiques avec l'utilisation de la leucine tritiée suggèrent que le site d'assemblage des protéines est situé à l'extrémité distale de l'organite ((Rosenbaum and Child, 1967) ; (Rosenbaum, Moulder et al. 1969) ; (Witman, 1975)). D'autres expériences réalisées chez *Chlamydomonas* par fusion cellulaire de différents types de gamètes ont été réalisées. Pour cette étude, des cellules sauvages, qui ont partiellement régénérées leur flagelles, et des cellules transformées exprimant une version tagguée épitope de l' α -tubuline (Kozminski, Diener et al. 1993) ont été fusionnées. Après fusion cellulaire, les flagelles partiellement régénérés ont continué leur croissance en utilisant le pool commun de protéines qui inclut l' α -tubuline marquée. L'extrémité distale est marquée de façon dépendante de l'IFT puisque le renouvellement de la tubuline n'a plus lieu chez le mutant FLA10 placé à une température restrictive (Marshall and Rosenbaum, 2001).

Le flagelle étant complètement dépourvu de ribosomes, les protéines flagellaires doivent être synthétisées dans le cytosol. Par quel processus ces protéines flagellaires sont-elles apportées au niveau du site de construction et comment sont-elles transportées pour permettre la croissance du cil ?

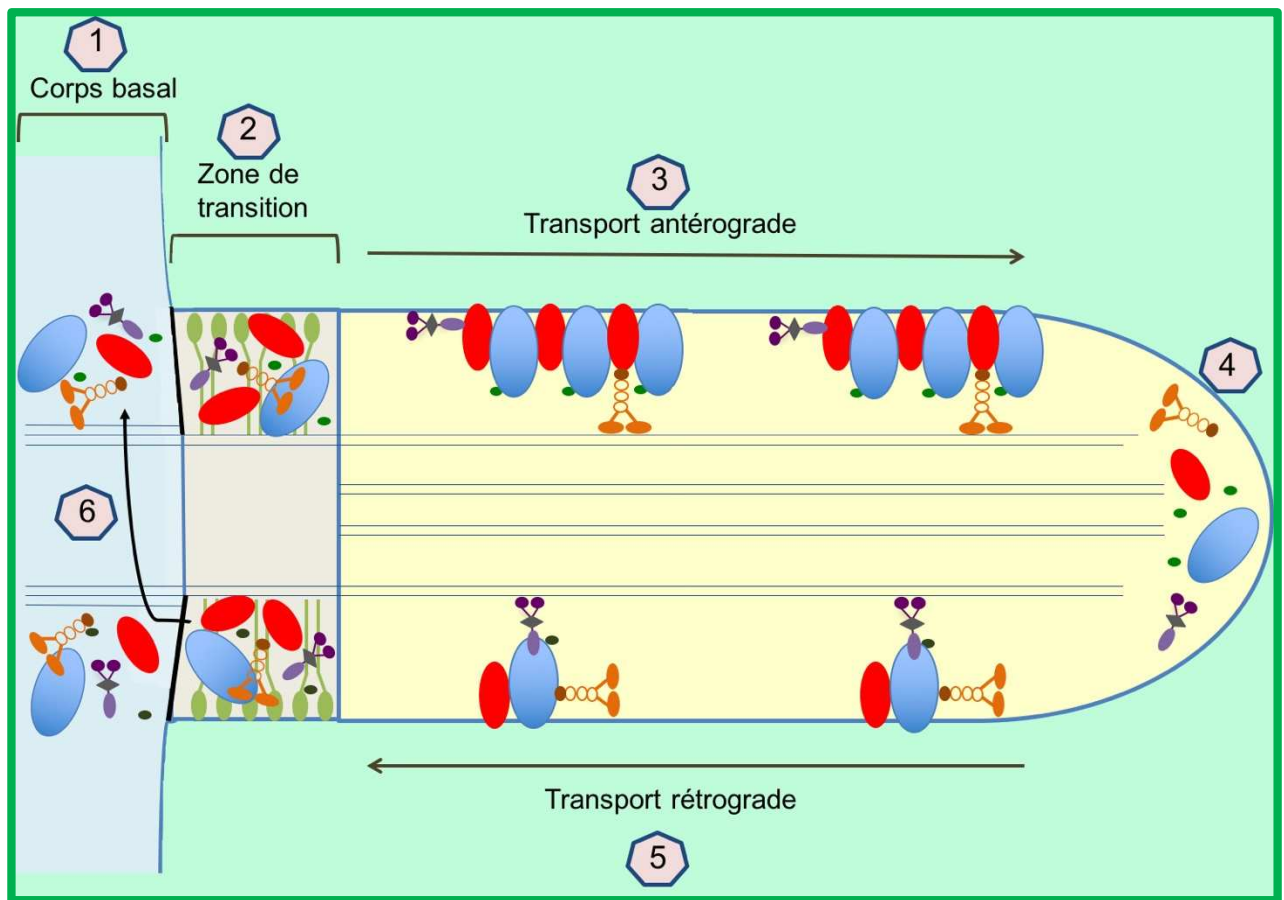


Figure 20 : Modèle du transport intraflagellaire

- 1) Les protéines IFT, les moteurs et les précurseurs axonémaux sont recrutés à la base du flagelle.
- 2) L'assemblage des particules IFT et le chargement des précurseurs axonémaux se produiraient probablement au niveau des fibres de transition.
- 3) La kinésine II est responsable du transport antérograde en direction de la pointe du flagelle. La dynéine est transportée sous une forme inactive.
- 4) Les particules IFT sont remaniées à l'extrémité distale du flagelle.
- 5) Les particules retournent à la base du flagelle par l'intermédiaire de la dynéine, responsable du transport rétrograde, pour y être recyclées. La kinésine est alors inactivée et revient vers la base soit sous forme de cargo, soit par diffusion.
- 6) Au moins certaines protéines IFT sont recyclées et utilisées pour un nouveau cycle du transport

1.5.1 Le transport intraflagellaire

En 1967, l'observation des coupes longitudinales et transversales des flagelles de *Chlamydomonas* révèle un nombre variable de granules opaques aux électrons d'une taille d'environ 180 Å et sont localisées entre la membrane flagellaire et l'axonème. En coupes transversales, les granules denses aux électrons sont reliés entre eux ((Gibbons and Grimstone, 1960) ; (Ringo, 1967)). Ce n'est qu'en 1993, que Kozminski et ses collègues observèrent, par contraste interférentiel différentiel (DIC), un mouvement bi-directionnel de « radeaux » le long des flagelles paralysés de *Chlamydomonas*. Ils proposèrent l'hypothèse que ces radeaux pourraient correspondre aux particules denses observées par microscopie électronique entre les microtubules et la membrane flagellaire. Certaines particules se déplacent de la base du flagelle vers son extrémité distale à une vitesse de 2 µm/sec (transport antérograde) et d'autres voyagent de l'extrémité distale du flagelle vers la base à une vitesse de 3,5µm/sec (transport rétrograde) (Kozminski, Johnson et al. 1993).

Le transport intraflagellaire (IFT) est défini comme le mouvement bidirectionnel de complexes protéiques appelés particules IFT ou trains, se déplaçant le long de l'axonème entre les microtubules et la membrane ((Kozminski, Johnson et al. 1993) ; (Pedersen and Rosenbaum 2008)). C'est un processus qui comporte plusieurs étapes impliquant le chargement des trains dans le flagelle qui sont ensuite pris en charge par des moteurs de type kinésines pour être transportés activement vers l'extrémité distale de l'organite : on parle de transport antérograde. Les trains regagnent la base du flagelle par l'intermédiaire de moteurs de type dynéines, définissant le transport rétrograde (Figure 20). Nommé transport intraflagellaire, ce mécanisme est utilisé par la majorité des cellules eucaryotes pour construire les cils et flagelles.

1.5.2 Les particules IFT

Les trains IFT ont été purifiés à partir de flagelles isolés de *Chlamydomonas* (Piperno and Mead, 1997). La première purification a révélé l'existence d'un complexe « 17S » présent dans la matrice flagellaire de *Chlamydomonas* avec au moins 13 polypeptides différents. L'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle a révélé un complexe de 15 unités pouvant se dissocier en deux sous-ensembles plus petits (Cole, Diener et al. 1998) qui sont appelés IFT-A et IFT-B. A l'heure actuelle, 20 protéines ont été isolées et caractérisées à partir des complexes IFT. L'IFT-B est composé d'au moins 14 sous-unités et l'IFT-A est constitué de 6 sous-unités (Figure 21) (Taschner, Bhogaraju et al. 2012).

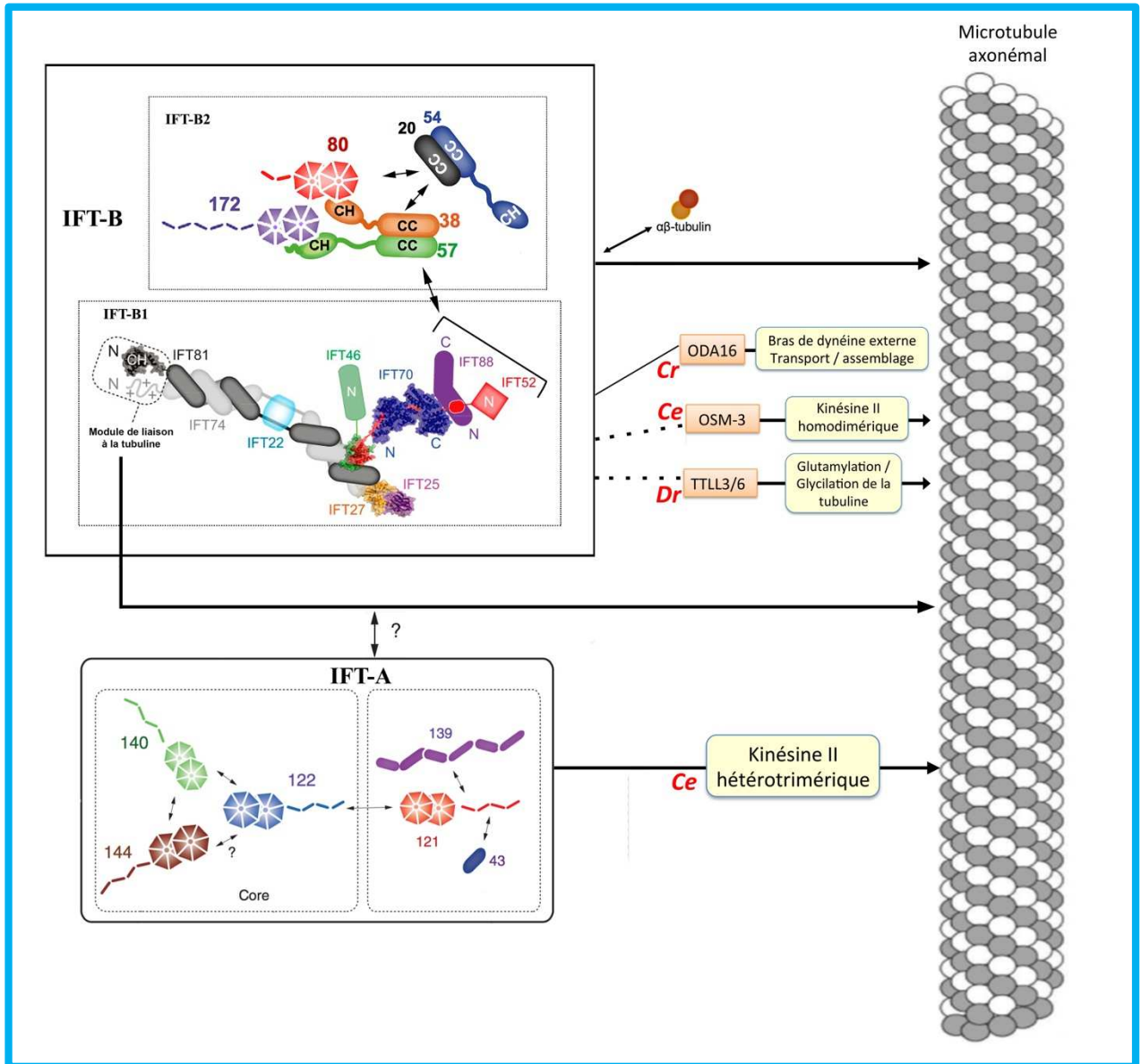


Figure 21 : Représentation schématique des complexes IFT-A et IFT-B chez *C. reinhardtii*

Représentation schématique simplifiée des protéines IFT avec les interactions directes représentées avec des lignes solides et les interactions indirectes avec des lignes en pointillées.

Figure de (Taschner, Weber et al. 2016).

En général, l'absence de n'importe laquelle des protéines du complexe IFT-B inhibe la construction des flagelles ((Absalon, Blisnick et al. 2008) ; (Pazour, Dickert et al. 2000)) tandis que la perturbation du complexe IFT-A entraîne la construction de flagelles trop courts avec une importante accumulation des protéines IFT-B (Absalon, Blisnick et al. 2008); (Piperno and Mead, 1997). Ces observations ont conduit à l'idée que l'IFT-B est nécessaire pour dans le transport antérograde et que l'IFT-A est requis pour le transport rétrograde.

Le complexe IFT-B

Chez *Chlamydomonas*, le complexe IFT-B peut être séparé biochimiquement en deux parties : un noyau central ou « core » dans lequel neuf protéines sont présentes et des sous-unités dites « périphériques » (Lucker, Behal et al. 2005). Toutefois, ces sous-unités forment un second sous-complexe appelé IFT-B2 (Taschner, Weber et al. 2016). La plupart des sous-unités de complexe B ont été purifiées à partir d'extraits de *T. brucei* en utilisant une stratégie de marquage par affinité de la protéine IFTC3/DYF13/IFT56 (Franklin and Ullu, 2010).

Des études ultérieures ont également identifié un complexe similaire chez la souris (Follit, Xu et al. 2009). Initialement, le noyau IFT-B contenait six sous-unités IFT88/81/74/52/46/27 (Lucker, Behal et al. 2005) auxquelles se sont ajoutées trois protéines

Le noyau IFT-B

La protéine la plus connue de l'IFT-B est la protéine IFT88 (d'une taille de 90 kDa chez *T. brucei*) (Figure 21) qui est essentielle pour la formation des cils et flagelles chez découvertes plus tard : IFT70, IFT22 et IFT25 ((Wang, Fan et al. 2009) ; (Fan, Behal et al. 2010) ; (Lucker, Miller et al. 2010)), *Chlamydomonas* (Pazour, Dickert et al. 2000), *T. brucei* (Kohl, Robinson et al. 2003), *C. elegans* ((Han, Kwok et al. 2003) ; (Haycraft, Swoboda et al. 2001)) et les vertébrés (Pazour, Baker et al. 2002). L'orthologue de l'IFT88 chez les mammifères (Tg737) est mutée chez la souris Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk), un modèle pour étudier la polykystose rénale autosomique récessive (Moyer, Lee-Tischler et al. 1994). Le lien entre l'IFT et la polykystose rénale a provoqué une augmentation significative des recherches sur le transport intraflagellaire. IFT88 est impliquée dans l'assemblage des cils des cellules rénales (Pazour, Dickert et al. 2000), dans la détermination de l'asymétrie gauche-droite (Murcia,

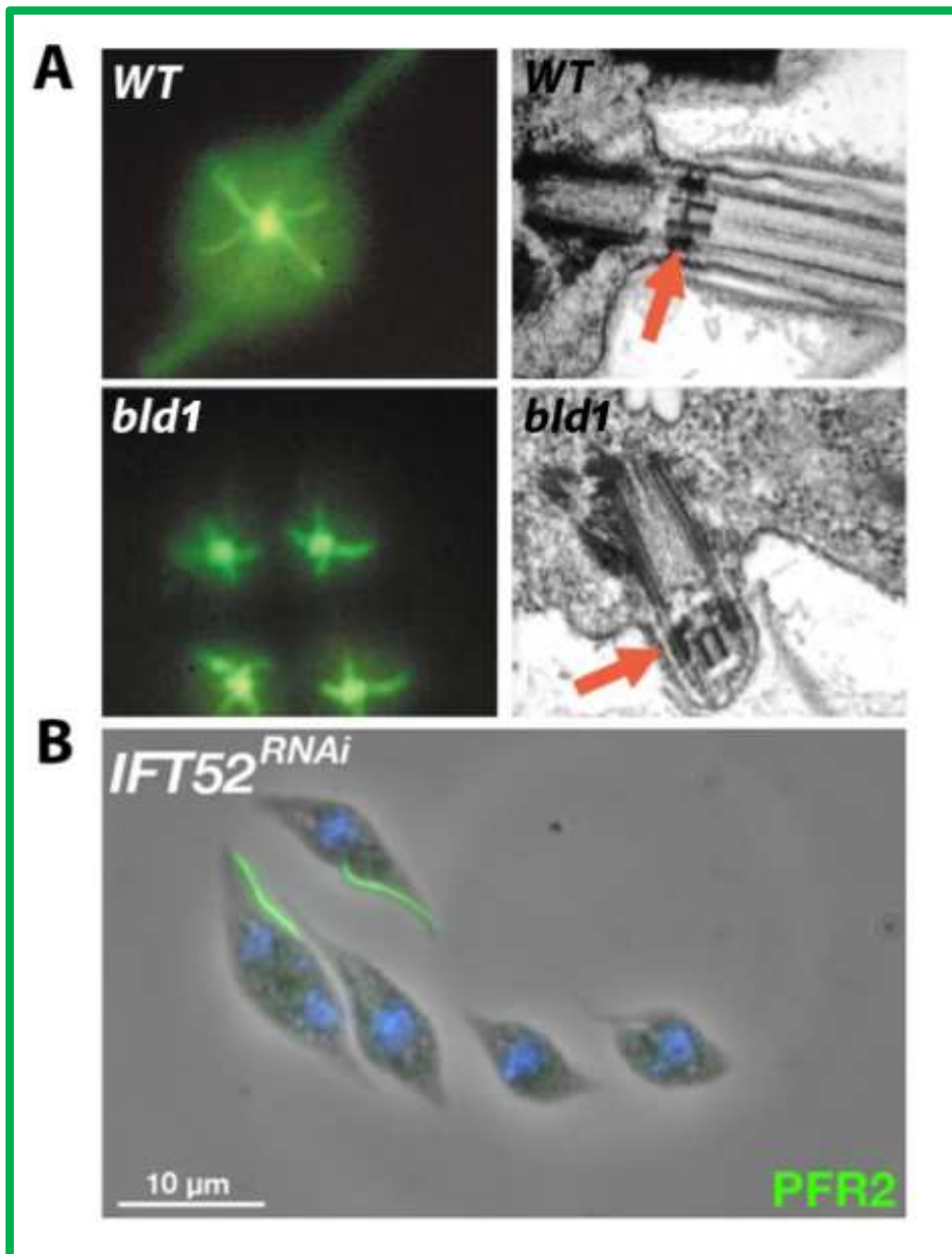


Figure 22 : L'absence d'IFT52 bloque la formation du flagelle

- A) Cellules de type sauvage (WT) et de mutants *bld* de *Chlamydomonas* analysées par immunofluorescence, au moyen d'un anticorps dirigé contre l' α -tubuline acétylée, et par microscopie électronique à transmission. Les cellules de type sauvage possèdent un flagelle normal ainsi que la zone de transition (montrée par une flèche rouge), alors qu'aucun flagelle assemblé n'est visible chez le mutant *bld1* malgré la présence de la zone de transition.
- B) Immunofluorescence marquant la PFR2 dans la lignée cellulaire *IFT52*^{RNAi} de *T. brucei* après l'extinction de la protéine IFT52. Quelques cellules présentent un flagelle très court mais la plupart des cellules ne possède pas de flagelle.

Figure adaptée de (Absalon, Blisnick et al. 2008).

Richards et al. 2000) mais aussi dans le fonctionnement de la synapse immunologique (Finetti, Paccani et al. 2009).

Une autre protéine tout aussi essentielle est la protéine IFT52 (Figure 21). Ce gène est muté dans la souche BLD de *Chlamydomonas* (Brazelton, Amundsen et al. 2001), une mutation associée à une absence de flagelle (Figure 22A). Cette protéine voyage par IFT chez *T. brucei* et est essentielle à la formation du flagelle (Figure 22B) (Absalon, Blisnick et al. 2008). Récemment, Tachner et ses collègues ont démontré que cette protéine interagit directement avec les autres membres du noyau IFT-B (IFT46, IFT70 et IFT88) ainsi qu'avec le tétramère formé par IFT81/74/27/25, suggérant que IFT52 constitue l'ossature du noyau de l'IFT-B (Taschner, Bhogaraju et al. 2011).

IFT74 et IFT81 affichent une organisation structurale similaire à la protéine IFT70/DYF1 et semblent être des homologues lointains car elles partagent une identité de séquence d'environ 15 à 20 %. L'assemblage *in vitro* a permis de vérifier l'existence d'un complexe stable contenant IFT81/74/27/25 (Taschner, Bhogaraju et al. 2011). IFT74 et IFT81 interagissent étroitement. Ces deux protéines possèdent un domaine d'homologie à la calponine qui est capable de lier la tubuline *in vitro* et pourrait donc assurer le transport intraflagellaire de la tubuline à la pointe distale du flagelle (Bhogaraju, Cajanek et al. 2013).

IFT70 et IFT56 font également partie du noyau IFT-B. IFT70 a été identifiée pour la première fois chez *C. elegans* sous le nom de DYF-1 et relie le moteur homodimérique OSM-3 au complexe IFT-B (Figure 21) (Ou, Blacque et al. 2005) tandis que IFT56 est nécessaire pour la stabilité du noyau IFT-B ((Fan, Behal et al. 2010) ; (Lucker, Miller et al. 2010) ; (Taschner, Bhogaraju et al. 2011)).

IFT22/RABL5, une petite protéine G atypique a été identifiée pour la première fois chez *C. elegans* (Schafer, Winkelbauer et al. 2006) puis chez *T. brucei* (Adhiambo, Blisnick et al. 2009). Contrairement aux autres membres du complexe IFT-B étudié jusqu'ici, IFT22 n'est pas nécessaire pour l'assemblage des cils chez *C. elegans* (Schafer, Winkelbauer et al. 2006). Chez *T. brucei*, l'extinction d'IFT22 conduit à la formation de flagelles très courts remplis de matériel IFT (Adhiambo, Blisnick et al. 2009). Une autre petite protéine G appelée IFT27 a été caractérisée chez *Chlamydomonas* et sa déplétion provoque la formation de courts flagelles et un défaut de cytokinèse (Huet, Richet et al. 1992, Qin, Wang et al. 2007). IFT27 forme un complexe stable avec IFT25 (Wang, Fan et al. 2009). Chez *T. brucei*, IFT27 est essentielle pour l'IFT rétrograde car elle contrôle l'entrée de la dynéine impliquée dans l'IFT (Huet, Blisnick et al. 2014).

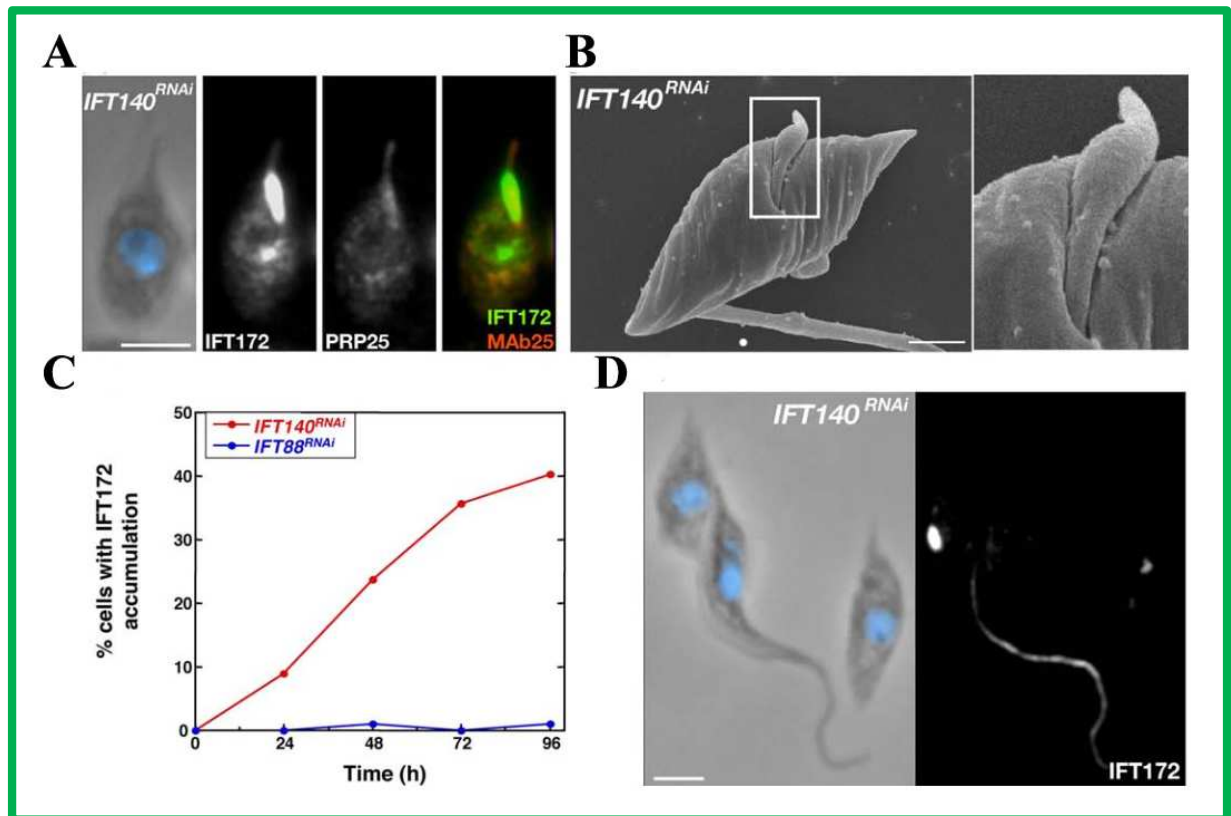


Figure 23 : Accumulation des protéines IFT dans le flagelle

- A) Cellule *IFT140*^{RNAi} induite pendant 3 jours présentent un petit flagelle. La cellule est marquée avec un anti-sérum anti-IFT172 (vert) et mAb25 (rouge) marque l'axonème. L'ADN est coloré avec du DAPI (bleu).
- B) Image d'une cellule *IFT140*^{RNAi} induite pendant 3 jours et observée au microscope à balayage. Le flagelle est court et dilaté. Barre d'échelle 1 μ m.
- C) Quantification du nombre de cellules présentant une accumulation de la protéine IFT172 au cours de l'ARNi dans les lignées cellulaires indiquées.
- D) Après 3 jours d'induction, un champ de cellules *IFT140*^{RNAi} est représenté. Seul le nouveau flagelle est trop court et présente une dilatation dû à l'accumulation des protéines IFT172. Les cellules ont été marquées avec l'antisérum anti-IFT172 (vert) et avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle 5 μ m.

Figure de (Absalon, Blisnick et al. 2008).

Les protéines périphériques du complexe IFT-B

Les protéines périphériques du complexe IFT-B comprennent IFT80, IFT172, IFT54, IFT57 et IFT20. Ces protéines peuvent être dissociées du noyau de l'IFT-B à des concentrations élevées de NaCl, suggérant une localisation périphérique ((Luckner, Behal et al. 2005) ; (Taschner, Weber et al. 2016)) tout en formant un complexe stable (Taschner, Bhogaraju et al. 2011). Les quatre premières protéines ont des rôles importants dans la régulation de l'IFT alors que l'IFT20 est essentielle pour le ciblage vésiculaire chez les mammifères. L'extinction par ARNi d'IFT172 chez *T. brucei* inhibe la formation du flagelle (Absalon, Blisnick et al. 2008) tandis que chez *Chlamydomonas*, IFT172/FLA11 est nécessaire pour la localisation de la protéine EB1 à l'extrémité distale du flagelle (Pedersen, Geimer et al. 2003). En interagissant ensemble, IFT172 et EB1 pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'IFT à la pointe ciliaire (Pedersen, Miller et al. 2005). IFT20 est localisé au niveau de l'appareil de Golgi (Follit, San Agustin et al. 2008). Ces études ont montré que IFT20 semble être impliquée dans le transport et le tri des protéines destinées à la membrane flagellaire chez les mammifères. Chez *T. brucei*, IFT20 est indispensable pour l'assemblage du flagelle mais n'est pas détectée au niveau du Golgi ((Absalon, Kohl et al. 2007) ; (Absalon, Blisnick et al. 2008)).

Le complexe IFT-A

Ce complexe est constitué de six protéines ayant toutes un poids moléculaire supérieur à 120 kDa à l'exception de la protéine IFT43. En raison de leur grande taille et de la difficulté d'exprimer des protéines recombinantes, ces protéines ont été moins étudiées que celles du complexe B. Une étude par co-immunoprécipitation a révélé l'existence d'un noyau IFT-A comprenant IFT144, IFT140 et IFT122 (Mukhopadhyay, Wen et al. 2010).

La protéine du complexe IFT-A la plus étudiée jusqu'à aujourd'hui est la protéine IFT140. Des études réalisées au laboratoire ont montré chez *T. brucei* que l'extinction par ARNi de la protéine IFT140 conduit à la formation de cours flagelles boursoufflés (Figure 23A, B et D) qui possèdent une accumulation de protéines IFT172 (Figure 23C), indicateur d'un défaut au niveau du transport rétrograde. Chez la drosophile, le phénotype du mutant *rampA* (qui encode la protéine IFT140) se traduit par des défauts mécano-sensoriels et conduit également à l'accumulation des protéines IFT-B dans le cil (Lee, Sivan-Loukianova et al. 2008).

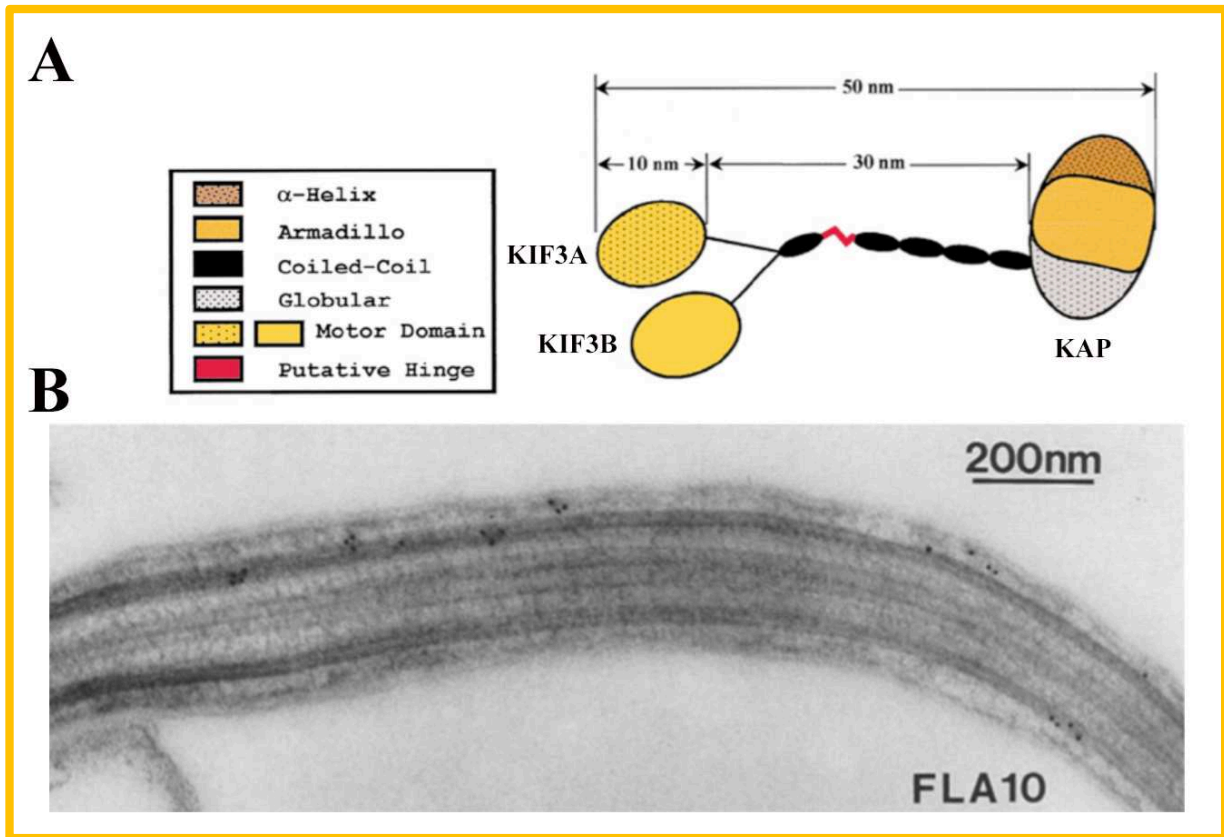


Figure 24 : Structure et localisation du moteur kinésine II responsable du mouvement antérograde

A) Organisation structurale de la kinésine II hétérotrimérique. L'extrémité amino-terminale de KIF3A et KIF3B forme un domaine globulaire qui contient à la fois le site d'hydrolyse de l'ATP et le site de liaison aux microtubules. La tige est formée de sous-unités α -hélicoïdales, enroulées sous forme de spirale. KAP est globulaire avec 10 répétitions Armadillo et s'associe avec l'extrémité carboxy-terminale des deux autres sous-unités. Figure de (Pazour, Dickert et al. 1999).

B) Immunomarquage et localisation de la kinésine FLA10 chez *Chlamydomonas*. La présence de particules d'or de 12 nm de diamètre est détectée entre la membrane flagellaire et les doublets externes de microtubules.

Figure de (Kozminski, Beech et al. 1995).

1.5.3 Les moteurs IFT

Le transport intraflagellaire est un processus dynamique et rapide avec des particules/trains se déplaçant à une vitesse de 2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour le transport antérograde et 4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour le transport rétrograde chez *Chlamydomonas*. Chez *T. brucei*, les complexes se déplacent à une vitesse moyenne de 2,4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour le transport antérograde et de 5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour le transport rétrograde.

La première famille de moteur à avoir été identifiée est la kinésine II à partir d'embryons d'oursins de mer (Cole, Chinn et al. 1993) et par la suite chez d'autres espèces (cellules d'insectes (Kondo, Sato-Yoshitake et al. 1994), testicule de souris (Yamazaki 1996) et chez *Chlamydomonas* ((Kozminski, Beech et al. 1995) ; (Cole, Diener et al. 1998)). La kinésine II fonctionne sous forme d'un complexe hétérotrimérique qui contient deux protéines motrices appelées KIF3A et KIF3B et une sous-unité associée à la kinésine (KAP) qui lierait le cargo (Figure 24A) ((Kozminski, Beech et al. 1995) ; (Wedaman, Meyer et al. 1996) ; (Piperno and Mead 1997)). Des immunomarquages à l'or colloïdal contre la kinésine FLA10 ont montré la présence de ce moteur entre la membrane flagellaire et les doublets externes de microtubules (Figure 24B) (Kozminski, Beech et al. 1995).

L'inactivation de cette sous-unité motrice dans le mutant *fla10* conduit à une réduction de la fréquence des trains et à l'échec de l'assemblage du flagelle (Cole, Diener et al. 1998), confirmant que l'IFT est requis pour la formation du flagelle. Chez *C. elegans*, le cil sensoriel est composé de deux parties distinctes appelées segment intermédiaire et segment distal. Le segment intermédiaire est constitué de neuf doublets de microtubules tandis que le segment distal est constitué de singulets de microtubules. Chez les nématodes, un second moteur appelé OSM-3 coopère avec la kinésine 2 afin de construire les deux parties distinctes de l'organite. OSM-3 est constitué de deux sous-unités identiques de la kinésine (homodimère) et donc ne contient pas de KAP. Ces deux moteurs voyagent ensemble sur le segment intermédiaire. Lorsque les moteurs arrivent à la fin du segment intermédiaire, la kinésine 2 se dissocie alors que le moteur OSM-3 continue à se déplacer en direction du segment distal du cil (Snow, Ou et al. 2004). En absence de la kinésine 2, *osm-3* assure seul la construction du cil et le transport de l'IFT.

Le second moteur impliqué est la dynéine 1b cytoplasmique qui a également été identifiée à partir d'embryons d'oursin (Gibbons, Asai et al. 1994). Il s'agit d'un complexe

composé de deux chaînes lourdes (DHC2) et d'au moins trois chaînes de taille intermédiaire ou légère. Chaque composant de ce moteur est essentiel pour le transport intraflagellaire. Chez *Chlamydomonas* ou *C. elegans*, des mutations dans les gènes codant pour la chaîne lourde de la dynéine (DHC-1b ou CHE-3), des chaînes intermédiaires légères (D1bLIC/XBX1/FAP133) ou légères (LC8) perturbent la construction des cils et flagelles avec une accumulation de matériel IFT ((Pazour, Wilkerson et al. 1998) ; (Porter, Bower et al. 1999) ; (Signor, Wedaman et al. 1999) ; (Perrone, Tritschler et al. 2003) ; (Schafer, Haycraft et al. 2003)) typique d'un défaut rétrograde. Les particules IFT sont transportées dans le flagelle par la kinésine 2 mais ne peuvent pas retourner à la base en l'absence de moteur rétrograde. Chez *Leishmania mexicana*, deux gènes distincts (LmxDHC2.1 and LmxDHC2.2) codent pour la dynéine 2 cytoplasmique. La délétion de LmxDHC2.2 a donné lieu à des parasites immobiles et ayant un corps arrondi. L'analyse ultra-structurale a révélé la présence de petits flagelles n'émergeant pas de la poche flagellaire et l'immunofluorescence confirme une absence des protéines paraflagellaires PFR1 et PFR2. Ces résultats montrent que LmxDHC2.2 est essentielle pour l'assemblage du flagelle et pour le maintien de la forme promastigote (Adhiambo, Forney et al. 2005). L'existence de deux gènes distincts des dynéines 2 cytoplasmiques (DHC2.1 et DHC2.2) est une caractéristique conservée chez les kynétoplastidés. L'extinction par ARNi chez *T. brucei* conduit à un phénotype similaire avec des petits flagelles dilatés contenant une accumulation d'une quantité importante de matériel dense aux électrons correspondant aux trains IFT. Dans le mutant *IFT140^{RNAi}*, la dynéine se trouve à une concentration élevée à la base du flagelle mais ne parvient pas à pénétrer dans le compartiment flagellaire. Les moteurs dynéines sont probablement assemblés dans le cytoplasme, atteignent la base du cil et s'associent avec le complexe IFT-A avant leur entrée dans le flagelle (Blisnick, Buisson et al. 2014). Ceci suggère qu'un des rôles du complexe A est de faciliter l'entrée des moteurs dynéines dans le flagelle.

1.5.4 Régulation de l'IFT

Bien que le principe général de l'IFT est maintenant reconnu et que la majorité de ses composants moléculaires a été identifiée, il reste encore à comprendre comment cet ensemble est coordonné. Plusieurs questions restent toujours en suspens : comment les complexes A/B sont-ils assemblés ? Il y a-t-il un activateur de la polymérisation ? A quel niveau ? Existe-t-il une barrière de sélection des complexes IFT avant leur entrée dans le flagelle ? Par quels mécanismes complexes les IFT s'assemblent pour former un train et comment ils interagissent avec leur chargement ? Que se passe-t-il à l'extrémité distale du flagelle, quel est le mécanisme

de conversion du transport antérograde en transport rétrograde ? Que se passe-t-il une fois que les trains IFT ont effectué un cycle complet ? Sont-ils recyclés ? détruits ? La base, la zone de transition et la pointe distale du flagelle semblent être des points de contrôle importants de l'IFT. Dans les paragraphes qui suivront, nous résumerons les différentes étapes nécessaires de la construction du flagelle ainsi que l'implication de l'IFT.

L'assemblage du flagelle

Chez de nombreuses espèces, la plupart des moteurs et des protéines IFT sont concentrées à la base du flagelle. Chez *Chlamydomonas*, la microscopie électronique a révélé la présence d'un pool d'IFT52 amarré à l'extrémité des fibres de transition (Deane, Cole et al. 2001) suggérant que ces structures joueraient un point de contrôle ou un frein pour réguler leur entrée dans le cil. Toujours chez l'algue verte, un double Immunomarquage avec des anticorps dirigés contre les protéines du complexe IFT-A et IFT-B a révélé que ces protéines sont présentes dans des compartiments distincts au niveau du corps basal : les protéines du complexe IFT-A se trouvent dans la partie apicale du corps basal tandis que les IFT-B sont positionnées dans la partie basale (Hou, Qin et al. 2007). Ces expériences suggèrent que les complexes IFT-A et IFT-B arrivent soit séparément les uns des autres à partir du cytoplasme où sont triés dans des compartiments distincts. Cette zone de chevauchement pourrait correspondre aux fibres de transition, où les particules IFT pourraient être assemblées ou désassemblées avant l'entrée ou la sortie du flagelle ((Rosenbaum and Witman 2002) ; (Reiter, Blacque et al. 2012)). Cette dernière hypothèse a récemment été étayée chez *T. brucei*, où des expériences de photoblanchiment ont démontré que les protéines IFT des trains rétrogrades, se mélangent avec celles présentes à la base de l'organite, forment de nouveaux trains et intègrent le flagelle (Buisson, Chenouard et al. 2013).

Entrée et transport antérograde

Après l'assemblage des particules IFT, celles-ci se déplacent de façon linéaire le long de l'axonème par transport antérograde. Chez *Chlamydomonas*, le moteur kinésine 2 déplace les particules IFT de la base du flagelle jusqu'à son extrémité distale à une vitesse avoisinant les $2,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Lors de leur déplacement, la kinésine 2 et la dynéine 1b sont respectivement associées avec le complexe A et B. Chez les nématodes, la kinésine 2 et OSM-3 déplacent ensemble les particules IFT le long du segment intermédiaire à une vitesse moyenne de 0,7

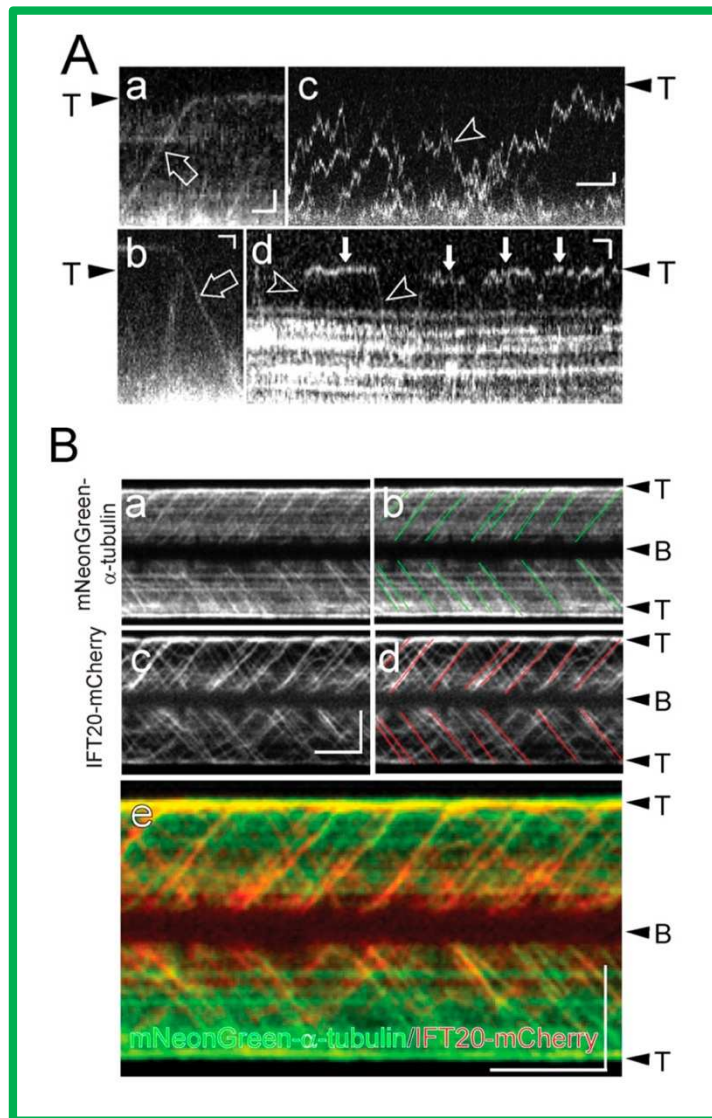


Figure 25 : Déplacement de la tubuline dans le flagelle par IFT ou diffusion

- A) Kymographes représentant le déplacement de la mNeonGreen- α -tubuline dans le cil via IFT (flèches dans la figure Aa et Ab) et par diffusion (tête de flèche en figure Ac et Ad). Les trajectoires du transport antérograde se lisent du bas à gauche (représentant la base ciliaire) vers le haut à droite (pointe ciliaire = T) de la figure et le transport rétrograde se lit du haut à gauche au bas à droite de la figure. La vitesse du transport antérograde est de $1,68 \mu\text{m}/\text{sec}$ avec une fréquence de $0,3$ particules/min et la vitesse de transport rétrograde est de $3 \mu\text{m}/\text{sec}$. La figure Ac montre la diffusion de l' α -tubuline à l'intérieur du cil et la figure Ad montre une réduction de la mobilité de la mNeonGreen- α -tubuline au niveau de la pointe flagellaire (flèches blanches). Echelle : $1 \mu\text{m}$ et 1 sec .
- B) Kymographes de l'imagerie simultanée de trajectoires de la mNeonGreen- α -tubuline (a et b) et l'IFT20-mCherry (c et d) dans les flagelles de *Chlamydomonas* en croissance. Les trajectoires des IFT sont marquées en b et d. La figure e représente la fusion des kymographes a et c.

Figure de (Craft, Harris et al. 2015).

$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. A la fin du segment intermédiaire, les trains sont pris en charge par OSM-3 sur le segment distal à une vitesse moyenne d'environ $1\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Snow, Ou et al. 2004). Chez *T. brucei*, une quantification minutieuse a été réalisée et a révélé différentes vitesses de trains antérogrades : pour 2/3 d'entre eux, les particules IFT voyagent à une vitesse de $2,4\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ tandis que la seconde population voyage à une vitesse plus lente de $1,53\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Buisson, Chenouard et al. 2013). A ce jour, des questions restent en suspens concernant le retour du moteur antérograde, diffuse-t'il le long de l'axonème ? Est-il pris en charge par le transport rétrograde ? Chez *Chlamydomonas*, une version fluorescente d'une sous-unité du moteur de la kinésine 2 a été tagguée afin de répondre à ces questions. Ces résultats suggèreraient que le moteur pourrait diffuser le long de l'axonème mais le doute subsiste car la fluorescence était à peine visible pour le transport rétrograde. (Engel, Lechtreck et al. 2009).

Pour construire les cils et les flagelles, les particules IFT doivent transporter des précurseurs axonémaux de la base jusqu'à l'extrémité distale. Malgré le fait qu'il y a plus de 600 protéines à l'intérieur du cil, il existe peu de données montrant le transport des précurseurs axonémaux, peut-être à cause de la difficulté de leur observation en temps réel. Ces précurseurs axonémaux comprennent la tubuline, élément majoritaire de l'axonème. Une étude récente chez *Chlamydomonas* a démontré que la tubuline est principalement transportée par l'IFT mais qu'une faible proportion rentre également par diffusion dans le cil. L'équipe de Karl Lechreck a transformé une souche de *C. reinhardtii* permettant l'expression à niveau intermédiaire de la m-NeonGreen- α -tubuline. Pour imager la protéine fluorescente durant le transport, les flagelles sont photoblanchis pour éliminer le signal résultant de la présence de l' α -tubuline dans l'axonème et l'analyse est effectuée par microscopie TIRF. L'extraction des kymographes a mis en évidence la diffusion de la tubuline dans le flagelle (Figure 25 Ac et Ad) mais a surtout démontré pour la première fois que l' α -tubuline est bien transportée par IFT de la base à l'extrémité distale du cil (Figure 25 Aa et 25Ab). Le transport rétrograde est rarement observé (Figure 26Ab). Pour tester directement si l' α -tubuline se déplace en association avec les trains IFT, la mNeonGreen- α -tubuline a été exprimée dans une souche IFT20-mCherry. L'imagerie simultanée des deux canaux fluorescent indique que l' α -tubuline est un cargo de l'IFT (Figure 26B).

La même approche a révélé que d'autres composants axonémaux voyagent avec les trains IFT tel que les protéines DRC2 et DRC4 ainsi que la protéine de la paire centrale PF16 (Wren,

Craft et al. 2013). Les bras de dynéines externes (ODA) pourraient être des cargos transportés via une interaction avec l'IFT46 ((Hou, Qin et al. 2007) ; (Ahmed, Gao et al. 2008)). Plusieurs sous unités de BBSomes sont aussi prises en charge et transportées par IFT (Lechtreck, Johnson et al. 2009).

Réarrangement des particules IFT à l'extrémité distale du flagelle

C'est au niveau de la pointe du flagelle que la croissance axonémale et le réarrangement des trains IFT se produit. Malheureusement l'étude de l'extrémité distale est complexe puisque la transition est rapide (3-4 secondes) (Buisson, Chenouard et al. 2013) et le compartiment n'a pas pu être purifié. Chez *Chlamydomonas*, des études en microscopie électronique faites chez plusieurs mutants suggèrent que la longueur des trains antérogrades serait deux fois supérieures à celle des trains rétrogrades (Dentler, 2005). Une analyse des trains IFT *in situ* en cryo électron tomographie a été réalisée et deux populations ont été distinguées. La première population de trains IFT présente une taille de 250 nm tandis que la seconde population à une taille moyenne de 700 nm (Pigino, Geimer et al. 2009). L'analyse de la fréquence des trains IFT chez *T. brucei* a montré un rapport de 1:3 des trains antérogrades par rapport aux trains rétrogrades (Buisson, Chenouard et al. 2013).

Ces observations sont en accord avec les analyses tomographiques chez *Chlamydomonas* et suggèrent qu'un train antérograde est divisé en trois trains rétrogrades à la pointe du flagelle.

Les moteurs antérogrades doivent être inactivés au niveau de la pointe ciliaire du flagelle. Chez *Chlamydomonas*, la protéine EB1 est capable de lier indirectement IFT172 lorsque les complexes IFT-A et IFT-B sont dissociés (Pedersen, Geimer et al. 2003). Ceci suggère que la protéine CrEB1 est impliquée dans le remodelage des complexes IFT à l'extrémité distale du flagelle. Cette réorganisation semble essentielle pour activer la dynéine 1b nécessaire au transport rétrograde. En l'absence du complexe IFT-A et de la dynéine 1b, le transport rétrograde ne peut s'effectuer. Dans le cas de l'IFT-A, ceci pourrait être expliqué par la nécessité de faire entrer la dynéine dans le flagelle (Huet, Blisnick et al. 2014). Des expériences d'immuno-précipitation indiquent que l'IFT-B s'ancre à la (Figure 20). Malheureusement, même si ces processus doivent être contrôlé, on ne connaît pas les mécanismes permettant cette régulation et donc ce remodelage.

Transport rétrograde et recyclage

Une étude par immunofluorescence du mutant *dIblic* chez *Chlamydomonas* a montré que les deux sous-unités de la kinésine se s'accumulaient pas dans les flagelles dilatés avec le reste des IFT (Hou, Pazour et al. 2004). Le même type d'observation a été réalisée chez *T. brucei* avec le mutant dynéine (Blisnick, Buisson et al. 2014). Par conséquent, le complexe kinésine 2 semble être en mesure de quitter le flagelle sans s'associer au moteur dynéine. Cependant, nous ne savons pas comment les composants IFT sont recyclés lorsqu'ils arrivent à la base du flagelle. Passent-ils au niveau de la zone de transition ? Restent-ils à l'intérieur du compartiment flagellaire en attendant d'être de nouveau injectés dans le cil ? A l'heure actuelle, nous ne parvenons pas à déterminer comment les protéines IFT parviennent à entrer et à sortir du cil.

**PROBLEMATIQUE
ET BUT DE LA THESE**

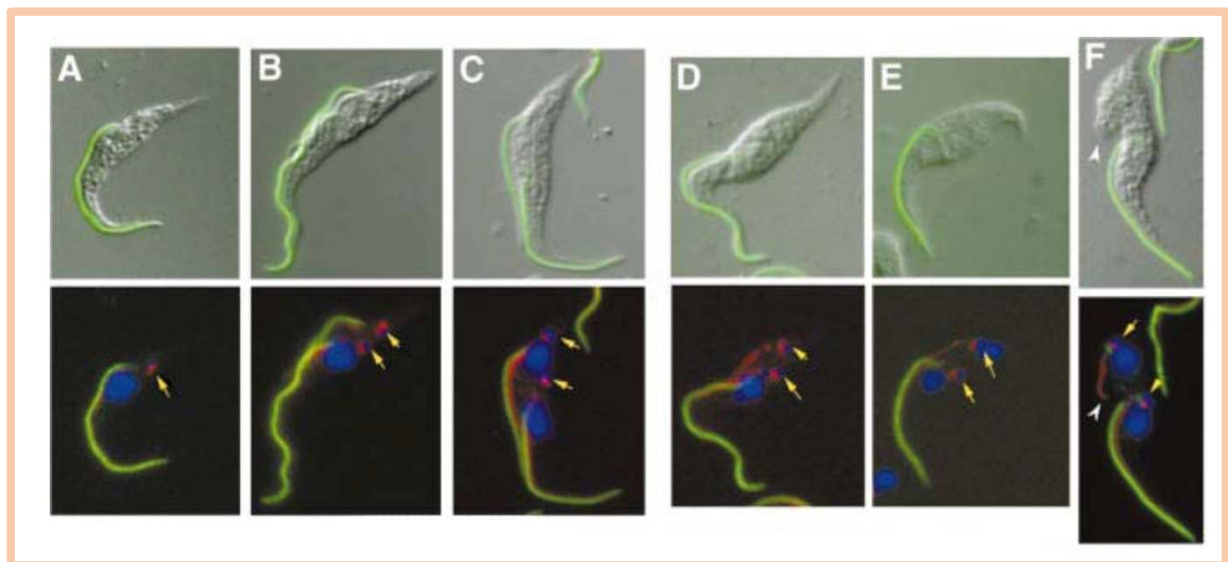


Figure 26 : L'inhibition de l'expression de DHC1b bloque la construction du nouveau flagelle mais l'ancien flagelle reste présent

(A-F) Les mutants *DHC1b^{RNAi}* sont visualisés par microscopie à contraste interférentiel. Les cellules *DHC1b^{RNAi}* non induites (A-C) et induites à 48h (D-F) sont représentées en fonction du stade d'avancement dans leur cycle cellulaire. Le flagelle a été marqué avec L8C4 en vert, le filament du FAZ avec L6B3 (ligne rouge), le corps basal avec BBA4 (spot rouge) et l'ADN a été coloré avec du DAPI (bleu). Le panneau du haut montre les images en contraste interférentiel fusionnées avec les images marquant le flagelle (vert) et le panneau du bas montre la fusion des 3 images couleurs. Les flèches jaunes indiquent la position des corps basaux. Après 48h d'induction, les trypanosomes ne peuvent plus assembler de nouveaux flagelles mais les anciens restent présents.

Figure issue de (Kohl, Robinson et al. 2003).

2 Problématique

2.1 Rôle de l'IFT dans les flagelles en maintenance

De nombreuses études ont démontré que l'IFT est requis pour la formation des cils et flagelles chez la majorité des eucaryotes comme *Chlamydomonas* (Kozminski 1995), *Tetrahymena* (Brown, Marsala et al. 1999), les nématodes (Signor, Wedaman et al. 1999), les insectes (Sarpal, Todi et al. 2003), les poissons (Sun, Amsterdam et al. 2004) ou encore les trypanosomes (Kohl, Robinson et al. 2003). Par ailleurs, des expériences en vidéo-microscopie ont révélé que le transport intraflagellaire reste actif après l'assemblage du flagelle ((Kozminski, Johnson et al. 1993) ; (Orozco, Wedaman et al. 1999) ; (Buisson, Chenouard et al. 2013)) suggérant une ou des fonctions supplémentaires pour l'IFT. L'utilisation du mutant *fla10* chez *Chlamydomonas* a permis de déterminer un rôle de l'IFT dans la maintenance de la longueur du flagelle. Le mutant *fla10*, qui porte une mutation ponctuelle dans le gène codant pour une des chaînes motrices du moteur hétérotrimérique de la kinésine II est sensible à la température. Il assemble et maintient son flagelle à une température permissive de 20°C. Au contraire, à une température restrictive de 32°C, la kinésine est dénaturée et les particules IFT deviennent absentes. Après 80 minutes à 32°C, les flagelles raccourcissent pour atteindre une longueur de 5 µm. A ce stade, une faible proportion de petits trains IFT est visible en microscopie à contraste interférentiel. La majorité des protéines FLA10 est localisée au niveau de la base du flagelle chez le mutant. Ces résultats indiquent que FLA10 est indispensable pour la maintenance du flagelle (Kozminski, Beech et al. 1995). Jusqu'à ce jour, aucune étude précise chez une autre espèce flagellée a été publiée pour confirmer ou non ce dogme établi.

Le premier objectif de ma thèse consiste à déterminer le rôle de l'IFT dans le flagelle après construction chez *T. brucei*, un excellent modèle qui permet de visualiser à la fois le flagelle mature et la synthèse du nouvel organite au sein d'une seule cellule (Sherwin and Gull, 1989). L'étude originale décrivant le rôle de l'IFT dans la construction du flagelle s'est basée sur le blocage de l'expression de DHC1b (moteur rétrograde) et IFT88 (protéine du complexe IFT-B) par ARN interférence (ARNi). Elle a montré que l'ancien flagelle semblait conserver sa longueur initiale (Figure 26). L'inhibition des protéines IFT-B (IFT88, IFT172) bloque la construction du nouveau flagelle (Figure 27C et 27D) et l'absence de protéines IFT- A (IFT140,

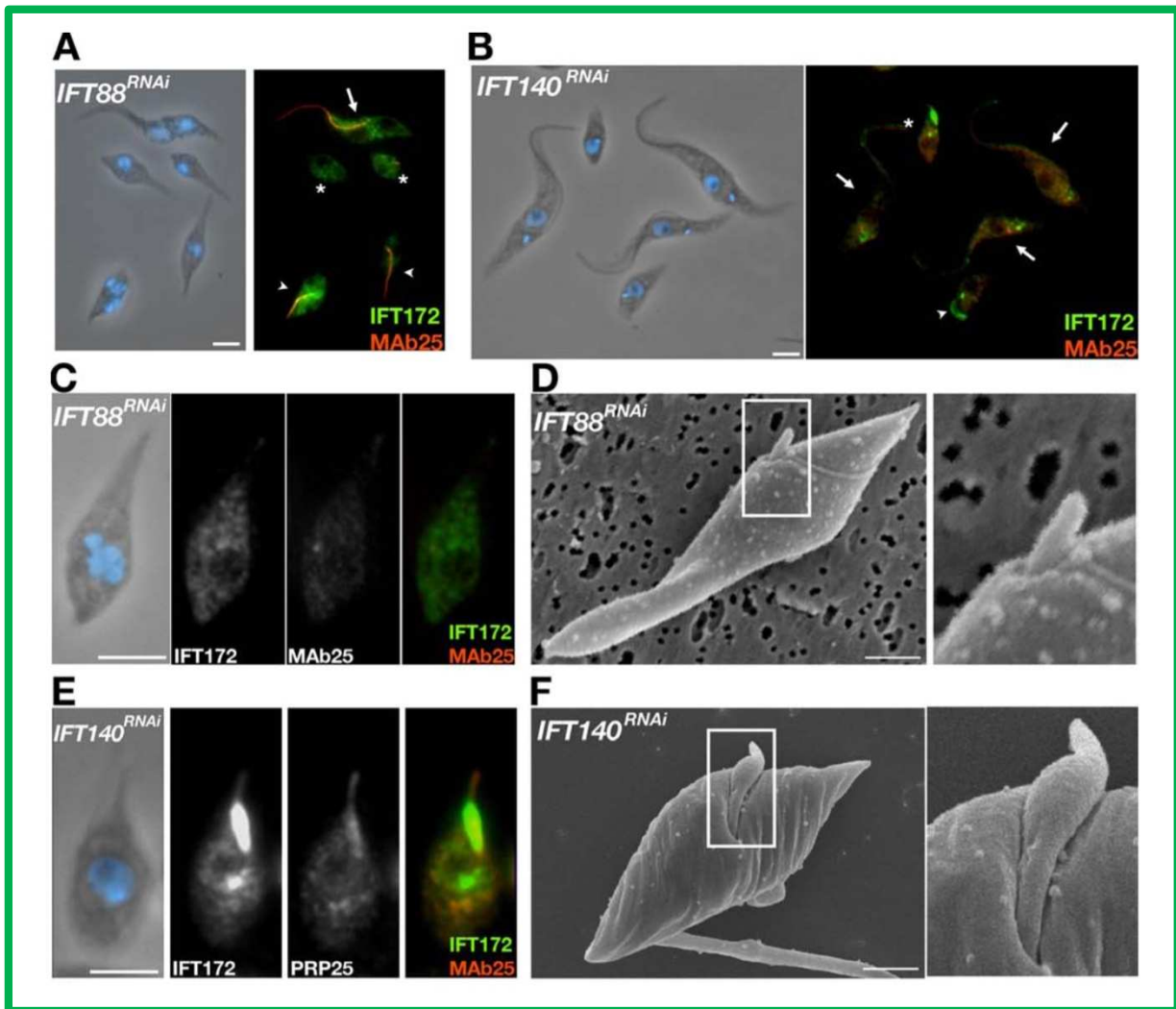


Figure 27 : Les protéines IFT-A et IFT-B sont indispensable à la formation du flagelle mais arborent différentes fonctions

(A-B) Champs de cellules *IFT88^{RNAi}* (A et E) et *IFT140^{RNAi}* (B et C) induites pendant 3 jours et marqué avec l'antisérum anti-IFT172 (vert), l'axonème est marqué avec l'anticorps mAb25 (rouge) et l'ADN a été coloré avec le DAPI (bleu). Les cellules avec la présence du vieux flagelle sont pointées d'une flèche, les têtes de flèches pointent les cellules avec un court flagelle tandis que les astérisques indiquent les cellules sans flagelle. (C-D) Cellules *IFT88^{RNAi}* induites ont peu ou pas de flagelles et les cellules *IFT140^{RNAi}* induites sont courtes et présentent des flagelles dilatés avec une accumulation d'une grande quantité de protéines IFT172 (E-F) Barre d'échelle 5 μ m. Les cellules *IFT88^{RNAi}* (D) et *IFT140^{RNAi}* (F) ont été observées au microscope électronique à balayage. Barre d'échelle 5 μ m.

Figure issue du papier de (Absalon, Blisnick et al. 2008).

IFT122) a conduit à la formation de courts flagelles boursoufflés qui possèdent une accumulation de la protéine IFT172 (Figure 27E), indicateur d'un défaut au niveau du transport rétrograde.

L'explication proposée à l'époque était que les protéines existantes avant l'expression de l'ARNdb ne sont pas touchées et restent probablement fonctionnelles dans ces flagelles et l'IFT en assure la maintenance ((Bastin, Pullen et al. 2000) ; (Kohl, Robinson et al. 2003)). L'accès à de nouveaux outils comme le tagguing endogène permettant l'expression de protéines fluorescentes dans des conditions proches de la normale (Kelly, Reed et al. 2007), de nouveaux anticorps anti-IFT (Blisnick, Buisson et al. 2014) ou des nouvelles techniques d'imagerie en temps réel (Buisson, Chenouard et al. 2013) non disponibles à l'époque, m'ont permis d'étudier le devenir des IFT dans les conditions d'ARNi. Pour cela, j'ai bloqué l'expression des gènes *IFT88* (encodant une protéine du complexe IFT-B) et *IFT140* (encodant une protéine du complexe IFT-A) par ARNi et suivi l'IFT au moyen d'une protéine de fusion entre YFP et IFT81 exprimée *in situ*. Les analyses du phénotype par imagerie en direct, immunofluorescence et par microscopie électronique, devraient me permettre de démontrer la présence ou l'absence d'IFT dans le flagelle mature et son rôle dans le contrôle de la longueur de l'organite. Ensuite, nous étudierons l'importance de l'IFT pour le turnover des protéines flagellaires.

2.2 Entrée des IFT dans le flagelle, recyclage et échange avec le cytoplasme

L'IFT est indispensable à la construction du cil et pour cela, tous ses constituants sont apportés à sa base par un ou plusieurs mécanisme(s) qui sont encore peu connus. A l'heure actuelle, les échanges entre le cil et le compartiment cytoplasmique ne sont pas caractérisés. La construction d'un second flagelle entraîne le recrutement de nombreuses protéines y compris un nouveau « pool » d'IFT. Quelle est l'origine des protéines IFT ancrées au nouveau flagelle ? Sont-elles entièrement produites *de novo* ou sont-elles partagées entre les deux flagelles ? Nous pouvons nous questionner sur les échanges possibles entre les deux organites. Chaque flagelle est-il cloisonné ou au contraire, communiquent-ils entre eux ? Plusieurs expériences préliminaires ont été réalisées et quelques éléments de réponses seront suggérés dans cette deuxième partie.

Le pool des protéines IFT est concentré à la base du flagelle et ne semble pas diffuser librement dans le cytoplasme ni vers la lumière du cil. L'absence d'une séparation membranaire

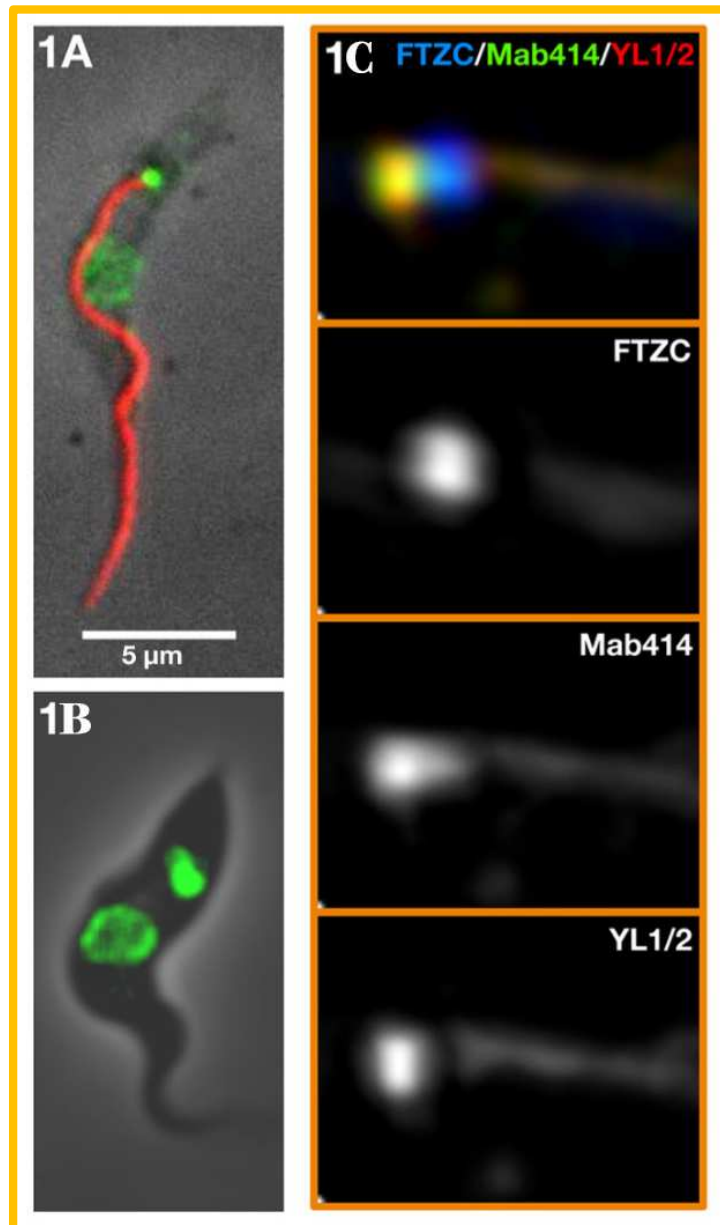


Figure 28 : Localisation des nucléoporines à la base du flagelle

1A) Double immunofluorescence avec mAb414 (détecte les répétitions FXFG, vert) et mAb25 (axonème, rouge).

1B) Une cellule vivante exprimant la fusion GFP::NUP109. Dans les deux cas, les nucléoporines sont trouvées dans la membrane nucléaire et au niveau de la base du flagelle.

1C) Les nucléoporines sont présentes au niveau des fibres de transition, à la base du flagelle. Microscopie SIM. La base du flagelle a été marquée avec un anti-FTZC (marqueur de la zone de transition, bleu), mAb414 (vert) et YL1/2 (marqueur des fibres de transition, rouge).

Figure de Julien Santi-Rocca, non publiée.

entre le corps cellulaire et le flagelle laisse supposer qu'il existe d'autres obstacles limitant la diffusion des protéines IFT. La zone de transition (TZ) (Reiter, Blacque et al. 2012), l'anneau de septine (Hu, 2010) ou une structure équivalente aux nucléopores (Kee 2012) pourraient constituer des barrières contribuant à la concentration des protéines IFT à la base du flagelle. L'anneau de septine est probablement absent chez les trypanosomes puisqu'aucune séquence de septine n'a été détectée dans leur génome (Berriman, Ghedin et al. 2005). La modulation de la zone de transition a peu ou pas d'impact sur l'IFT. Les protéines MKS, MKSR et NPHP font partie d'un réseau d'interactions fonctionnelles nécessaires à un stade précoce de la ciliogenèse et à la formation de la porte ciliaire ((Dawe, Smith et al. 2007) ; (Jauregui, Nguyen et al. 2008)). Pour tester si l'étape précoce de la ciliogenèse est dépendant de l'IFT, les analyses des kymographes des doubles et simples mutants *mks/nphp* chez *C. elegans* ayant toujours une faible portion de cils ont été réalisées. Le transport n'est pas affecté dans les simples ni dans les doubles mutants ((Cevik, Sanders et al. 2013) ; (Williams, Li et al. 2011)) montrant que la zone de transition n'est pas indispensable à la concentration et au fonctionnement des protéines IFT (Williams, Li et al. 2011).

Nous suggérons dès lors que la concentration des protéines IFT à la base du flagelle de *T. brucei* dépend d'une structure de type nucléopore et/ou des fibres de transition. L'utilisation de l'anticorps monoclonal mAb414 (qui détecte les répétitions FXFG, une signature particulière de plusieurs nucléoporines) et de fusion de trois nucléoporines à la GFP ont révélé leur présence au niveau de la membrane nucléaire mais aussi au niveau de la base du flagelle (Figure 28). De plus, une colocalisation est observée entre le pool des IFT et les fibres de transition suggérant alors que les nucléoporines localisées à la base du flagelle pourraient contribuer à la concentration des protéines IFT.

Chez *Tetrahymena pyriformis*, des expériences en microscopie électronique ont mis en évidence la présence d'un système de cloisonnement ciliaire (Ciliary Partitioning System pour CPS). Cette barrière permettrait de concentrer les IFT à la base et pourrait réguler l'entrée des IFT dans le flagelle (Ounjai, Kim et al. 2013). Une autre étude chez *C. elegans* révèle qu'un composant des fibres de transition faciliterait l'entrée des complexes IFT dans le cil. Plus précisément, la protéine FBF1 (ou DYF-19) est localisée au niveau des fibres de transition. Son absence entraîne la perte du moteur kinésine 2 de la base des cils et est accompagnée d'une accumulation des protéines IFT à la base. Il a été établi que cette protéine interagit directement

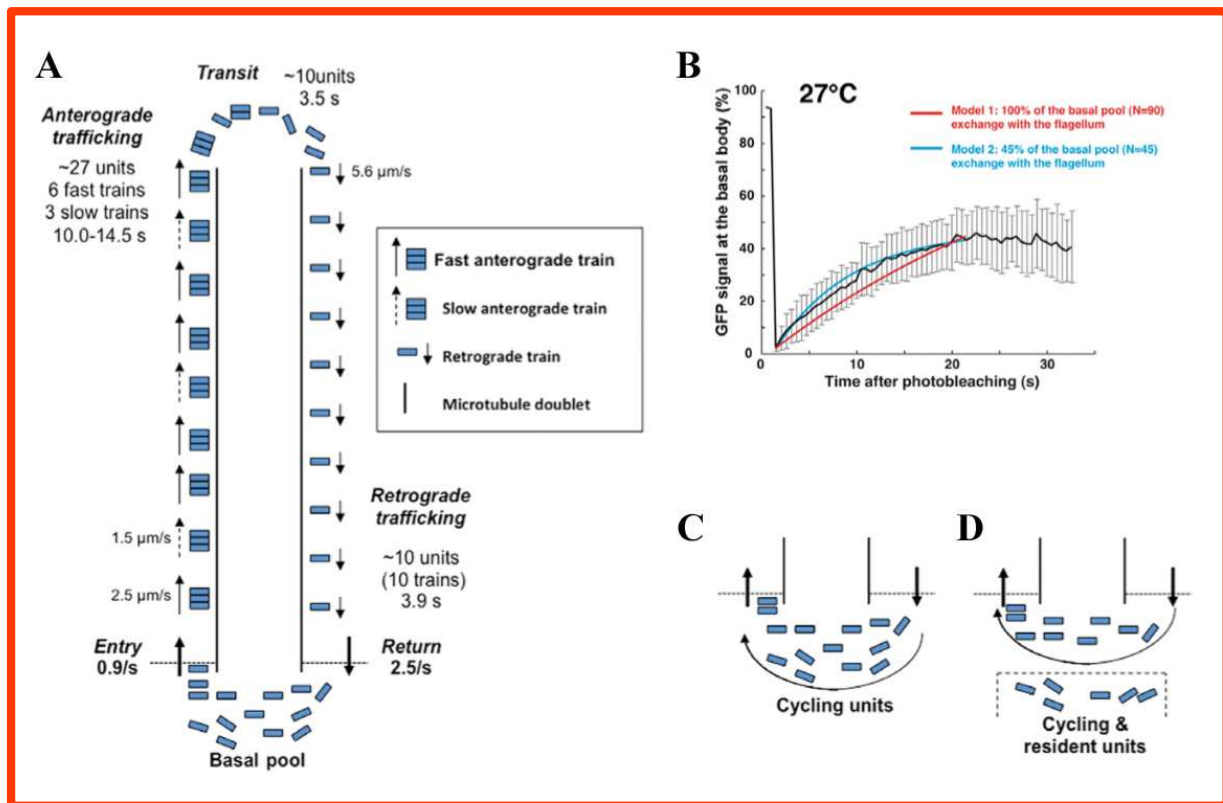


Figure 29 : Dynamique des IFT à la base du flagelle et dans le cil

- A) Modèle montrant la répartition des trains IFT dans le flagelle. La fusion et la fission des trains ne sont pas représentées dans ce modèle par souci de clarté. Les trains antérogrades semblent être plus longs et voyagent à une vitesse de 1,5 $\mu\text{m/sec}$ pour la première population et de 2,5 $\mu\text{m/sec}$ pour la seconde population. Lorsque les trains IFT arrivent à l'extrémité distale du flagelle, ils semblent être fragmentés en trois trains rétrogrades. Les trains IFT rétrogrades repartent plus rapidement vers la base du flagelle à une vitesse d'environ 5,6 $\mu\text{m/sec}$.
- B) Quantification du signal fluorescent à la base du flagelle avant et après photoblanchiment (FRAP) dans les cellules où l'intensité de fluorescence à la base du flagelle n'est pas saturée. Les données de recouvrement de fluorescence sont la moyenne d'une dizaine de films distinct.
- C-D) Modèles dynamiques du recyclage des IFT à la base du flagelle avec la participation de l'ensemble des protéines IFT (modèle 1 en rouge au niveau de la figure B) où seulement d'une population (modèle 2 en bleu au niveau de la figure B).

Figure de (Buisson, Chenouard et al. 2013).

avec le composant IFT54 (DYF-11), ce qui pourrait réguler le passage des particules IFT à l'intérieur du cil (Wei, Xu et al. 2013).

Une autre question concerne le devenir des trains IFT lorsqu'ils atteignent l'extrémité distale du flagelle. Subissent-ils un réarrangement spécifique dans cette zone ? Comment les moteurs antérogrades sont-ils désactivés ? Quel régulateur permet d'activer les moteurs dynéines jusqu'alors transportés par les trains ? S'en suit alors une troisième question : quel est le devenir des trains IFT lorsqu'ils reviennent à la base du cil ? Subissent-ils un démontage pour être recyclés ou un remaniement ? Sont-ils réinjectés directement dans le cil afin d'effectuer un nouveau cycle ?

Des expériences de FRAP à la base du flagelle ont été réalisées chez *T. brucei* afin d'étudier le recyclage des trains IFT et le modèle proposé suggère l'existence de deux pools distincts à la base du flagelle. Le modèle le plus simple propose que l'ensemble du stock des protéines IFT trouvé à la base du flagelle est mobilisé pour le transport intraflagellaire dans le flagelle. Cependant, l'analyse de la forme de la courbe montrant le recouvrement de la fluorescence en fonction du temps indique une reconstitution plus rapide du pool basal. Le second modèle suggère que 45 % des protéines IFT sont recyclées rapidement et contribuent à la formation de nouveaux trains antérogrades (Figure 29) (Buisson, Chenouard et al. 2013).

L'expression continue de protéines IFT fusionnées à des protéines fluorescentes est régulièrement utilisée au laboratoire et permet de visualiser en temps réel leur localisation et leur déplacement au sein du cil. Toutefois, elle ne permet pas de distinguer le matériel recyclé du matériel néo-synthétisé. J'ai donc produit une souche où l'expression de GFP::IFT52 est inductible à la tétracycline afin de visualiser au cours du temps le recrutement des protéines IFT à la base du flagelle. Plusieurs hypothèses sont envisagées : sont-elles directement recrutées et assemblées en trains à la base du cil ? Existe-t-il une concentration limitante de protéines IFT au niveau de la base du flagelle avant leur assemblage ? Les protéines IFT subissent-elles la même dynamique au niveau du flagelle mature et du flagelle en construction ? Une fois que le transport intraflagellaire se met en place, que se passe-t-il lorsque les IFT retournent à la base ? Sont-ils recyclés dans le flagelle ou vers le cytoplasme ? Toutefois, la cinétique d'induction à la tétracycline prend environ 60 minutes (Bastin, MacRae et al. 1999) alors que le cycle de l'IFT dure une vingtaine de secondes (Buisson, Chenouard et al. 2013).

Afin de comprendre l'échange et le recyclage des protéines IFT entre le cil et le cytoplasme sur des périodes courtes, une souche exprimant une protéine de fusion entre IFT81 et la protéine photoconvertible Kaede (Ando, Hama et al. 2002) a été générée. Nous avons choisi IFT81, une des protéines du complexe IFT-B déjà bien caractérisée (Bhogaraju, Cajanek et al. 2013). Une fois exprimée, la Kaede est excitée et émet une fluorescence verte de type GFP. Sous l'effet d'un pulse UV, la Kaede présente dans la zone d'intérêt est photoconvertie instantanément et change son spectre d'émission de vert à rouge de façon irréversible. Nous pourrions ainsi visualiser le devenir des protéines IFT photoconverties au cours du temps pour étudier leur recyclage dans le flagelle mais aussi l'échange possible entre les flagelles matures et en construction.

2.3 Transport de la tubuline par les IFT

Nous avons vu précédemment que les trains IFT transportaient la tubuline (Craft, Harris et al. 2015), un constituant majeur de l'axonème.

Comment la tubuline est-elle ancrée au train IFT ? Les données cristallographiques et l'analyse structurale de la protéine IFT81 révèlent que son extrémité amino-terminale forme un domaine d'homologie à la calponine capable de lier la tubuline *in vitro* (Bhogaraju, Cajanek et al. 2013). L'équipe de Esben Lorentzen (Institut Max Planck, Munich) a étudié le domaine de liaison à la tubuline en recherchant quelles parties étaient nécessaires pour lier la tubuline. Le domaine d'homologie à la calponine n'est pas nécessaire à la formation ni à la stabilité du complexe B. Le module de liaison à la tubuline est formé par le complexe IFT74/81 avec le domaine CH qui semble lier le domaine globulaire de la tubuline pour fournir la spécificité alors que la partie amino-terminale d'IFT74 reconnaît la queue β -tubuline permettant d'augmenter l'affinité de la liaison.

Des études fonctionnelles ont été menées sur des cellules RPE1 afin de comprendre l'impact de différentes mutations du site de liaison à la tubuline. Flag-HsIFT81 et Flag-HsIFT81 Δ N ont été exprimées de façon transitoire. L'extinction d'IFT81 par siARN réduit fortement le pourcentage de cellules ciliées. La co-expression de transcrit résistants à l'ARNi exprimant la version normale de IFT81 complète le phénotype et assure la restauration des cils. En revanche, aucun des mutants IFT81 déficient pour la liaison à la tubuline *in vitro* ne peut compenser la diminution de IFT81 endogène. Le mutant *HsIFT81 Δ N* ou *HsIFT81mut1* (mutant dont la capacité de lier la tubuline est réduite) entraîne une sauvegarde partielle de la

formation des cils tandis que l'expression du mutant *HsIFT81mut2* (dans lequel la liaison à la tubuline est abolie) ne permet pas la sauvegarde des cils. Comme le site de liaison à la tubuline n'est pas indispensable à la formation des complexes d'IFT *in vitro*, on peut penser que le phénotype obtenu est bien dû à cause d'une réduction de la liaison de la tubuline. Toutefois, on ne peut pas exclure que la mutation entraîne un défaut de la formation des trains qui sont constitués de plusieurs complexes IFT. Pour évaluer cette hypothèse, une collaboration a été développée entre nos deux équipes. Nous avons exprimé séparément chez *T. brucei* une protéine de fusion entre la YFP et soit une version normale d'IFT81 ou une version qui porte une double mutation dans le domaine CH de liaison à la tubuline (IFT81 I46D, L47D). La formation du site de liaison à la tubuline sur le domaine CH dépend de résidus hydrophobes. L'ajout de résidus de grande tailles chargés positivement et empêche le domaine CH de se former et donc de lier la tubuline. La validation de la souche sera effectuée par western blot et des études du transport intraflagellaire seront réalisées par vidéo-microscopie sur cellules vivantes suivies d'analyses kymographiques. Ceci permettra de déterminer si ces mutations entraînent une perturbation de la formation des trains IFT.

2.4 Les voies du transport intraflagellaire

Les constituants flagellaires sont donc transportés sous forme de cargo par les trains IFT à l'intérieur du flagelle. L'observation des événements du transport n'indique aucune collision entre le transport antérograde et rétrograde. Comment sont donc gérés les deux types de transport au sein du flagelle ?

La microscopie photonique nous permet de visualiser et de suivre en temps réel le déplacement des trains IFT par l'intermédiaire d'un de ses composants couplé à une protéine fluorescente ((Buisson, Chenouard et al. 2013) ; (Huet, Blisnick et al. 2014) ; (Craft, Harris et al. 2015)). L'extraction des kymographes nous renseigne sur la vitesse des trains mais également sur leur fréquence dans les deux sens (Buisson, Chenouard et al. 2013). La microscopie électronique permet d'obtenir des informations structurales de plus haute résolution quant à la présence des particules IFT dans le flagelle. Ces particules IFT sont denses aux électrons et sont positionnées chez *T. brucei* au niveau du doublet 3-4 et 7-8, de part et d'autre de la PFR ((Absalon, Blisnick et al. 2008) ; (Hoog, Lacomble et al. 2016)). Chez *Chlamydomonas*, les trains IFT se déplacent rapidement le long des neuf doublets de microtubules en effectuant un aller-retour de la base vers la pointe du flagelle. Chez *T. brucei*, deux hypothèses sont proposées quant à la disposition et la localisation des trains IFT dans le

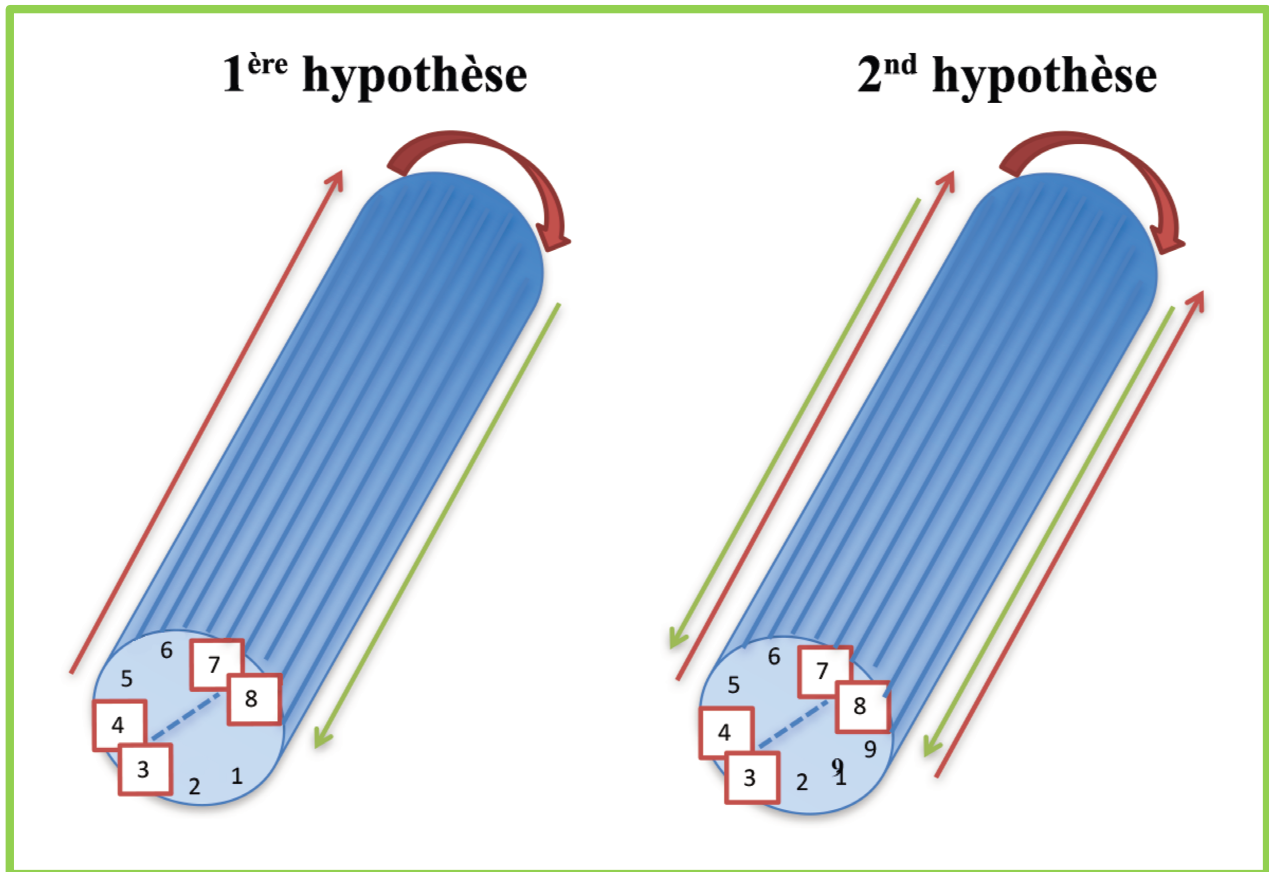


Figure 30 : Schéma représentant les deux hypothèses du trafic des trains IFT chez *T. brucei*

Dans la première hypothèse, les trains antérogrades se déplacent préférentiellement sur l'un des deux doublets définis et dans la seconde hypothèse, les trains IFT privilégient le tubule A des doublets 3/4 et 7/8 pour un sens et utilisent le second tubule pour l'autre direction.

flagelle : soit les trains antérogrades et rétrogrades se déplacent préférentiellement sur l'un des deux doublets de microtubules défini puisqu'il n'y a aucune collision observée ou soit les trains IFT privilégient le tubule A des doublets 3/4 ou 7/8 pour un sens et utilisent le second tubule pour l'autre direction (Figure 30). La configuration tri-dimensionnelle du flagelle de *T. brucei* autour du corps cellulaire ne permet pas d'analyser par coupe en microscopie électronique à transmission traditionnelle la distribution de l'ensemble des trains.

Afin de déterminer le positionnement, la distribution ainsi que la taille des trains IFT, nous avons entrepris une analyse des flagelles en 3D sur des trypanosomes sauvages ou mutants en utilisant deux technologies de pointe qui sont la SBF-SEM (pour Serial Block Face sectionning - Scanning Electron Microscopy) et le FIB-SEM (Focused Ion Beam-SEM). La localisation des particules IFT étant précise chez *T. brucei* (Absalon, Blisnick et al. 2008), nous proposons l'hypothèse que les microtubules (MT) sont sujets à des marques particulières qui définiraient leur sélection par le moteur moléculaire. Ces marques pourraient être définies par des modifications post-traductionnelles de la tubuline comme la glutamylation où la glycylation qui sont très abondantes dans les cils et les flagelles. Chez *T. brucei*, seule la glutamylation est présente, ce qui en fait une fois de plus un très bon modèle vu que la situation est plus simple. Des expériences d'immunomarquages à l'or colloïdal seront réalisées sur des coupes transversales de flagelles mais également sur des cytosquelettes de parasites pour étudier la répartition de ses modifications sur les doublets de microtubules au moyen de TAT-1 (anti α -tubuline), GT335 (racine des tubulines glutamylées) et de l'anticorps anti-polyE (détectant les chaînes contenant plus de trois glutamates). La contribution de la glutamylation au positionnement des trains IFT sera recherché en étudiant les enzymes responsables de ces modifications post-traductionnelles qui appartiennent à la famille des Tubuline Tyrosine Like Ligase (TTLL) ((Regnard, Fesquet et al. 2003) ; (Janke, Rogowski et al. 2005)). Chez les mammifères, neuf glytamylases existent et peuvent catalyser deux types de gènes plusieurs mutants contre les TTLL. L'étude a été menée chez *Leishmania* et *T. brucei* sur seulement deux des huit gènes TTLL. L'extinction simultanée des enzymes TTLL4A et TTLL6B par ARNi a montré sur *T. brucei* une croissance normale des cellules avec une augmentation modérée mais significative du nombre de cellules multi-nucléées. Une diminution du signal de la polyglutamylation a été observée sur les cellules par immunofluorescence et par western blot.

Vu la redondance des TLL nous avons décidé de cibler par ARNi l'ensemble des 7 gènes de la famille des enzymes TLL (TTLL1, TTLL4A, 4B et 4C, TTLL 6A et 6B et TTLL9) qui pourraient être responsables de la glutamylation. Nous avons visualisé le phénotype par immunofluorescence, western blot, microscopie électronique à transmission et à balayage.

MATERIELS ET METHODES

3 Matériels et méthodes

Imaging intraflagellar transport in trypanosomes

Julien Santi-Rocca^{*,a}, Nicolas Chenouard^{§,a}, Cécile Fort^{*,a}, Thibault Lagache^{§,a},
Jean-Christophe Olivo-Marin[§], Philippe Bastin^{*,1}

^{*}*Trypanosome Cell Biology Unit, Institut Pasteur & CNRS URA2581, Paris, France*

[§]*Bio Image Analysis Unit, Institut Pasteur & CNRS URA2582, Paris, France*

¹*Corresponding author: E-mail: pbastin@pasteur.fr*

CHAPTER OUTLINE

Introduction	2
1. Producing Trypanosomes Expressing Fluorescent IFT Fusion Proteins	4
1.1 Selecting the Expression Plasmid	4
1.1.1 Choice of expression conditions	4
1.1.2 Choice of fluorescent proteins	7
1.1.3 Choice of resistance markers	7
1.2 Selecting the Recipient Cell Line	7
1.2.1 For constitutive expression of fusion proteins	8
1.2.2 For inducible expression of fluorescent fusions	8
1.2.3 To evaluate the impact of protein knockdown	9
1.2.4 To evaluate the consequences of mutations in presence or absence of endogenous proteins	9
1.3 Producing the Cell Line	10
1.3.1 Protocol	10
1.3.2 Screening	11
1.4 Subcloning the Cell Line	11
1.4.1 Protocol	11
2. Visualization of IFT and Acquisition of Time-Lapse Videos	12
2.1 Cell Preparation	12
2.2 Live-Cell Imaging	13
2.2.1 Material	14
3. Quantification of IFT	14

^aEqual contribution.

3.1 Extraction of Kymograph, Separation of Anterograde and Retrograde Trafficking	15
3.2 IFT Rates Statistical Analysis Using the Bayesian Information Criterion	16
Conclusion	18
Acknowledgments	18
Supplementary Data	18
References	18

Abstract

Trypanosoma brucei is a flagellated eukaryotic pathogen responsible for sleeping sickness in central Africa. Because of the presence of a long motile flagellum (>20 μm) and its amenity to genetic manipulation, it is becoming an attractive model to study the assembly and the functions of cilia and flagella. In recent years, several aspects have been investigated, especially intraflagellar transport (IFT) that has been exhaustively characterized at the light microscopy level. In this manuscript, we review various methods to express fluorescent fusion proteins and to record IFT in living trypanosomes in normal or mutant contexts. We present an approach for separating anterograde and retrograde IFT, hence facilitating quantification of train speed, frequency, and size. A statistical analysis to discriminate different subpopulations of IFT trains is also summarized. These methods have proven their efficiency for the study of IFT in trypanosomes and could be applied to any other organism.

INTRODUCTION

Cilia and flagella are complex organelles usually built on a protrusion of the cell body. Tubulin and other structural elements are added at the distal tip of the organelle during its construction (Bastin, MacRae, Francis, Matthews, & Gull, 1999; Johnson & Rosenbaum, 1992; Rosenbaum, Moulder, & Ringo, 1969). Ciliary precursors are transported to the tip by large protein complexes (“trains”) that traffic along microtubules by molecular motors (Kozminski, Johnson, Forscher, & Rosenbaum, 1993; Pigino et al., 2009; Craft et al., 2015). Once they reach the end of the microtubules, the trains are recycled to the base of the organelle. This dynamic process has been termed IntraFlagellar Transport (IFT) and is conserved in all eukaryotic cells that assemble cilia and flagella on a protrusion of the cell body. IFT trains are made of two protein complexes that in total contain ~ 20 proteins and are driven by specific families of kinesin (anterograde transport) and dynein (retrograde transport) motors. Genes coding for these proteins are conserved in all ciliated species but are not encountered in amoeba, yeast, fungi, and seed plants that do not possess cilia and flagella (van Dam et al., 2013). They are also missing from species assembling their flagella directly in the cytoplasm where a transport process is not required (Briggs, Davidge, Wickstead, Ginger, & Gull, 2004).

Inhibition of any IFT component upon RNA interference (RNAi) or gene knockout invariably blocks IFT and results in failure to assemble the organelle. However, additional functions are expected since IFT appears equally active in

mature cilia and flagella once the construction is terminated. It could be required to maintain flagellum length as demonstrated in *Chlamydomonas* (Kozminski, Beech, & Rosenbaum, 1995) or to perform other functions such as the transport of signaling molecules (Qin et al., 2005). Moreover, IFT has been proposed to be a key player in the control of cilia and flagella length (Marshall & Rosenbaum, 2001). In addition to its fundamental interest, IFT has gained further attention due to the discovery of multiple hypomorphic mutations in *IFT* genes in human patients suffering from genetic diseases related to cilia and flagella that have been grouped under the term “ciliopathies” (Arts et al., 2011; Davis et al., 2011; Perrault et al., 2012).

To investigate IFT, it is crucial to visualize it. This has been achieved only in a handful of organisms such as unicellular species like *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1993; Qin, Wang, Diener, & Rosenbaum, 2007) and *Trypanosoma brucei* (Absalon et al., 2008), in *Caenorhabditis elegans* (Orozco et al., 1999) and recently in zebrafish (Bader, Kusik, & Besharse, 2012). IFT has also been reported in the primary cilium of certain mammalian cell lines in culture (Besschetnova, Roy, & Shah, 2009; Follit, Tuft, Fogarty, & Pazour, 2006). This review will focus on *T. brucei*, an interesting model for IFT that complements studies on *Chlamydomonas* or *C. elegans* (Morga & Bastin, 2013).

Trypanosomes are well known as human parasites transmitted by the bite of the tsetse fly and responsible for sleeping sickness. Several strains can be grown and manipulated in the laboratory and their long flagellum (>20 μm in the culture stages) offers a highway to visualize and quantify IFT. Moreover, the cell maintains its existing single flagellum during the construction of the new one, hence providing the unique opportunity to compare mature and elongating flagella in the same cell (Sherwin & Gull, 1989). In addition to the classic 9 + 2 axoneme, the flagellum also contains a large structure called the paraflagellar rod (PFR) (Portman & Gull, 2010) that is unique to Euglenozoa, a group of protists belonging to the excavates and characterized by the presence of motile flagella and an elaborate subpellicular cytoskeleton. Reverse genetics is highly efficient with inducible RNAi, gene replacement and endogenous tagging (Julkowska & Bastin, 2009; Oberholzer, Lopez, Ralston, & Hill, 2009), turning the trypanosome in a potent model to study gene function. IFT was first visualized upon overexpression of a GFP::IFT52 protein (GFP, Green Fluorescent Protein) in the procyclic stage (that normally develops in the midgut of the tsetse fly) (Absalon et al., 2008). To avoid potential side effects of overexpression, a specific expression vector relying on suitable upstream and downstream regulation sequences adapted to flagellar genes was used (Adhiambo, Blisnick, Toutirais, Delannoy, & Bastin, 2009; Huet, Blisnick, Perrot, & Bastin, 2014). More recently, endogenous tagging has become the method of choice to tag IFT proteins with a fluorescent marker (Bhogaraju et al., 2013; Blisnick et al., 2014). We will review here these different tagging approaches and describe the methods used to record IFT. In the second section, we will present the methodology employed to quantify IFT, based on the separation between anterograde and retrograde trains (Buisson et al., 2013; Chenouard, Buisson, Bloch, Bastin, & Olivo-Marin, 2010). Finally, statistical methods to discriminate subpopulations of IFT trains will be explained.

1. PRODUCING TRYPANOSOMES EXPRESSING FLUORESCENT IFT FUSION PROTEINS

1.1 SELECTING THE EXPRESSION PLASMID

1.1.1 Choice of expression conditions

Given the diversity of available expression vectors and fluorescent proteins, investigators must select the best strategy according to their needs (Table 1). In trypanosomes, all the vectors are integrated in the genome by homologous recombination (ten Asbroek, Ouellette, & Borst, 1990). Selection of recombinant cells is carried out by the expression of a gene conferring resistance to an antibiotic (six different possibilities). Historically, the first visualization of IFT in trypanosomes was achieved by overexpression of GFP::IFT52 (Absalon et al., 2008), followed by the first exhaustive characterization (Buisson et al., 2013) (Video S1). The vector used leads to overexpression and was selected at the time to ensure enough fluorescent protein was available for detection. Overexpression requires cloning of the full-length length gene downstream a strong promoter. In trypanosomes, RNA polymerase I promoters (rRNA or EP procyclin, the main surface protein whose transcription is ensured by RNA polymerase I) are the major ones to have been characterized in detail and to confer strong expression level at the procyclic stage (Sherman, Janz, Hug, & Clayton, 1991; Zomerdijk, Kieft, & Borst, 1991). The site of insertion of the construct is the rDNA spacer that is repeated in the genome and that is supposed to be transcriptionally silent (Wirtz & Clayton, 1995). Introduction of the tet-operator cassette in the EP promoter, a binding site for the bacterial tet-repressor, can render this promoter inducible by tetracycline once the repressor is expressed constitutively in trypanosomes (Wirtz & Clayton, 1995). Such is the case for the pHD430 vector, which can be integrated into the rDNA spacer. It contains the tetracycline-inducible EP procyclin promoter and the 3'-untranslated region (UTR) of *aldolase* (Table 1). Another series of vectors is based on the exogenous T7 RNA polymerase that drives efficient gene expression from constructs harboring the T7 promoter. If the T7 promoter contains the tet-operator, it can also be made inducible upon introduction of the tet-repressor cassette (Wirtz, Leal, Ochatt, & Cross, 1999). This is common in the trypanosome field and was used to express YFP fused to PIFTC3/DYF13 (Franklin & Ullu, 2010), recently renamed IFT56 (Ishikawa et al., 2014). The fusion was found at the expected location at the flagellum base and along the axoneme, although videos have not been reported (Franklin & Ullu, 2010).

A second possibility takes into account the fact that genes encoding flagellar proteins undergo specific regulations during the cell cycle of the parasite (Archer, Inchaustegui, Queiroz, & Clayton, 2011; Morga & Bastin, 2013). Respecting the temporal regulation of gene expression may avoid biases in protein localization and/or function. The specific vector pPCPFR suited to flagellar gene expression was designed for this purpose. The gene of interest is cloned between the *PFR2* and the *PFR1* intergenic sequences, and the vector can be integrated in the *PFR2* locus. The recombinant gene should in theory be expressed in the same conditions

Table 1 Main vectors used for expression of fluorescent reporters fused to IFT proteins. The name of the plasmids and their main attributes (genome targeting, regulatory sequences and drug resistance) are mentioned. YFP, Yellow Fluorescent Protein; EP, EP procyclin promoter; 5' and 3', sequences positioned upstream or downstream of the gene of interest.

Name	Fluorescent construct		Endogenous tagging: regulatory sequences		Ectopic expression				Induction	Resis-tance	Example	
	Fluores-cent protein	Position	5'	3'	Lineari-zation	Targeted site	5' regulatory sequence	3' regulatory sequence			Fluorescent construct	Reference
pHD430	GFP	N-term			Not I/ Eco RV Sal I	rDNA spacer actin 3'- UTR	inducible EP	aldolase	in PTH cell line (constitutive in WT)	Phleo	pHD430GFPIFT52	Absalon et al. (2008)
pPCPFR	GFP	N-term			Nsi I	PFR2 intergenic	PFR2 intergenic	PFR1 intergenic		Puro	pPCPFRGFPIFT22	Adhiambo et al. (2009)
p2675	eYFP/ TdTomato	N-term	Tubulin	endog- enous						Puro	pPCPFRYFPIFT27- RNAires	Huet et al. (2014)
p2845	mCherry/ TdTomato	N-term	Tubulin	endog- enous						Bla	p2845mCherryRP2	our unpublished data
p3329	eYFP	C-term	endog- enous	RNA poll subunit						Puro	p3329AlbaYFP	Subota et al. (2011)

as any *PFR2* gene. Several genes were cloned in the pPCPFR vector, producing GFP fusions whose trafficking could be monitored easily (Adhiambo et al., 2009; Huet et al., 2014).

A third option is endogenous tagging, which consists in the integration of the construct into the endogenous gene locus resulting in the expression of the recombinant gene under the control of either the upstream or the downstream regulatory elements (Figure 1). It is supposed to drive protein expression at a level close to the endogenous one, in particular if the fluorescent protein is fused in the aminoterminal position. In these conditions, the mRNA will retain the endogenous 3'-UTR, the main regulator for gene expression in trypanosomes (Kramer & Carrington, 2011). The full gene does not need to be cloned in the vector, representing a practical advantage in the case of large genes, such as those coding for dynein heavy chains that are larger than 10,000 base pairs (Blisnick et al., 2014). The genome of the parasite is diploid and some genes exist in multiple copies, although it has not been reported for *IFT* genes so far. This could be an issue for tagging tubulin, for example, where at least 20 gene copies have been reported (Ersfeld,

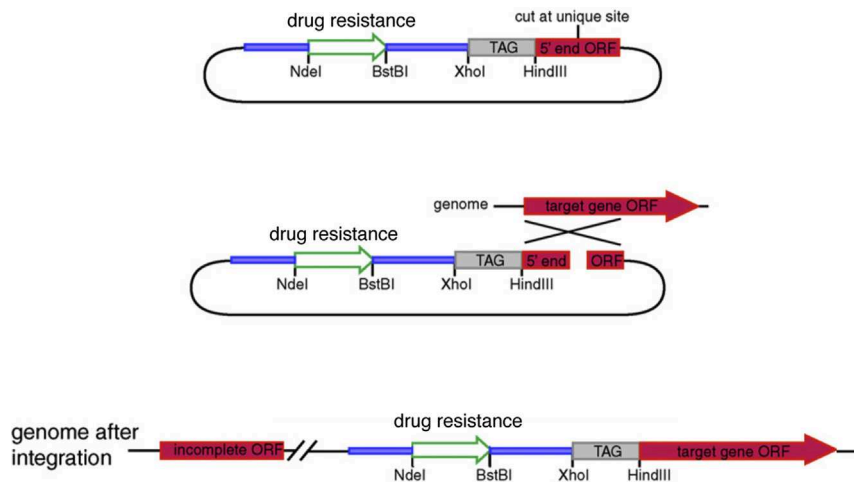


FIGURE 1 Principle for endogenous tagging.

The 5' portion of the gene of interest (red (dark gray in print versions), ORF for open reading frame) is cloned immediately downstream and in frame with the selected fluorescent tag (gray). The construct is linearized within the gene of interest, hence targeting integration to the endogenous locus. The recombinant cells are selected by adding an antibiotic against which the drug resistance marker ensures protection (marker gene shown in green (light gray in print versions)). The integration of the plasmid leads to the expression of the fusion gene whose expression level is controlled by the endogenous 3'-untranslated region. The first copy ("incomplete ORF") cannot produce a functional mRNA since it lacks processing signals at the 3' end.

Modified from Kelly et al. (2007).

Asbeck, & Gull, 1998). In this case, the expression of a single gene at the endogenous level may thus lead to production of relatively low amounts of fluorescent fusion protein.

1.1.2 Choice of fluorescent proteins

Currently, fluorescent proteins used successfully for fusion to IFT proteins emit from green to red (Table 1). These proteins are eGFP (excitation: 488 nm; emission: 507 nm), eYFP (513; 527), mCherry (587; 610), and TdTomato (554; 581). This wide choice across the spectrum allows the combined expression of two fluorescent constructs for simultaneous dual color imaging and possibly for FRET (fluorescence resonance energy transfer) experiments.

1.1.3 Choice of resistance markers

Selection of parasites nucleofected with different constructs is possible thanks to various drugs and to the genes conferring resistance to them. Five markers are used routinely: hygromycin (20 µg/mL), G418 (15 µg/mL), phleomycin (2.5 µg/mL), puromycin (1 µg/mL), and blasticidin (10 µg/mL). The corresponding resistance genes, borne by the plasmids upon nucleofection, are *hygromycin B phosphotransferase (hyg)*, *neomycin phosphotransferase (neo)*, *bleomycin-binding protein (ble)*, *puromycin N-acetyl transferase (puro)*, and *blasticidin-S deaminase (bla)*.

1.1.3.1 Protocol

1. For endogenous tagging, the gene fragment must begin at the start codon (N-terminal end tagging) or must finish exactly prior to the stop codon (C-terminal end tagging). The segment should be long enough to ensure efficient homologous recombination (in theory 100 bp should be sufficient) and must contain a unique restriction site for linearization (Kelly et al., 2007) since homologous recombination only functions with linear DNA molecules (ten Asbroek et al., 1990). The reading frame must obviously be maintained between the fluorescent reporter and the protein of interest, but linkers have been successfully introduced, for example, in the case of YFP::IFT81 expression (Bhogaraju et al., 2013).
2. For exogenous expression, the full-length gene must be cloned with (N-terminal tagging) or without (C-terminal tagging) stop codon. Since the plasmid is integrated to a different locus, it does not need to contain a linearization site but care should be taken to avoid the presence of the restriction site necessary for linearization (usually NotI for integration in the rDNA locus and NsiI for the *PFR2* locus).

1.2 SELECTING THE RECIPIENT CELL LINE

Once the plasmid has been produced, it can be introduced in various recipient cell lines according to the aim of the experiment.

1.2.1 For constitutive expression of fusion proteins

Fluorescent fusions are routinely produced in the procyclic stage of the wild type strain 427 of *T. brucei* that is amenable to genetic manipulation. The procyclic stage normally develops in the midgut of the tsetse fly and can be cultured easily in semidefined medium SDM79 supplemented with 1.5% hemin (H9039, Invitrogen) and 10% fetal calf serum (A15-101, PAA) at a temperature of 27 °C (Brun & Schonenberger, 1979). The fly has no temperature control system and although 27 °C has been determined as optimal conditions for *in vitro* cultivation, procyclic trypanosomes in the insect midgut are regularly exposed to highly fluctuating temperatures. For example, temperature can reach 37 °C when the fly feeds on an animal or can drop below 20 °C at dawn in the savannah. However, this strain has been maintained for long in culture and has lost infectivity for the tsetse fly, hindering *in vivo* investigation. This can be circumvented by working with strains that remain infective in the fly such as AnTat1. This strain can be transfected and IFT could easily be detected upon endogenous expression of TdTomato fused to IFT81 or IFT140. Importantly, the transformed cell line developed normally in the tsetse fly (Bertiaux et al., unpublished data). A wild-type background can also be used to study the effect of mutations introduced in a gene producing a fluorescent fusion protein. This strategy revealed that the residues necessary for the binding of IFT81 to tubulin were not involved in association of this protein to IFT trains (Bhogaraju et al., 2013).

1.2.2 For inducible expression of fluorescent fusions

Inducible expression can be achieved by using the PTH strain, which is a 427 strain transfected with a pHD360 vector constitutively expressing the *tetracycline repressor* gene (*tetR*) inserted in the *actin* locus and selected by hygromycin resistance (Bastin et al., 1999). Tetracycline binding triggers the release of the TetR from the tetracycline operator (TetO), its DNA-binding site. If the TetO is in a gene promoter sequence, binding of the TetR prevents the recognition by the RNA polymerase because of steric hindrance and hence blocks gene transcription. Thus, upon tetracycline addition, transcription is not blocked anymore, allowing expression of genes under the control of promoters containing the TetO (Wirtz & Clayton, 1995). The pHD430 plasmid (bearing *ble* gene) was designed for this use and provides well-controlled inducible expression of tagged proteins (Wirtz & Clayton, 1995). A puromycin-resistant version is also available (Huet et al., 2014). The only limitation is the presence of a single promoter driving transcription of both the gene of interest and the gene conferring antibiotic resistance. This means that potentially toxic gene products cannot be employed since cells would not survive selection. The 29-13 cell line is derived from strain 427 upon transfection with the pLew29 (bearing *tetR* and *hyg*), and pLew13 (bearing the *T7 RNA polymerase* gene, *neo*, and an additional *tetR*) plasmids and expresses the tet-repressor and the T7 RNA polymerase, ensuring tetracycline control of gene expression when using vectors relying on the T7 promoter (Wirtz et al., 1999). The most commonly used vector is termed pLew100 and is based on two separate promoters: a T7

inducible promoter for the gene of interest and a constitutive one for antibiotic resistance and selection.

1.2.3 To evaluate the impact of protein knockdown

Since the flagellum is a vital organelle for trypanosomes, IFT is essential for parasite survival (Kohl, Robinson, & Bastin, 2003), impeding the construction of knockout cell lines for functional studies. However, knockdown of gene expression can be achieved by RNAi using inducible transcription of double-stranded RNA. This is efficiently achieved by transforming the 29-13 strain with the pZJM plasmid (with *phleo* gene) that possesses two inducible T7 promoters facing each other. The pZJM vector containing a fragment of a gene of interest cloned between these promoters can be transfected in the 29-13 cell line, allowing for tetracycline-inducible RNAi (Wang, Morris, Drew, & Englund, 2000). This approach has been highly valuable to demonstrate the role of multiple *IFT* genes in flagellum construction (Absalon et al., 2008; Adhiambo et al., 2009; Blisnick et al., 2014; Davidge et al., 2006; Franklin & Ullu, 2010; Huet et al., 2014; Kohl et al., 2003).

Such *IFT*^{RNAi} cell lines can be transformed with a second plasmid, with a different drug resistance gene, allowing expression of an IFT fusion protein. This was achieved with the *IFT27*^{RNAi} to monitor the expression of the GFP::DHC2.1 expressed from the pPCPFR vector (Huet et al., 2014). Alternatively, a first nucleofection allows the production of a fluorescent fusion protein, while a second nucleofection can target the same gene by RNAi. We have used this strategy to follow the kinetics of downregulation of mCherry::RP2 (expressed from the p2845 with *bla* gene) following RP2 knockdown (dsRNA expressed from the pZJM with *phleo* gene) and induction with tetracycline. Additional transfection with the p2675 plasmid (with *puro* gene) ensuring YFP::IFT81 production permitted to follow the dynamics of IFT81 in the flagellum during RP2 knockdown, with internal controls for RNAi efficiency (our unpublished data). This allows the monitoring of the RNAi target and any other fluorescent protein of interest in live cells.

1.2.4 To evaluate the consequences of mutations in presence or absence of endogenous proteins

To gain further insight into gene function, recent conceptual advances have been achieved. In theory, RNAi by the expression of relatively long dsRNA (usually 300–500 bp in trypanosomes) hampers the study of mutations of the targeted gene in a background where endogenous protein is absent since the modified gene would also be targeted by RNAi. This shortcoming was circumvented by the use of RNAi-resistant constructs. As *T. brucei* does not possess an RNA-dependent RNA polymerase, RNAi is not transmitted to the portion of the gene that is not directly targeted by the sequence inserted in the pZJM plasmid. Since cross-RNAi is not observed once homology falls below 80% (Durand-Dubief, Kohl, & Bastin, 2003), an RNAi-resistant version of the gene can be expressed by substituting the codons in the region corresponding to the segment used for dsRNA production. The advantage of this approach is to make the gene resistant to RNAi targeting

endogenous copies. It first permits to demonstrate the specificity of the phenotype by complementation and then allows the expression of variants of the supplementary copy to evaluate their functional role. This was successfully applied to decipher the role of GTP/GDP-bound versions of the small GTPase IFT27 (Huet et al., 2014). Silencing of the endogenous copy resulted in the inhibition of flagellum formation that could be rescued by expression of an RNAi-resistant version coding for the same protein with an epitope or an YFP tag. Expression of a GTP-locked version of IFT27 was also able to rescue the phenotype (although flagella were a bit shorter than normal, they looked functional and cells grew normally) whereas the GDP-locked version was not able to reach the flagellum and could not sustain flagellum construction (Huet et al., 2014).

1.3 PRODUCING THE CELL LINE

Once the appropriate combination of vector and recipient cell line has been selected, transformation can be carried out.

1.3.1 Protocol

1. Plasmids are linearized with the suitable enzyme (NotI for pHD430, NsiI or BstXI for pPCPFR, gene-specific site for endogenous tagging) and linearization is verified by gel electrophoresis.
2. DNA sterilization is achieved by adding sodium acetate (pH 5.5, final concentration 0.3 M) and two volumes of ethanol 100%. The solution is then thoroughly mixed by inverting the tubes but without vortexing and left for 30 min at -20°C . Samples are centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min, and rinsed with 70% ethanol sterilized by filtration, in sterile manipulation conditions. After centrifugation, a second ethanol wash and a final centrifugation, samples are dried in sterile conditions.
3. The DNA pellet is rehydrated in sterile water at a concentration of $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ and can be used directly or stored frozen. It is recommended to avoid freeze–thaw cycles and to aliquot if multiple usages are scheduled.
4. Parasites grown at a concentration of $7.5 \times 10^6/\text{mL}$ (5.0–10.0 range) are pelleted from a 10 mL culture by centrifugation at $800 \times g$ for 5 min. Two washing steps in 1X phosphate buffer saline allow the removal of debris and serum.
5. Parasites are then resuspended in 100 μL transfection solution. Plasmids (10 μg in 5 μL) are put in the cell suspension. The mix is placed in a sterile cuvette and submitted to nucleofection (Amaxa, X-014 program) (Burkard, Fragoso, & Roditi, 2007).
6. Sample is resuspended in 30 mL of medium without antibiotics and 1 mL is put in the wells of a 24-well plate. A 1 in 10 dilution plate is also performed by using 3 mL of the initial suspension diluted in 27 mL of medium.
7. After 8–12 h of culture, 1 mL of medium containing antibiotics in a two-fold concentration is added to each well. A 1:10 dilution of the whole plate is also performed. Depending on the strain, the plasmid, the antibiotic and the number

of integrated plasmids, selection ranges from 1 to 4 weeks. Prefer the use of the plate inoculated with the low concentration solution, since it reduces the probability of obtaining polyclonal populations. After a few passages to other plates (for instance, first 1/4, then 1/10, and finally 1/20 dilution), the well content can be transferred to flasks.

1.3.2 Screening

Phenotypical screening of strains is initiated in multiwell plates using direct fluorescence on living cells. Care should be taken when selecting the volume of the solution according to the type of multiwell plates since access to oxygen is required for fluorescent protein maturation. If selection is linked to an inducible RNAi phenotype, it is generally achieved by induction with tetracycline (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and daily dilution to 10^6 parasites/mL. The presence of a fluorescent reporter itself targeted by RNAi provides the advantage to directly monitor the efficiency of RNAi by examining fluorescence loss that can be visible even before the appearance of first phenotypic (cellular) changes.

As IFT is essential for flagellum construction, a frequently observed phenotype is the construction of a shorter flagellum (Kohl et al., 2003). This can be measured on fixed samples. Immunofluorescence assays using mAb25 (targeting the TbSAXO1 axonemal protein) (Dacheux et al., 2012; Pradel, Bonhivers, Landrein, & Robinson, 2006) or L8C4/L13D6 (monoclonal antibodies detecting one or both major PFR proteins) (Kohl, Sherwin, & Gull, 1999) allow the measurement of the length of the axoneme or the PFR, respectively. Since the PFR is only present alongside the axoneme once the flagellum exits the flagellar pocket, it is preferable to avoid this marker in the case of presence of very short flagella.

Western blot is a valuable tool, since it allows to check the molecular weight of the fusion protein and thus to reduce the probability of selecting a truncated polypeptide. Using anti-fluorescent protein antibodies will confirm the presence of the tag. If an antibody against the original IFT protein is available, this is even better since both endogenous and tagged versions of the protein can be detected, allowing the direct comparison of their relative abundance.

1.4 SUBCLONING THE CELL LINE

Subcloning a strain allows to get rid of genetic heterogeneity in the parasite strain, and thus to greatly reduce phenotypic differences among the population.

1.4.1 Protocol

1. Parasites are grown at a density of 10^7 parasites/mL.
2. Ten-fold sequential dilutions are made in medium with corresponding antibiotics to yield 5-mL solutions at a concentration of 1000, 100, and 10 parasites/mL and one 10-mL sample at 1 parasite/mL.

3. In a 96-well plate, 200 μL of the suspension are inoculated in wells according to the following scheme:
 - a. columns 1–2: 1000 parasites/mL
 - b. columns 3–4: 100 parasites/mL
 - c. columns 5–6: 10 parasites/mL
 - d. columns 7–12: 1 parasite/mL
4. Grow cells for 1–2 weeks. The wells at the highest concentrations grow faster, turning the medium color to yellow (if phenol red is used as pH marker). To yield detectable amounts of cells in the wells with the lowest concentration, 10 days to 2 weeks are generally needed. In the six last columns, only one well out of five should be positive, due to limiting amounts of parasites (virtually 1/5 per well); this is used as a control of correct dilution and thus a way to testify the very likely clonality of the produced strains.

Some strains may grow poorly at low concentration. In this case, use conditioned medium. Conditioned medium is obtained by growing a 50-mL culture in suitable flasks from $10^6/\text{mL}$ to $10^7/\text{mL}$. Then, the culture is centrifuged three times 5 min at 4°C at $800 \times g$ (to pellet down cells), $1200 \times g$ (to pellet down remaining cells and big debris), and highest speed possible (to pellet all debris). Between each step, the pellet is discarded. The first two centrifuge steps allow to sediment parasites without breaking them and releasing their content into the medium. The cleared medium is then passed through $0.22 \mu\text{m}$ filters and will be added to the cloning medium (10–50%).

2. VISUALIZATION OF IFT AND ACQUISITION OF TIME-LAPSE VIDEOS

2.1 CELL PREPARATION

Cells are grown in SDM79 medium as described above and in the presence of the appropriate antibiotics. Cells grow in suspension and are diluted when their concentration reaches 1×10^7 cells/mL. For optimal cell health, parasites should be picked up at a concentration $\sim 5 \times 10^6$ cells/mL and observed immediately.

To assemble the slide:

1. Prepare the culture at 5×10^6 cells/mL (do not use cells at too low or too high concentrations).
2. Pick up a 5 μL -aliquot. If a high concentration of cells is required, the suspension can be centrifuged (2200 rpm).
3. Spread 5 μL of the cell suspension on the glass slide (Starfrost slide, Knittel Glass, Germany).
4. Cover with a coverslip (Menzel-Glaser 24×60 mm, N^o 1, 0.13–0.16 mm thick) for direct observation.

2.2 LIVE-CELL IMAGING

Successful imaging of multiple strains has been achieved upon tagging of various IFT proteins and motors with GFP, YFP, and TdTomato (Table 1 & Figure 2). IFT trafficking can also be studied in a mutant context, for example, following RNAi silencing of any gene of interest.

To acquire videos of IFT:

1. Position the slide on the microscope (can be an inverted or an upright microscope, see details below). To visualize IFT, use the 63 \times or the 100 \times objective.
2. Observe the sample at room temperature. If the temperature is greater than 30 $^{\circ}$ C, use air conditioning or a temperature-controlled chamber. In trypanosomes, IFT is sensitive to temperature: although no significant differences were noted between 20 and 27 $^{\circ}$ C, IFT rates increase spectacularly when cells are observed at 37 $^{\circ}$ C (up to 7 μ m per second for retrograde transport!) (Buisson et al., 2013).
3. Identify trypanosomes expressing the fluorescent protein with average/low excitation. There is a dense pool of IFT proteins and motors at the base of the flagellum that facilitates identification and focusing. Once a field or a cell of interest has been identified, videos can be recorded at a rate of 100 ms per frame

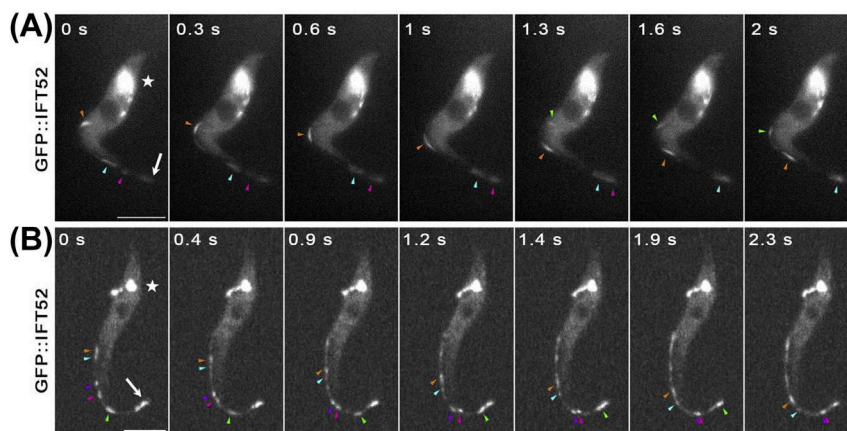


FIGURE 2 Examples of intraflagellar transport (IFT) trafficking.

Each row shows still images from movies of cells expressing GFP::*IFT52*. The successive position of anterograde (a, b, d) and retrograde (c) trains on each image is indicated by colored arrowheads. On the first image on the left, the star indicates the position of the flagellum base and the white arrow marks the distal end of the flagellum. (A) Cells were illuminated on a conventional epifluorescence microscope and images were acquired with 150 ms exposure using a CCD camera. (B) Fluorescence was excited with a laser using a microscope equipped with a spinning disk and images acquired with 100 ms exposure using an EMCCD camera. Scale bars are 5 μ m.

Reproduced from Buisson et al. (2013) with permission.

during 30 s (no time lapse). Acquisition must be performed directly on the stream mode. Some variability has been observed from one cell to the other, so it is important to record as many cells as possible.

4. Image acquisition is carried out with Metavue 64 bit (version 7.7.5.0, Molecular Devices) and images are analyzed with ImageJ 1.47g13 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). In the case of presentation of single images for figure, Adobe Photoshop CS5 is the preferred option. Alternatively, videos can also be acquired and analyzed with Volocity.

2.2.1 Material

We use a widefield Leica DMI4000B microscope (Leica, Wetzlar, Germany) with either a 63 \times objective (NA, 1.4) that provides better sensitivity but lower resolution or a 100 \times objective (NA, 1.4) for higher magnification but with slightly reduced sensitivity. In initial experiments, the fluorescent proteins were excited with an EL6000 external light source containing a mercury metal halide bulb and connected to the microscope by a liquid light guide (Buisson et al., 2013). More recently, a system based on light-emitting diodes, also connected to the microscope by a liquid light guide, is being used to excite fluorescent proteins more efficiently (Lumencor Spectra-X). This system allows for seven different wavelengths with high efficiency that is easily tuned down directly on the driving software. Moreover, it offers flexibility since the excitation filter is positioned in front of the diode itself. This is particularly well suited to cover the breadth of new fluorescent proteins. As an example, the following excitation filters are employed: 475 \pm 28 nm (GFP), 510 \pm 10 nm (YFP), and 574 \pm 19 nm (TdTomato). Stacks of images are recorded on an Orca-03G Hamamatsu CCD camera or on an Evolve 512 EMCCD camera (Photometrics, Tucson, AZ). CCD cameras have smaller pixels (6.45 \times 6.45 μ m in this case), offering better resolution whereas the EMCCD camera has larger pixels (16 \times 16 μ m), ensuring better sensitivity and shorter exposure times per frame.

A spinning disk confocal microscope is an interesting alternative for observation of IFT since it allows slower bleaching of the fluorescent signal. In our case, we used a Perkin–Elmer setting (UltraVIEW Vox, Perkin Elmer) with either a 63 \times objective (NA 1.4) or a 100 \times objective (NA 1.4) equipped with EMCCD Hamamatsu cameras. The sample is excited with lasers 405, 488, or 561 nm according to the type of fluorescent protein. Such a setting has the advantage to use two cameras in parallel, hence allowing simultaneous acquisition of two channels. This is especially useful to demonstrate that two IFT proteins are part of the same train, or to demonstrate association with candidate cargoes as demonstrated for BBS proteins in *Chlamydomonas* (Lechtreck et al., 2009).

3. QUANTIFICATION OF IFT

The speed and the frequency of IFT trains can be determined from kymograph analysis (Piperno et al., 1998). A kymograph is a 2D projection of the movement

of the IFT train along the flagellum on one axis versus time on the other axis (Figure 3 & Video S1). Analysis is greatly facilitated by a separate extraction of anterograde and retrograde transport (Figure 3) (Buisson et al., 2013; Chenouard et al., 2010).

3.1 EXTRACTION OF KYMOGRAPH, SEPARATION OF ANTEROGRADE AND RETROGRADE TRAFFICKING

As IFT trains progress along the flagellum, their trajectory through time can be compactly represented in a 1D + T space $K(x, t)$ with x the position along the flagellum. Each line of the kymograph image $K(x, t)$ corresponds to the set of observed intensity values along the flagellum path indexed by x , at time points t . As IFT trains trajectories appear as bright and continuous trails in kymographs, bidirectional transport yields sets of crossing lines that require specialized techniques to be automatically deciphered. Our approach is based on an adaptive and directional band-pass filtering method (Chenouard & Unser, 2012): two mathematical spaces are

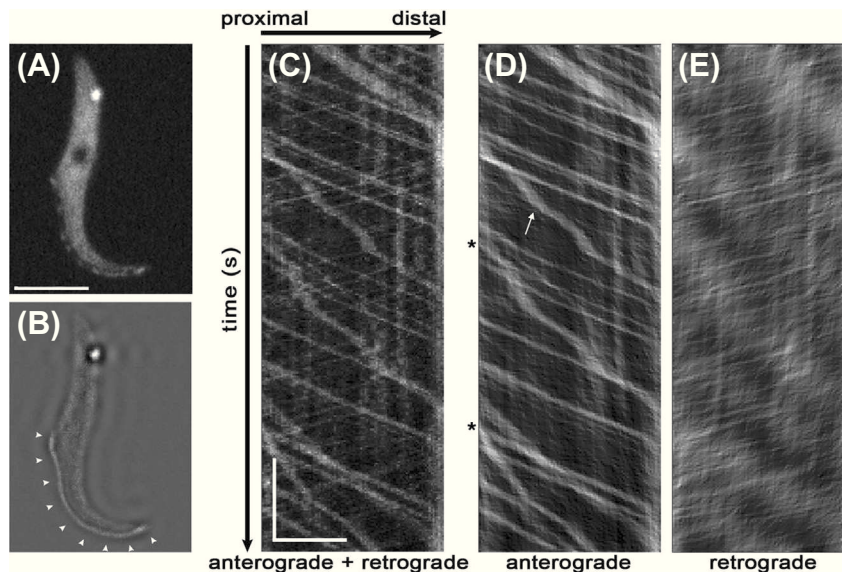


FIGURE 3 Kymograph generation and separation of anterograde and retrograde traces.

(A) Still image of Video S1 from which the kymograph was extracted. (B) The visible portion of the flagellum used for analysis is highlighted (arrowheads). (C) Kymograph extracted from the video where the X axis corresponds to the length of the flagellum (horizontal scale bar, 5 μm) and the Y axis to the elapsed time (vertical scale bar, 5 s). Anterograde (D) and retrograde (E) traces have been separated reducing background and allowing for straightforward analysis. Arrows indicate some slow trains that changed speed during their trip in the flagellum and stars point at very slow trains. Scale bars are 5 μm .

Reproduced from Buisson et al. (2013) with permission.

designed such that the first space offers compact representation of anterograde trails in the kymograph region, while the second one is best for retrograde trajectories. Mathematical details of the first version of the algorithm can be found in [Chenouard et al. \(2010\)](#). Moreover, in each direction-specific representation intense artifacts (e.g., trypanosome body) are removed before the retrograde and retrograde kymograph images are reconstructed. The whole processing thus yields the separation:

$$K(x, t) = K_{antero}(x, t) + K_{retro}(x, t) + n(x, t)$$

with $K_{antero}(x, t)$ and $K_{retro}(x, t)$ the kymograph images corresponding to anterograde- and retrograde-moving IFT trains, respectively, and $n(x, t)$ a residual noise.

For each separated kymograph, trajectories of IFT particles are then built in a semiautomated fashion as to allow the analysis of large numbers of kymograph images. IFT tracking is performed by linking trajectory extremities with a minimal path algorithm accounting for pixel intensity values (Dijkstra-type algorithm). Only track endpoints are defined by the user through the software graphical interface so as to ensure robust detection in low IFT intensity conditions while limiting the amount of human intervention. We then automatically extract several individual particle indicators as a function of time from the set of trajectories: the train length, its intensity averaged over the particle area, and its velocity. All methods are implemented as a freely available plugin (<http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/KymographTracker>) for the open-source image analysis platform ICY ([de Chaumont et al., 2012](#)) that offers seamless user interaction for trajectory tracing, inspection, and correction, as well as saving and reloading results for posterior processing. Thanks to the high level of automation of the kymograph extraction and analysis procedures, large data sets can be processed, hence yielding robust measurements and statistics of IFT trafficking ([Bhogaraju et al., 2013](#); [Buisson et al., 2013](#); [Huet et al., 2014](#)).

3.2 IFT RATES STATISTICAL ANALYSIS USING THE BAYESIAN INFORMATION CRITERION

The semiautomatic analysis of kymographs showed that IFT trains traveled at sometimes highly dissimilar rates in the same flagellum. To uncover the number of modes in both retrograde and anterograde IFT rates, corresponding to IFT populations traveling at different velocities along the flagellum, we analyzed statistically the empirical distribution $e(x)$ of IFT rates.

1. Model $e(x)$ with a weighted sum of p Gaussian laws $e(x) = \sum_{i=1}^p \alpha_i N(\mu_i, \sigma_i)$, each law (weight α_i) representing an IFT population (mode) traveling at the mean velocity μ_i (standard deviation σ_i). The principal statistical issue then consists of determining the optimal number p^* of IFT modes that ensure a sufficiently nice fitting of the empirical distribution $e(x)$, with a minimal number of modes to avoid overfitting. This can be tackled by using the Bayesian Information Criterion (BIC) that introduces a penalty term for the number of

parameters in the fitting model (Schwartz, 1978). BIC analysis can be decomposed into two main steps.

- For a fixed number of modes p , search for the optimal fitting parameters $(\alpha_i^*, \mu_i^*, \sigma_i^*)_{1 \dots p}$ that maximize the likelihood L of the model to data

$$L(\alpha_i, \mu_i, \sigma_i; \dots; \alpha_p, \mu_p, \sigma_p) = \prod_{j=1}^n \left[\sum_{i=1}^p \frac{\alpha_i}{\sqrt{2\pi\sigma_i}} \exp\left(-\frac{(x_j - \mu_i)^2}{2\sigma_i}\right) \right], \text{ where}$$

(x_1, x_2, \dots, x_n) are the observed anterograde or retrograde IFT rates in an individual flagellum and n the corresponding sample size.

- The second step consists in minimizing $BIC(p) = -2 \log(L_p^*) + k_p \log(n)$, where L_p^* and $k_p = 3p-1$ are respectively the maximized likelihood and the number of free parameters of the p -mixture model, in order to find the optimal number of modes p^* for either retrograde or anterograde IFT transport.

The BIC-based statistical analysis was applied to the measured GFP::*IFT52* rates in the cell line overexpressing GFP::*IFT52* from the pH430 vector integrated in the rDNA spacer. It revealed that anterograde IFT was bimodal ($p^* = 2$) in 29 of the 41 cells that were analyzed (71%), with $\sim 67\%$ of them displaying fast motility ($2.40 \pm 0.31 \mu\text{m/s}$, $n = 551$) and $\sim 33\%$ of them showing slow motion ($1.53 \pm 0.30 \mu\text{m/s}$, $n = 271$) (Figure 4). In contrast, kymograph traces appeared

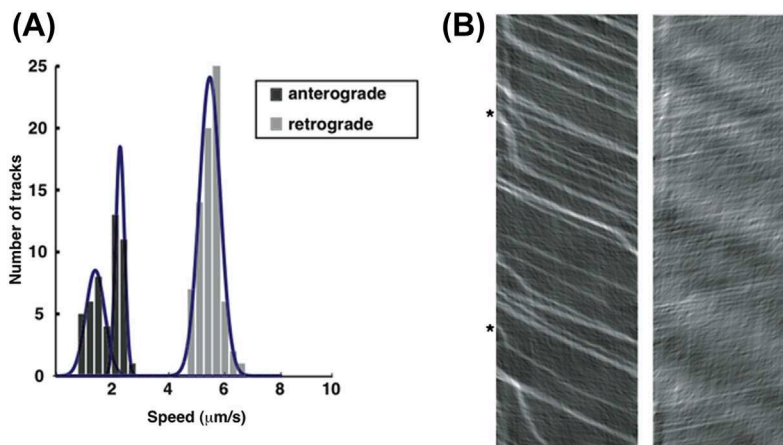


FIGURE 4 Example of Bayesian Information Criterion (BIC) analysis to separate two intraflagellar transport (IFT) populations.

(A) Speed of anterograde (dark gray) and retrograde (light gray) IFT trains in the GFP::*IFT52* expressing cell line. (B) Kymograph analysis. BIC analysis detected two separate populations of trains for anterograde transport whereas only one can be identified for retrograde transport. The obtained Gaussians for each anterograde population are represented as blue (black in print versions) lines. Stars point at some very slow trains that were not taken into account in the analysis.

Reproduced from Buisson et al. (2013) with permission.

more homogeneous for retrograde transport. This was confirmed by BIC statistical analysis which indicated that a single Gaussian model was the best fitting model for retrograde IFT rates in every movies, uncovering the fastest IFT rate reported so far: $5.64 \pm 1.01 \mu\text{m/s}$ ($n = 1223$) (Buisson et al., 2013).

CONCLUSION

The relative ease by which the trypanosome genome can be manipulated now allows scientists to express different combinations of fluorescent IFT fusions in a wide set of contexts. The detection and quantification of IFT in these multiple conditions offers ideal conditions to investigate the function of individual IFT proteins, the dynamics of the process, and the significance of mutations observed in ciliopathy patients. In principle, the methods we summarized here could also be applied to other cell types, ranging from mammalian cells to *C. elegans* and *Chlamydomonas*.

ACKNOWLEDGMENTS

J.S-R. is funded by postdoctoral fellowships from la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and by the Institut Carnot. C.F. is funded by an MNRT fellowship. Work in the Trypanosome Cell Biology Unit is supported by the Institut Pasteur, the CNRS, and an ANR grant ANR-11-BSV8-016. TL is funded by a postdoctoral Roux fellowship from Institut Pasteur. Work in the BioImage Analysis Unit is supported by the Institut Pasteur, the CNRS, and an ANR grant ANR-10-INBS-04-06 FranceBioImaging.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.01.005>.

REFERENCES

- Absalon, S., Blisnick, T., Kohl, L., Toutirais, G., Dore, G., Julkowska, D., et al. (2008). Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes. *Molecular Biology of the Cell*, *19*, 929–944.
- Adhiambo, C., Blisnick, T., Toutirais, G., Delannoy, E., & Bastin, P. (2009). A novel function for the atypical small G protein Rab-like 5 in the assembly of the trypanosome flagellum. *Journal of Cell Science*, *122*, 834–841.
- Archer, S. K., Inchaustegui, D., Queiroz, R., & Clayton, C. (2011). The cell cycle regulated transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*, *6*, e18425.
- Arts, H. H., Bongers, E. M., Mans, D. A., van Beersum, S. E., Oud, M. M., Bolat, E., et al. (2011). C14ORF179 encoding IFT43 is mutated in Sensenbrenner syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *48*, 390–395.

- ten Asbroek, A. L., Ouellette, M., & Borst, P. (1990). Targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene into the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*. *Nature*, *348*, 174–175.
- Bader, J. R., Kusik, B. W., & Besharse, J. C. (2012). Analysis of KIF17 distal tip trafficking in zebrafish cone photoreceptors. *Vision Research*, *75*, 37–43.
- Bastin, P., MacRae, T. H., Francis, S. B., Matthews, K. R., & Gull, K. (1999). Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*, *19*, 8191–8200.
- Besschetnova, T. Y., Roy, B., & Shah, J. V. (2009). Imaging intraflagellar transport in mammalian primary cilia. *Methods in Cell Biology*, *93*, 331–346.
- Bhogaraju, S., Cajanek, L., Fort, C., Blisnick, T., Weber, K., Taschner, M., et al. (2013). Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. *Science*, *341*, 1009–1012.
- Blisnick, T., Buisson, J., Absalon, S., Marie, A., Cayet, N., & Bastin, P. (2014). The intraflagellar transport dynein complex of trypanosomes is made of a heterodimer of dynein heavy chains and of light and intermediate chains of distinct functions. *Molecular Biology of the Cell*, *25*, 2620–2633.
- Briggs, L. J., Davidge, J. A., Wickstead, B., Ginger, M. L., & Gull, K. (2004). More than one way to build a flagellum: comparative genomics of parasitic protozoa. *Current Biology*, *14*, R611–R612.
- Brun, R., & Schonenberg, (1979). Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Tropica*, *36*, 289–292.
- Buisson, J., Chenouard, N., Lagache, T., Blisnick, T., Olivo-Marin, J. C., & Bastin, P. (2013). Intraflagellar transport proteins cycle between the flagellum and its base. *Journal of Cell Science*, *126*, 327–338.
- Burkard, G., Frago, C. M., & Roditi, I. (2007). Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *153*, 220–223.
- de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Herve, N., Pop, S., Provoost, T., et al. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods*, *9*, 690–696.
- Chenouard, N., Buisson, J., Bloch, I., Bastin, P., & Olivo-Marin, J. C. (2010). Curvelet analysis of kymograph for tracking bi-directional particles in fluorescence microscopy images. *Proceedings International Conference on Image Processing*, 3657–3660.
- Chenouard, N., & Unser, M. (2012). 3D steerable wavelets in practice. *IEEE Transactions on Image Processing*, *21*, 4522–4533.
- Craft, J. M., Harris, J. A., Hyman, S., Kner, P., & Lehtreck, K. F. (2015). Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism. *Journal of Cell Biology*, *19*(208), 223–237.
- Dacheux, D., Landrein, N., Thonnus, M., Gilbert, G., Sahin, A., Wodrich, H., et al. (2012). A MAP6-related protein is present in protozoa and is involved in flagellum motility. *PLoS One*, *7*, e31344.
- van Dam, T. J., Townsend, M. J., Turk, M., Schlessinger, A., Sali, A., Field, M. C., et al. (2013). Evolution of modular intraflagellar transport from a coatomer-like progenitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*, 6943–6948.

- Davidge, J. A., Chambers, E., Dickinson, H. A., Towers, K., Ginger, M. L., McKean, P. G., et al. (2006). Trypanosome IFT mutants provide insight into the motor location for mobility of the flagella connector and flagellar membrane formation. *Journal of Cell Science*, *119*, 3935–3943.
- Davis, E. E., Zhang, Q., Liu, Q., Diplas, B. H., Davey, L. M., Hartley, J., et al. (2011). TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nature Genetics*, *43*, 189–196.
- Durand-Dubief, M., Kohl, L., & Bastin, P. (2003). Efficiency and specificity of RNA interference generated by intra- and intermolecular double stranded RNA in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *129*, 11–21.
- Ersfeld, K., Asbeck, K., & Gull, K. (1998). Direct visualisation of individual gene organisation in *Trypanosoma brucei* by high-resolution in situ hybridisation. *Chromosoma*, *107*, 237–240.
- Follit, J. A., Tuft, R. A., Fogarty, K. E., & Pazour, G. J. (2006). The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Molecular Biology of the Cell*, *17*, 3781–3792.
- Franklin, J. B., & Ullu, E. (2010). Biochemical analysis of PIFTC3, the *Trypanosoma brucei* orthologue of nematode DYF-13, reveals interactions with established and putative intraflagellar transport components. *Molecular Microbiology*, *78*, 173–186.
- Huet, D., Blisnick, T., Perrot, S., & Bastin, P. (2014). The GTPase IFT27 is involved in both anterograde and retrograde intraflagellar transport. *eLife*. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.02419>.
- Ishikawa, H., Ide, T., Yagi, T., Jiang, X., Hirono, M., Sasaki, H., et al. (2014). TTC26/DYF13 is an intraflagellar transport protein required for transport of motility-related proteins into flagella. *eLife*, *3*, e01566.
- Johnson, K. A., & Rosenbaum, J. L. (1992). Polarity of flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Journal of Cell Biology*, *119*, 1605–1611.
- Julkowska, D., & Bastin, P. (2009). Tools for analyzing intraflagellar transport in trypanosomes. *Methods in Cell Biology*, *93*, 59–80.
- Kelly, S., Reed, J., Kramer, S., Ellis, L., Webb, H., Sunter, J., et al. (2007). Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *154*, 103–109.
- Kohl, L., Robinson, D., & Bastin, P. (2003). Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO Journal*, *22*, 5336–5346.
- Kohl, L., Sherwin, T., & Gull, K. (1999). Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *46*, 105–109.
- Kozminski, K. G., Beech, P. L., & Rosenbaum, J. L. (1995). The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *Journal of Cell Biology*, *131*, 1517–1527.
- Kozminski, K. G., Johnson, K. A., Forscher, P., & Rosenbaum, J. L. (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*, 5519–5523.
- Kramer, S., & Carrington, M. (2011). Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *Trends in Parasitology*, *27*, 23–30.

- Lechtreck, K. F., Johnson, E. C., Sakai, T., Cochran, D., Ballif, B. A., Rush, J., et al. (2009). The *Chlamydomonas reinhardtii* BBSome is an IFT cargo required for export of specific signaling proteins from flagella. *Journal of Cell Biology*, *187*, 1117–1132.
- Marshall, W. F., & Rosenbaum, J. L. (2001). Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *Journal of Cell Biology*, *155*, 405–414.
- Morga, B., & Bastin, P. (2013). Getting to the heart of intraflagellar transport using *Trypanosoma* and *Chlamydomonas* models: the strength is in their differences. *Cilia*, *2*, 16.
- Oberholzer, M., Lopez, M. A., Ralston, K. S., & Hill, K. L. (2009). Approaches for functional analysis of flagellar proteins in African trypanosomes. *Methods in Cell Biology*, *93*, 21–57.
- Orozco, J. T., Wedaman, K. P., Signor, D., Brown, H., Rose, L., & Scholey, J. M. (1999). Movement of motor and cargo along cilia. *Nature*, *398*, 674.
- Perrault, I., Saunier, S., Hanein, S., Filhol, E., Bizet, A. A., Collins, F., et al. (2012). Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations. *American Journal of Human Genetics*, *90*, 864–870.
- Pigino, G., Geimer, S., Lanzavecchia, S., Paccagnini, E., Cantele, F., Diener, D. R., et al. (2009). Electron-tomographic analysis of intraflagellar transport particle trains in situ. *Journal of Cell Biology*, *187*, 135–148.
- Piperno, G., Siuda, E., Henderson, S., Segil, M., Vaananen, H., & Sassaroli, M. (1998). Distinct mutants of retrograde intraflagellar transport (IFT) share similar morphological and molecular defects. *Journal of Cell Biology*, *143*, 1591–1601.
- Portman, N., & Gull, K. (2010). The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *International Journal of Parasitology*, *40*, 135–148.
- Pradel, L. C., Bonhivers, M., Landrein, N., & Robinson, D. R. (2006). NIMA-related kinase TbNRKC is involved in basal body separation in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, *119*, 1852–1863.
- Qin, H., Burnette, D. T., Bae, Y. K., Forscher, P., Barr, M. M., & Rosenbaum, J. L. (2005). Intraflagellar transport is required for the vectorial movement of TRPV channels in the ciliary membrane. *Current Biology*, *15*, 1695–1699.
- Qin, H., Wang, Z., Diener, D., & Rosenbaum, J. (2007). Intraflagellar transport protein 27 is a small G protein involved in cell-cycle control. *Current Biology*, *17*, 193–202.
- Rosenbaum, J. L., Moulder, J. E., & Ringo, D. L. (1969). Flagellar elongation and shortening in *Chlamydomonas*. The use of cycloheximide and colchicine to study the synthesis and assembly of flagellar proteins. *Journal of Cell Biology*, *41*, 600–619.
- Schwartz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, *6*, 461–464.
- Sherman, D. R., Janz, L., Hug, M., & Clayton, C. (1991). Anatomy of the *parp* gene promoter of *Trypanosoma brucei*. *EMBO Journal*, *10*, 3379–3386.
- Sherwin, T., & Gull, K. (1989). The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Philosophical Transactions of the Royal Society Lond B: Biological Sciences*, *323*, 573–588.
- Subota, I., Rotureau, B., Blisnick, T., Ngwabyt, S., Durand-Dubief, M., Engstler, M., & Bastin, P. (2011). ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. *Molecular Biology of the Cell*, *22*, 4205–4219.
- Wang, Z., Morris, J. C., Drew, M. E., & Englund, P. T. (2000). Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *Journal of Biological Chemistry*, *275*, 40174–40179.

- Wirtz, E., & Clayton, C. (1995). Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science*, *268*, 1179–1183.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., & Cross, G. A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *99*, 89–101.
- Zomerdijk, J. C., Kieft, R., & Borst, P. (1991). Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, *353*, 772–775.

RESULTATS

4 Résultats

4.1 Le transport intraflagellaire maintient la composition du cil

4.1.1 Résumé de l'article

L'IFT est essentiel à la construction des cils et flagelles mais reste actif dans les cils matures dont la construction est pourtant terminée. Chez l'algue verte *Chlamydomonas*, l'IFT est nécessaire à la maintenance de la longueur du flagelle. Toutefois, ceci n'a pas été démontré chez d'autres espèces flagellées. Pour étudier le rôle de l'IFT chez les flagelles matures de *T. brucei*, le blocage de l'expression des gènes *IFT88* et *IFT140* est réalisé par ARN interférence (ARNi) et le transport intraflagellaire est suivi au moyen d'une protéine de fusion entre la YFP et IFT81. Dans les deux cas, la croissance du nouveau flagelle est inhibée comme attendue. Par contre, l'IFT est absent dans les flagelles matures du mutant *IFT88^{RNAi}* et à l'arrêt chez le mutant *IFT140^{RNAi}*. Des immunofluorescences avec un marqueur de l'axonème montrent qu'il n'y a pas de réduction de la taille du flagelle mature malgré l'absence d'IFT actif. Ces résultats démontrent que l'IFT n'est pas essentiel à la maintenance de la longueur du flagelle chez le trypanosome. Par la suite, l'analyse ultra-structurale des flagelles chez le mutant *IFT88^{RNAi}* et *IFT140^{RNAi}* ne montrent aucune altération visible ni de l'axonème ni de la PFR bien que le battement flagellaire soit fortement réduit. Par conséquent, l'IFT n'est pas nécessaire au maintien de la plupart des constituants de l'axonème après construction du flagelle. La forte réduction de la mobilité suggère que d'autres composants flagellaires pourraient être altérés en l'absence d'IFT. Le flagelle comprend bien d'autres éléments que des protéines structurales. La distribution de trois de ces protéines sont modifiées en absence d'IFT. Il s'agit de la sous unité régulatrice de la protéine kinase A (PKAR), de FLAM8, une protéine concentrée à l'extrémité distale de l'axonème et de la kinésine KIF9B, impliquée dans l'assemblage de la PFR. Ces résultats démontrent que l'IFT n'est pas nécessaire pour le maintien de la longueur du flagelle mature mais contrôle la distribution correcte de plusieurs protéines non structurales.

4.1.2 Intraflagellar transport is required for the maintenance of the trypanosome flagellum composition but not length

Article accepté pour publication dans Journal of Cell Science.

Intraflagellar transport is required for the maintenance of the trypanosome flagellum composition but not length.

Cécile Fort, Serge Bonnefoy, Linda Kohl and Philippe Bastin

RESEARCH ARTICLE

Intraflagellar transport is required for the maintenance of the trypanosome flagellum composition but not its length

Cécile Fort^{1,2}, Serge Bonnefoy¹, Linda Kohl³ and Philippe Bastin^{1,*}

ABSTRACT

Intraflagellar transport (IFT) is required for construction of most cilia and flagella. Here, we used electron microscopy, immunofluorescence and live video microscopy to show that IFT is absent or arrested in the mature flagellum of *Trypanosoma brucei* upon RNA interference (RNAi)-mediated knockdown of IFT88 and IFT140, respectively. Flagella assembled prior to RNAi did not shorten, showing that IFT is not essential for the maintenance of flagella length. Although the ultrastructure of the axoneme was not visibly affected, flagellar beating was strongly reduced and the distribution of several flagellar components was drastically modified. The R subunit of the protein kinase A was no longer concentrated in the flagellum but was largely found in the cell body whereas the kinesin 9B motor was accumulating at the distal tip of the flagellum. In contrast, the distal tip protein FLAM8 was dispersed along the flagellum. This reveals that IFT also functions in maintaining the distribution of some flagellar proteins after construction of the organelle is completed.

KEY WORDS: Intraflagellar transport, Cilia, Flagella, Organelle construction, Organelle maintenance, Trypanosome

INTRODUCTION

Cilia and flagella (which are interchangeable terms) are found at the surface of eukaryotic cells where they perform multiple roles including cellular motility, sensory function, developmental signalling and cell morphogenesis (Drummond, 2012). They share a similar basic structure with an axoneme composed of nine doublets of microtubules surrounded by a specific membrane. During assembly of cilia and flagella, the incorporation of new subunits takes place at the distal end of the organelle. The construction relies on an evolutionary conserved process called intraflagellar transport (IFT), a bi-directional movement of multi-protein complexes between the membrane and the axoneme microtubules (Kozminski et al., 1993). IFT particles or trains (Pigino et al., 2009) are composed of proteins that can be separated into a complex A and a complex B (Cole et al., 1998; Piperno and Mead, 1997). IFT proteins are found along the length of cilia (mature or in construction), but a substantial proportion is also found at the basal body area and in the cell body (Absalon et al.,

2008; Cole et al., 1998; Deane et al., 2001; Pazour et al., 2002). Inside the flagellum, kinesin II (a member of the kinesin-2 family of motors) transports IFT-A and IFT-B complexes, the inactive IFT dynein motor (Blisnick et al., 2014; Hao et al., 2011a; Signor et al., 1999) and axonemal precursors from the base to the tip of flagellum (Craft et al., 2015; Wren et al., 2013). At the tip of the flagellum, axonemal components are delivered for assembly whereas IFT trains are remodelled and returned to the base by the active dynein motor (Buisson et al., 2013; Pedersen et al., 2006).

In agreement with this model, inhibition of IFT blocks the construction of cilia in all species investigated to date, including algae (Kozminski et al., 1995; Pazour et al., 2000), nematodes (Haycraft et al., 2001; Signor et al., 1999), ciliates (Brown et al., 2003, 1999), mammals (Nonaka et al., 1998; Pazour et al., 2002), trypanosomes (Kohl et al., 2003), insects (Lee et al., 2008; Sarpal et al., 2003) or fish (Sun et al., 2004). However, video microscopy has revealed that IFT remains active after assembly of the organelle in many cell types (Buisson et al., 2013; Kozminski et al., 1993; Orozco et al., 1999), implying the existence of functions beyond construction. The temperature sensitive *fla10* *Chlamydomonas* mutant (Huang et al., 1977) was instrumental in revealing a function for IFT in the maintenance of flagellum length in this organism. *FLA10* encodes one of the motor subunits of the heterotrimeric IFT kinesin. At the permissive temperature, IFT takes place and flagella are assembled normally. Once the cells are shifted to the restrictive temperature, IFT ceases and flagella progressively shorten until they eventually disappear (Kozminski et al., 1995). This result was explained by elegant experiments using epitope-tagged tubulin revealing that the tip of the flagellum constantly depolymerizes and that incorporation of fresh tubulin compensates for that phenomenon (Marshall and Rosenbaum, 2001). Hence, IFT would be required to ensure a constant input of tubulin to balance this loss. This does not happen in *fla10* cells grown at the restrictive temperature, supporting a role of IFT in the maintenance of flagellum length (Marshall and Rosenbaum, 2001). However, formal evidence in other organisms is missing, probably because of the difficulty of discriminating cilium assembly from maintenance in mammalian cells or in *C. elegans*.

Here, we used the flagellated protist *Trypanosoma brucei* as a model to investigate the role of IFT in flagellum maintenance. This organism is responsible for sleeping sickness in central Africa but also turned out to be an excellent model to study flagellum biology (Vincensini et al., 2011). It assembles a new flagellum at each cell cycle while conserving the old one (Sherwin and Gull, 1989a), providing the opportunity to compare mature and constructing flagella in the same cell. Its genome contains the full complement of IFT-A, IFT-B, kinesin and dynein genes with the only exception of the kinesin-associated protein (KAP) (Julkowska and Bastin, 2009). IFT has been imaged by tagging multiple IFT-B or dynein subunits and is active during both construction and maintenance. The expression of various components of the IFT-A and IFT-B

¹Trypanosome Cell Biology Unit, INSERM U1201, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, Paris 75015, France. ²Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Cellule Pasteur-UPMC, 25 rue du docteur Roux, Paris 75015, France. ³Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR7245), Sorbonne Universités, Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS; CP52, 61 rue Buffon, Paris 75005, France.

*Author for correspondence (pbastin@pasteur.fr)

 P.B., 0000-0002-3042-8679

complexes has been individually silenced using inducible RNA interference (RNAi), resulting in failure of flagellum construction (Absalon et al., 2008; Adhiambo et al., 2009; Blisnick et al., 2014; Davidge et al., 2006; Franklin and Ullu, 2010; Huet et al., 2014; Kohl et al., 2003). Usually, inhibition of IFT-B proteins (for example IFT88) blocks axoneme construction in agreement with a default in anterograde transport, whereas absence of IFT-A proteins (such as IFT140) leads to formation of short flagella filled with IFT material, indicative of defects in retrograde transport (Absalon et al., 2008).

In all *IFT^{RNAi}* mutants analysed thus far, flagella assembled before RNAi treatment remained present, a phenomenon which has been interpreted as the persistence of IFT proteins and trafficking (Kohl et al., 2003). Indeed, RNAi destroys mRNA and therefore impacts only on new protein synthesis whereas existing proteins disappear according to their own turnover rate (Bastin et al., 2000). However, efficient tools to investigate IFT were not available at the time of these studies. We have since produced a monoclonal antibody against the IFT-B protein IFT172 (Adhiambo et al., 2009) and set up conditions to reliably visualize IFT in trypanosomes (Buisson et al., 2013). Moreover, the development of vectors for *in situ* tagging now allows expression of fluorescent fusion proteins at their endogenous level, an essential condition to monitor IFT in mutant situations (Kelly et al., 2007). Therefore, it is now possible to examine IFT status in mature flagella in an attempt to decipher the role of IFT in flagellum maintenance.

Using transmission electron microscopy (TEM), immunofluorescence assays (IFA) and live video microscopy, we show here that IFT is absent or arrested in old flagella of trypanosome *IFT88^{RNAi}* (anterograde mutant) and *IFT140^{RNAi}* (retrograde mutant), respectively. In these conditions, the old flagellum does not shorten but the distribution of several of its proteins is drastically modified, revealing a key function for IFT in the maintenance of flagellum composition.

RESULTS

The amount of IFT particles is modified in existing flagella of IFT-A and IFT-B mutants

Previous experiments have shown that that depletion of IFT88 by RNAi (denoted as *IFT88^{RNAi}*) blocks axoneme construction in agreement with a default in anterograde transport, whereas absence of IFT140 (denoted *IFT140^{RNAi}*) leads to formation of short flagella filled with IFT material, indicative of defects in retrograde transport (Absalon et al., 2008; Kohl et al., 2003). Here, we investigated the fate of IFT proteins and their trafficking in cells with long flagella that had been assembled prior to RNAi.

The presence of IFT particles in the old flagella of *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells was examined by TEM in non-induced cells and in samples induced for 2 days. In these conditions, less than 10% of the cells still construct a new flagellum and when it happens, this flagellum is very short, rarely extends beyond the flagellar pocket and misses the paraflagellar rod (PFR) (Absalon et al., 2008; Kohl et al., 2003). Therefore, sections through the flagellum in these samples will overwhelmingly correspond to the old flagellum. IFT particles are recognized on flagellum cross-sections as electron-dense granules found between the membrane and the axoneme (Absalon et al., 2008). We examined multiple cross-sections of non-induced RNAi mutants. IFT particles showed a very specific location, being found almost exclusively close to axoneme doublets three and four (Fig. 1A,B,F), and seven and eight (Fig. 1A,E), as previously reported (Absalon et al., 2008). In non-induced control *IFT88^{RNAi}* cells, more than half of the flagellum cross-sections

showed an IFT particle ($n=224$) (Fig. 1I). After 2 days of RNAi induction, this value dropped to less than 30% of sections ($n=222$) (Fig. 1C,D,I). In the case of *IFT140^{RNAi}*, 65% of the cross-sections through flagella in control cells presented IFT particles ($n=177$) (Fig. 1J). After 2 days of induction, ~30% of the sections still contained a single IFT particle ($n=261$). In contrast, close to 60% of sections were characterized by the presence of a large amount of electron-dense material (termed ‘pluri-density’) that could correspond to IFT material (Fig. 1G,H,J). These results suggest that in the absence of IFT88, the number of IFT particles is reduced in the old flagellum whereas in *IFT140^{RNAi}* cells, excessive material is visible.

The distribution of IFT172 is altered in the old flagellum of IFT-A and IFT-B mutants

To firmly correlate the modification in abundance of the electron-dense structures with IFT, an immunofluorescence assay (IFA) was performed on methanol-fixed trypanosomes, using double labelling with MAb25, a monoclonal antibody that recognizes a protein found all along the axoneme (Pradel et al., 2006) and with a monoclonal antibody raised against IFT172, a classic IFT marker (Absalon et al., 2008; Blisnick et al., 2014). MAb25 produced staining along the whole length of the flagellum in both mature flagella (white arrows) and flagella undergoing construction (yellow arrows, Fig. 2A,C). The anti-IFT172 gave punctuate staining along the length of the flagellum and also lit up its base in non-induced *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells (Fig. 2A,C). In *IFT88^{RNAi}* cells induced for 2 days, the majority of cells failed to assemble a new flagellum as revealed by little or no MAb25 signal (yellow arrowhead). Cells that retained the old flagellum only showed an IFT172 signal at the basal body area and very little, if any, signal along the axoneme (Fig. 2B). This result is consistent with the reduced number of IFT trains detected by TEM.

A very different result was obtained when *IFT140^{RNAi}* cells were stained with the same antibodies (Fig. 2D). As expected, induced cells constructed only a short axoneme (short line as MAb25 signal; yellow arrowhead in Fig. 2D) that accumulated IFT172 in agreement with the retrograde transport defect (Absalon et al., 2008). In contrast to *IFT88^{RNAi}*, a strikingly increased signal for IFT172 was observed along the length of the old flagellum (white arrowheads), especially at the distal region (circles, Fig. 2D). This is consistent with the excessive number of visible IFT trains observed by TEM (Fig. 1G,H). We conclude that in the absence of anterograde transport, entry of IFT proteins in the old flagellum is restricted, whereas in the absence of retrograde transport, IFT-B complex proteins accumulate in the persisting flagellum, presumably because of a failure in train recycling.

IFT trafficking is absent or arrested in flagella of IFT-A and IFT-B mutants

IFT is a dynamic process with IFT particles travelling rapidly in both directions inside the flagellum. To monitor IFT in the old flagellum of *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells, they were nucleofected with a plasmid allowing expression of YFP::IFT81 (another component of IFT-B complex) from its endogenous locus (Bhogaraju et al., 2013). Western blot analysis confirmed the expression of YFP::IFT81 at the expected size of 113 kDa. Its total amount was not modified upon IFT88 or IFT140 knockdown (Fig. S1). Observation of live cells in non-induced *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cultures revealed classic IFT trafficking in both new and old flagella. In both cell lines, YFP::IFT81 was concentrated at the flagellar base (Fig. 3A, asterisk) and moved rapidly in both

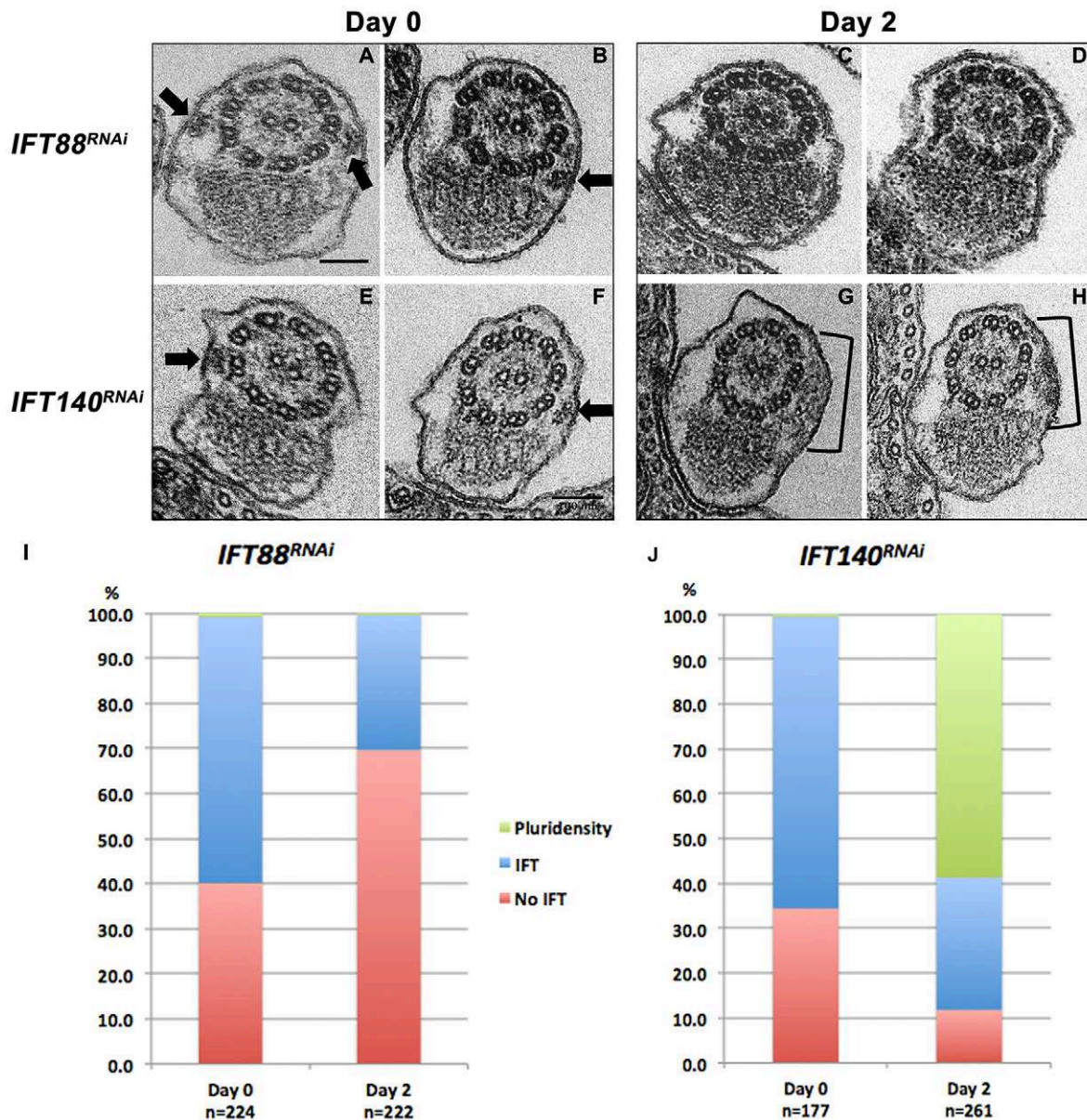


Fig. 1. Abundance of IFT particles in flagella of *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells. Cross-sections through the flagella of *IFT88^{RNAi}* (A–D) or *IFT140^{RNAi}* (E–H) cells. IFT particles are indicated with black arrows. A, B, E, F are non-induced cells whereas C, D, G, H correspond to cells after 2 days in RNAi conditions. IFT particles are frequently detected in non-induced cells but are less commonly encountered in *IFT88^{RNAi}* induced cells. In the absence of *IFT140*, excessively large, dense particles are frequently seen (indicated by bracket, G, H). Scale bar: 100 nm. (I, J) Percentage of IFT particles in cross-sections of *IFT88^{RNAi}* (I) and *IFT140^{RNAi}* (J) cells. In both graphs, the left bar indicates the percentage of sections without (red) or with (blue) an IFT particle, or with excessive material ('pluri-density', green) in non-induced cells. The right bar indicates the results obtained after 2 days of induction. The total number of sections (from two separate experiments) is indicated at the bottom of each graph.

anterograde and retrograde directions in the flagellum (Movies 1 and 3). The movement of IFT trains can be followed on still images (coloured arrowheads on Fig. 3A). Kymograph analysis was performed (an example is shown on the last panel on Fig. 3A) to determine the speed and the frequency of anterograde trains. In the case of *IFT88^{RNAi}* speed was $2.27 \pm 0.72 \mu\text{m/s}$ and train frequency was 0.9/s (mean \pm s.d., $n=271$). For *IFT140^{RNAi}* cells, it was 2.66 ± 0.89 and $0.79/s$ ($n=233$). These values are within the usual range for IFT in trypanosomes (Bhogaraju et al., 2013; Blisnick et al., 2014; Buisson et al., 2013; Huet et al., 2014). In contrast, observation of live *IFT88^{RNAi}* trypanosomes induced for 2 days showed a dramatic reduction in trafficking of IFT trains inside the flagellum (Fig. 3B) (Movie 2). IFT trafficking was not visible, neither on videos nor on

kymographs ($n=28$). In induced live *IFT140^{RNAi}* cells, a bright YFP signal was present along the length of the flagellum especially in the distal region whereas the pool of IFT material at the basal body area was drastically reduced (Fig. 3C). Two different types of profiles could be described, with two thirds of the cells ($n=16$) showing abundant YFP::IFT81 signal along the whole flagellum length with a brighter signal at the distal tip whose intensity varied from one cell to another, with substantial (Movie 4) to spectacular accumulations (Movie 5). In the remaining one third of cells, a continuous gradient of YFP::IFT81 from the distal to the proximal end of flagellum was observed (white bracket, Fig. 3C; Movie 6). No IFT movement could be detected. These results formally show that *IFT88* is essential for the entry of other IFT-B proteins whereas

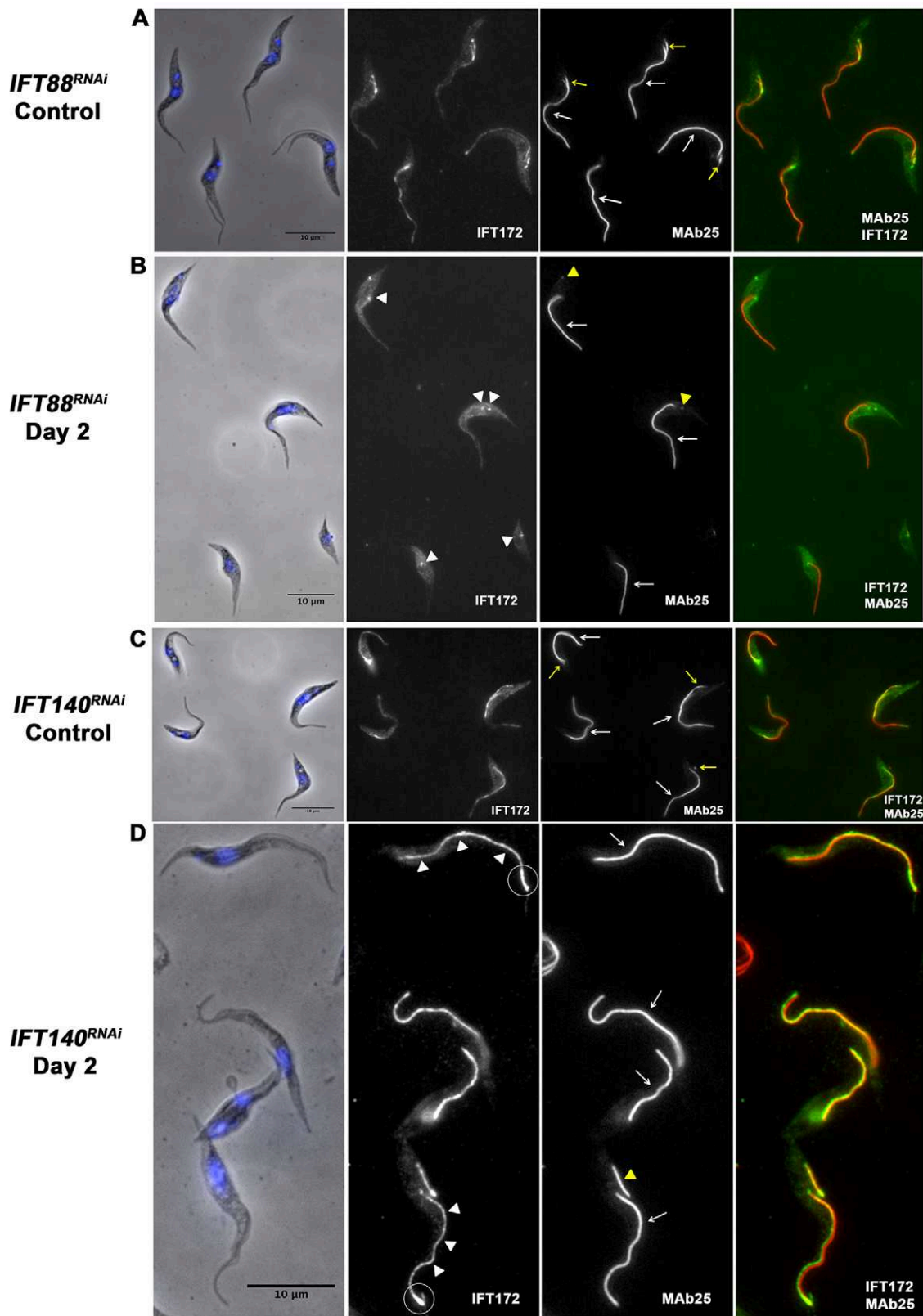


Fig. 2. Localization of IFT172 in trypanosome flagella. *IFT88^{RNAi}* (A,B) and *IFT140^{RNAi}* (C,D) cells fixed in methanol for 5 min and stained with a 1:100 dilution of the anti-IFT172 antibody (green), with a 1:10 dilution of the anti-axoneme MAb25 antibody (red) and with DAPI to reveal nuclear and kinetoplast DNA (blue). Control, non-induced cells for *IFT88^{RNAi}* (A) and *IFT140^{RNAi}* (C). Yellow arrows indicate new flagella and white arrows old flagella. Day 2, cells after 2 days in RNAi conditions. Induced cells for *IFT88^{RNAi}* (B) or *IFT140^{RNAi}* (D) displayed defects in flagellum construction. New flagella were absent in *IFT88^{RNAi}* (yellow arrowheads) whereas they were short and dilated with an excessive amount of IFT172 protein in *IFT140^{RNAi}* (yellow arrowhead). Notice the strongly reduced IFT172 signal in old flagella and the increased signal at the base (white arrowheads) in *IFT88^{RNAi}* cells and the excessive signal in old flagella of *IFT140^{RNAi}* cells (white arrowheads), especially at the distal tip (circles).

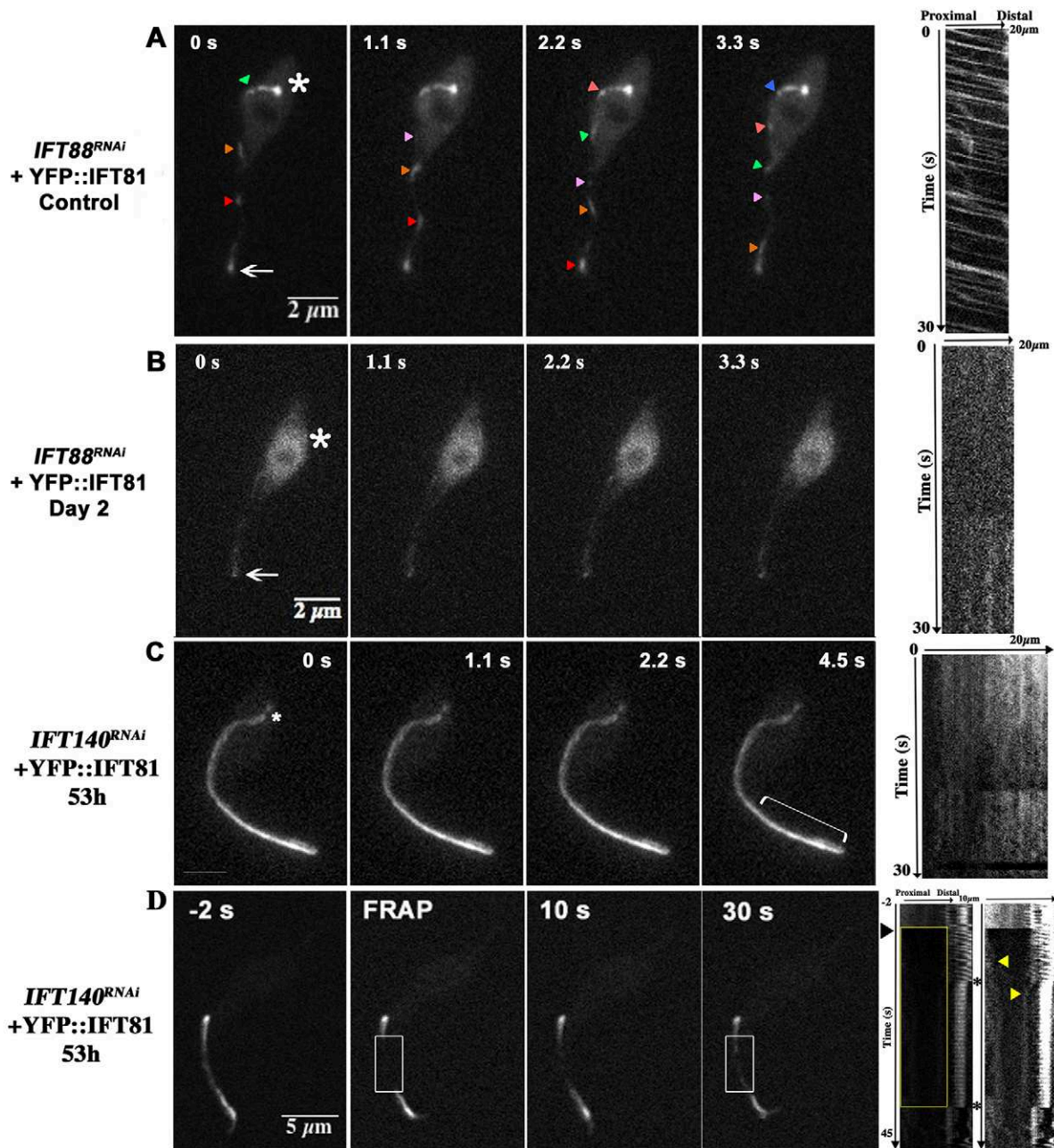


Fig. 3. Intraflagellar movement of YFP::IFT81 is lost in *IFT88^{RNAi}* cells and arrested in *IFT140^{RNAi}* cells. Still images are from movies of *IFT88^{RNAi}* or *IFT140^{RNAi}* cells expressing YFP::IFT81. (A) Anterograde intraflagellar movement of YFP::IFT81 in non-induced *IFT88^{RNAi}* cells (Movie 1). The coloured arrowheads indicate the successive position of several anterograde trains on each image. Time is indicated on top of each image. The right panels show the kymograph analysis. On the first image, the white asterisk indicates the position of the base of the flagellum and the white arrow marks the distal end of the flagellum. (B) After 2 days of induction, *IFT88^{RNAi}* cells display weak YFP::IFT81 signal but no movement of IFT particles could be observed in the flagellum (Movie 2). (C) In induced *IFT140^{RNAi}* cells, the IFT signal forms a continuous gradient along the length of the flagellum from the tip to the base, as indicated by a white bracket on the right image (Movie 4). (D) A bright fluorescent YFP::IFT81 signal is present along the length of the flagellum after 53 h of induction in *IFT140^{RNAi}* cells. A short portion of the flagellum (within the white box) was bleached with a brief laser pulse. The left image represents the fluorescence status before bleaching whereas the second one shows immediately after bleaching, and the two last pictures of the series are extracted from the indicated time series acquisition. The time where bleaching took place is indicated by the black arrowhead. The asterisks indicate movements of the flagella, leading to a shift in signal position. The first image is the regular kymograph whereas the right-hand kymograph is the same where brightness and contrast were enhanced to facilitate visualization of the minor recovery. The striped pattern visible on the right-hand is due to the width of the region of interest that is slightly wider to take into account the movement of the flagellum. After bleaching, low fluorescence gradually returns in the region of interest but does not display IFT-like movement. The yellow arrowheads indicate possible diffusion-like events coming from both ends of the bleached region.

IFT140 is required for the return of IFT particles in already assembled flagella. They also demonstrate that IFT proteins undergo turnover in the mature flagellum, in contrast to what was initially thought (Kohl et al., 2003). This turnover is relatively slow

as it takes hours to be detected, explaining why it had been missed in photobleaching experiments that were focused on a short acquisition period because the IFT cycle in the flagellum takes ~20 s (Buisson et al., 2013).

Absence of IFT trafficking in the *IFT140*^{RNAi} mutant

Typical movement of IFT trains could not be identified in induced *IFT140*^{RNAi} cells. However, trafficking could still take place but be hidden by the intense fluorescent signal. To address this, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments were performed in *IFT140*^{RNAi} cells expressing endogenously tagged YFP::IFT81. Cells were induced and a region of interest in the middle of the flagellum was selected for photobleaching. Only cells with a long flagellum were used to make sure this visualized flagellum indeed corresponded to an old flagellum. The fluorescence recovery was evaluated by continuously recording videos of live cells for 45 s and by kymograph analysis. Two different situations were observed. In 41% ($n=15$) of the videos, the photo-bleached region remained dark and exhibited no detectable recovery, with the fluorescent signal of the region of interest remaining at the background level. Typical IFT trafficking was clearly absent from both video images (Movie 7) and from analysis of the kymograph (data not shown). In the other videos, the photo-bleached region showed very weak recovery ranging from 2 to 9% of the initial signal (after 30 s, Fig. 3D; Movie 8). Kymograph analysis failed to detect typical IFT trafficking, even after enhancing brightness and contrast (Fig. 3D, right-most panel). However, a weak progressive return of fluorescence was detected in the periphery of the region of interest (indicated by yellow arrows on the kymograph, Fig. 3D), more suggestive of a diffusion-like process. These experiments confirm that IFT proteins present in the old flagellum of induced *IFT140*^{RNAi} cells are indeed arrested and do not undergo IFT.

We conclude that in the absence of *IFT88* or *IFT140*, the typical IFT train trafficking along the old flagellum is lost. The silencing of *IFT88* reveals that IFT trains cannot enter in the old flagellum whereas the silencing of *IFT140* demonstrates an accumulation of IFT particles along the length of the flagellum in agreement with a default in train recycling. In both situations, flagella do not display active IFT. This allows us to address the biological significance of IFT trafficking in the mature flagellum.

IFT is not necessary for the maintenance of flagellum length

In the green algae *Chlamydomonas*, IFT trafficking is essential for the maintenance of flagellum length (Kozminski et al., 1995). In the absence of IFT, the axoneme disassembles progressively from its distal end. The average length of the flagellum appears reduced in trypanosome IFT RNAi mutants (Absalon et al., 2008, 2007; Kohl et al., 2003). However, the situation is complex because trypanosomes maintain their flagellum during the whole cell cycle. It is therefore of prime importance to discriminate the consequences of IFT RNAi silencing on construction and maintenance. We therefore examined the cell cycle and the length of the new and the old flagellum during the course of RNAi induction in *IFT88*^{RNAi} cells and *IFT140*^{RNAi} cells. We stained the axoneme with the MAb25 antibody and used DAPI to visualize nuclear and kinetoplast DNA ($n>100$). At the onset of the cell cycle, control trypanosomes possess a single nucleus (N) and a single mitochondrion whose genetic material is concentrated in an organelle named a kinetoplast (K) that is physically linked to the basal body (Robinson and Gull, 1991). The progression of trypanosomes in the cell cycle can be followed by DNA staining as individuals with one kinetoplast and one nucleus (1K1N) are in the G1/S phase, those with two kinetoplasts and one nucleus (2K1N) are in G2/M and cells with two kinetoplasts and two nuclei (2K2N) are about to divide (Sherwin and Gull, 1989a) (see cartoons in Fig. 4A). Flagellum elongation (the growing flagellum is shown

in yellow on all cartoons) starts immediately after basal body maturation and continues at a constant rate of 3–4 $\mu\text{m}/\text{h}$ throughout the rest of the cell cycle (Bastin et al., 1999).

Trypanosome cultures are not synchronized, and cells in all phases of the cell cycle are present. For each cell line, we measured the length of the old and the new flagellum in non-induced cells and early after induction at a time when IFT is aborted in the old flagellum (24 h for *IFT88*^{RNAi} and 48 h for *IFT140*^{RNAi}). In non-induced 1K1N cells, the length of the old flagellum measured using the MAb25 staining was on average 15 μm for *IFT88*^{RNAi} cells (Fig. 4B) and 18 μm for *IFT140*^{RNAi} cells (Fig. 4F). This is a bit shorter compared with wild-type cells (19.5 μm) and is probably explained by RNAi leakiness (Absalon et al., 2007). At the 2K1N stage, the new flagellum can be at different stages of elongation resulting in a large heterogeneity in length as shown by the high dispersion (open red dots, Fig. 4C,G). This dispersion is due to the heterogeneity of this cell cycle stage where the flagellum elongates from 1–2 μm to 15 μm (Sherwin and Gull, 1989a; Subota et al., 2014). The length of the old flagellum (closed red dots) was similar to cells with one flagellum (Fig. 4C,G). The 2K2N stage is a shorter phase preceding cytokinesis where the length of the new flagellum (open red dots) reaches ~80% of that of the old flagellum (Fig. 4D, H) (Robinson et al., 1995; Subota et al., 2014). The length of the old flagellum (closed red dots) was similar to what was observed for the two preceding stages of the cell cycle (Fig. 4D,H). One day after initiation of RNAi in the *IFT88*^{RNAi} strain, construction of the new flagellum was impeded as revealed in 2K1N and 2K2N cells (Fig. 4C,D, open blue dots), in agreement with the essential role of IFT in flagellum construction (Kohl et al., 2003). In contrast, the length of the old flagellum (closed blue dots) was unchanged despite the fact that IFT was absent in these flagella (Fig. 4C,D). These results are summarized in the cartoons presented at Fig. 4E. IFT arrest emerges more slowly in *IFT140*^{RNAi} cells and consequences were examined after 2 days of induction. It revealed interesting data with a mixture of two populations of 1K1N cells with different flagellum lengths. About half of the cells exhibited the same length as non-induced controls whereas the other half displayed much shorter flagella (<5 μm) (Fig. 4F, blue dots). Examination of 2K1N and 2K2N stages (Fig. 4G,H, closed blue dots) showed that these shorter cells are the daughters that inherited a flagellum that was constructed at too short a length due to inhibition of retrograde IFT (Absalon et al., 2008) (Fig. 4G,H, open blue dots). The other half inherited the flagellum that was assembled prior to RNAi inhibition and these showed no reduction in length despite the fact that IFT is arrested (see cartoons at Fig. 4I).

These data confirm that IFT is essential for the construction of the new flagellum as expected, but reveal that IFT is dispensable for maintenance of flagellum length. Indeed, the length of the mature flagellum is not reduced in the absence of IFT trafficking in both mutant cell lines. Given that IFT trafficking requires energy, this raises the question of the role of IFT in the old flagellum. One possible explanation for the persistence of this machinery could be the involvement of IFT in the turnover or the maintenance of flagellar components. To address this question, the fate of different categories of proteins was investigated: (1) skeletal proteins composing the axoneme and the PFR, and (2) non-structural proteins.

IFT is not necessary for the maintenance of skeletal flagellar components but is required for flagellar beating

Flagella are complex organelles made of hundreds of proteins with variable structure, function and localization (Broadhead et al., 2006;

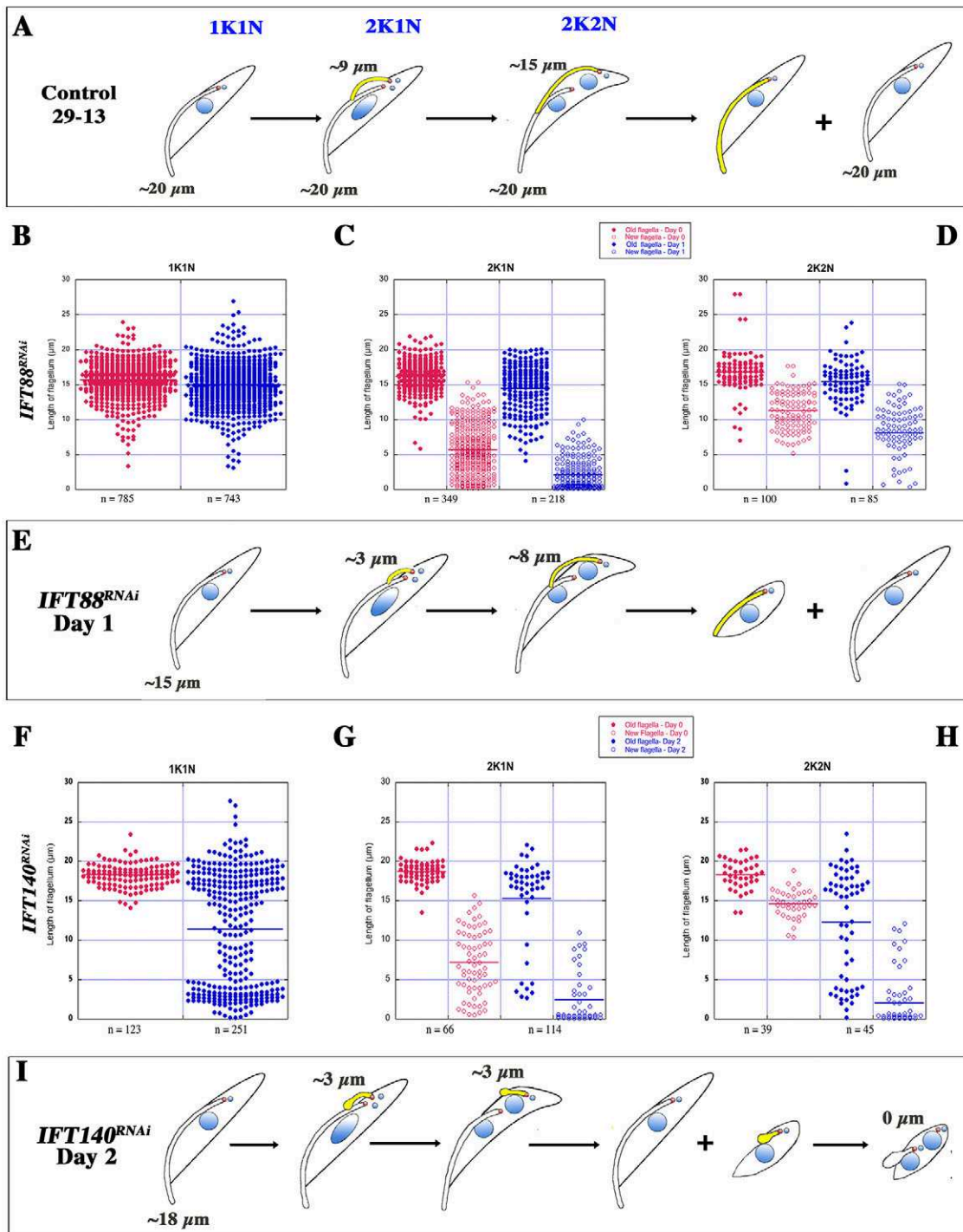


Fig. 4. Flagellum length evolution according to the cell cycle stage in wild-type, *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells. Non-induced (blue) or induced (red) cells were fixed in methanol and stained with the axoneme marker MAb25. (A) A cartoon to illustrate the cell cycle progression of wild-type and 29-13 control trypanosomes. Old and new flagella are shown in white and in yellow, respectively, whereas the basal body is in red and the nuclei and kinetoplasts are coloured in blue. The average length of old and new flagella at the various stages is indicated. The length of the flagellum was measured using the NeuronJ plugin in 1K1N cells (B,F), and the length of both the old (closed circles) and the new (open circles) flagellum was measured in bi-flagellated cells either at the 2K1N (C,G) or the 2K2N (D,H) stage. Number of measured flagella for each sample is indicated at the bottom of each graph. See text for details. Cartoons illustrating the cell cycle progression of *IFT88^{RNAi}* cells (E) and *IFT140^{RNAi}* cells (I) at the indicated time of induction are shown with the same colour code as above.

Oberholzer et al., 2011; Pazour et al., 2005; Subota et al., 2014). To determine the role of IFT trafficking in the maintenance of structural proteins within the old flagellum, we used either endogenous tagging of several typical axoneme or PFR markers or IFA with available antibodies in both *IFT88^{RNAi}* cells and *IFT140^{RNAi}* cells.

First, the hydinin axonemal central pair protein (Dawe et al., 2007; Lechtreck and Witman, 2007) was tagged with GFP, revealing its presence not only all along the flagellum but also in the cell body, as shown by IFA with an anti-GFP antibody (Fig. S2) or by live video microscopy (data not shown). After RNAi induction, cells that had

retained the old flagellum were still positive for hydin with no detectable modification of signal intensity in both cell lines (Fig. S2). A similar result was obtained when using a polyclonal antibody against the intermediate dynein chain (DNAI1) of the outer dynein arm (Duquesnoy et al., 2009): the flagellum signal was unchanged in the old flagella after 2 days of RNAi induction (data not shown).

We next turned our attention to the PFR, a large axonemal structure found alongside the axoneme (Portman and Gull, 2010). One of its main components, the adenylate kinase B protein (AKB) (Pullen et al., 2004) was tagged with YFP and its presence and distribution was investigated in control and induced *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cell lines (Fig. S3). In the non-induced situation, AKB was found in the flagellum but only after its emergence from the cell body at the flagellar pocket level and double staining with the MAb25 axoneme marker confirmed a slightly off set positioning, in agreement with a PFR location (Fig. S3A,C). This pattern was not modified in the old flagella of induced samples (Fig. S3B,D). This was confirmed using a monoclonal antibody against PFR2, one of the major PFR proteins (Kohl et al., 1999) that showed the same fluorescence location and intensity in old flagella of induced samples (data not shown). These data indicate that the presence of structural axoneme and PFR components is not altered in the absence of IFT, in agreement with the apparently normal ultrastructure observed during the TEM analysis (Fig. 1). Therefore, we conclude that IFT is not necessary for the maintenance of these constituents after construction.

These results raise the question of the role of IFT in flagellum motility. Trypanosomes grow in suspension and swim actively in liquid medium (Heddergott et al., 2012). The movement of *IFT140^{RNAi}* cells was quantified in non-induced control conditions and after 3 days of RNAi induction. Non-induced cells exhibited an average speed of $9.8 \pm 2.8 \mu\text{m/s}$ (mean \pm s.d., $n=380$) (Fig. S3E), in the expected range for procyclic trypanosomes in culture (Brasseur et al., 2013). Microscope observation revealed a striking reduction in motility that was confirmed by tracking analysis with an average speed at $2.8 \pm 1.7 \mu\text{m/s}$ ($n=987$, $P < 0.0001$) (Fig. S3F). Barely 1% of the cells displayed the control speed of $9 \mu\text{m/s}$. At this stage, the population is composed of a mixture of trypanosomes that inherited either the flagellum that was assembled before RNAi or the short flagellum that was constructed after RNAi was initiated (Kohl et al., 2003). To discriminate the contribution of each population, immunofluorescence was carried out with the MAb25 axonemal marker. It revealed that $\sim 50\%$ of the induced cells still possessed a flagellum longer than $10 \mu\text{m}$ ($n=125$). Given that cell tracking revealed that 99% of induced *IFT140^{RNAi}* trypanosomes failed to show wild-type motility movement, these data demonstrate that flagellar beating is significantly reduced in the absence of active IFT. As seen above, this is not due to visible structural defects in the peripheral doublet organization, dynein arms or central pair structure (Fig. 1). This motility phenotype could possibly be explained by discrete structural perturbations (dynein regulatory complex, radial spokes) or by modification of non-structural elements.

IFT is required for the correct distribution of non-skeletal flagellar components

The motility phenotype suggests that other flagellar components could be altered in the absence of IFT. Proteomics studies revealed a large number of flagellar proteins that are not strongly associated to the axoneme or the PFR (Oberholzer et al., 2011; Subota et al., 2014). The distribution of three such proteins was investigated.

First, the protein kinase A regulatory subunit (PKAR) has been shown to localize to the flagellum matrix and to contribute to flagellum motility (Oberholzer et al., 2011). Endogenous tagging has been used to determine the presence and location of PKAR. In non-induced *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells, the protein is probably located to the PFR, as shown by the slightly offset signal compared to the MAb25 axoneme marker (Fig. 5A,C). After 2 days of RNAi induction, the signal was decreased in the old flagella of *IFT88^{RNAi}* cells, a phenomenon accompanied by increased signal in the cytoplasm (Fig. 5B). In *IFT140^{RNAi}* cells, the signal for YFP::PKAR in the old flagellum as assessed by IFA using anti-GFP antibodies remained unchanged, but additional cytoplasmic signal was observed after induction (Fig. 5D). These results suggest that IFT could be involved in the distribution of PKAR between the cytoplasm and the flagellum.

We next investigated the location of the KIF9B protein, a kinesin molecular motor involved in the assembly of the PFR that is present along the axoneme and at the base of both old and new flagella (Demonchy et al., 2009). *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells were transfected to express a GFP::KIF9B fusion protein from its endogenous locus. Live-cell analysis revealed the presence of GFP::KIF9B at the flagellum base (circles on figures) and along the flagellum in both cell lines as expected (94% of cells, $n=78$) (Fig. 6A,C). Surprisingly, KIF9B was found concentrated at the distal tip of the old flagellum in the absence of IFT in both *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells (59% of cell, $n=164$) (arrowheads, Fig. 6B,D). The signal appeared as a nicely focused spot at the far end of the axoneme and was confirmed by IFA analysis with an anti-GFP antibody (not shown). We conclude that the correct distribution of KIF9B at the base of the flagellum depends on IFT in mature flagella.

FLAM8 is a protein concentrated at the distal tip of the axoneme whose amount increases during flagellum construction and after cell division (Subota et al., 2014). A rabbit anti-FLAM8 antibody confirmed the distal tip localization in the mature flagellum of control non-induced *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells (Fig. 7A,C). A different picture was obtained 24 h after triggering RNAi: the staining at the tip was less intense and had the tendency to stretch in the proximal direction, and multiple discrete spots appeared along the flagellum (arrowheads, Fig. 7B,D). One-dimensional projection of the flagellum based on the MAb25 marker confirmed the modified distribution pattern (Fig. 7, right panels). These results were reproduced with the anti-GFP antibody in *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells expressing YFP::FLAM8. The distal tip signal was reduced and shifted along the axoneme after 24 h of induction (Fig. S4). We conclude that FLAM8 requires IFT activity to be maintained at the distal tip of the flagellum after assembly. Overall, these results demonstrate that IFT is not necessary for flagellum length maintenance but is required for the correct distribution of several non-structural proteins.

DISCUSSION

IFT is not required for the maintenance of flagellum length

Knockdown of any individual *IFT* gene by inducible RNAi inhibits the construction of the new flagellum but the old flagellum persists during the course of RNAi induction (Kohl et al., 2003). We show here, by a combination of TEM, IFA and video microscopy, that IFT is absent or arrested in the old flagellum (Fig. 8). This is explained if IFT proteins are slowly exchanged between the flagellar and the cytoplasmic compartment. In the case of anterograde mutants, a reduced import of IFT trains would not be sufficient to compensate for those that exit, leading to a progressive depletion of IFT. For

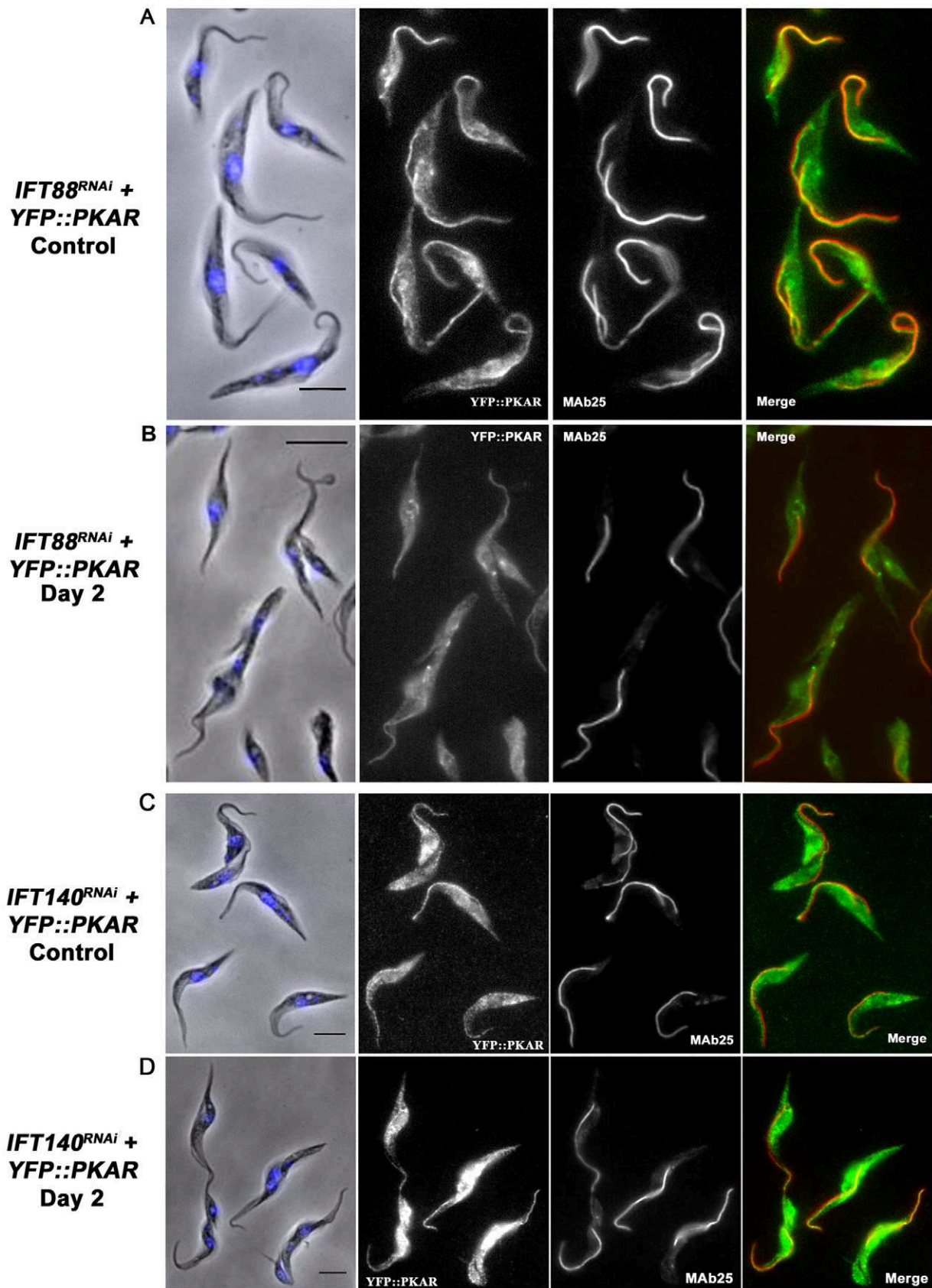


Fig. 5. Visualization of YFP::PKAR protein distribution in *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells. *IFT88^{RNAi}* (A,B) and *IFT140^{RNAi}* (C,D) cells. An IFA was performed using the anti-GFP antibody (white and green in merge), the anti-axoneme MAb25 antibody (white, red in merged panels) and counterstained with DAPI (blue) in the indicated cell lines and conditions. The fusion protein becomes more abundant in the cytoplasm in the induced conditions (Day 2). Control, non-induced cells. Scale bars: 5 μ m.

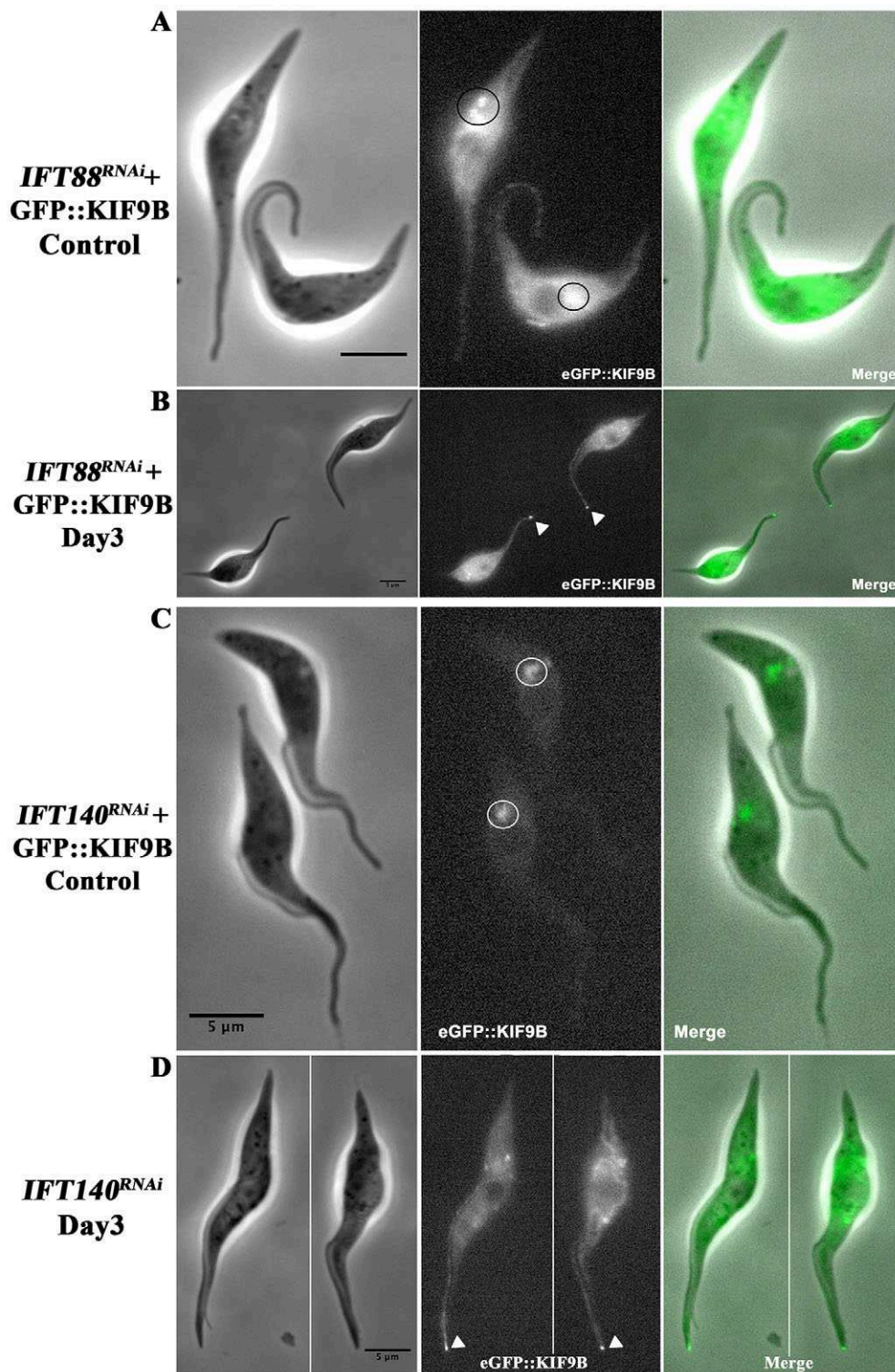


Fig. 6. Visualization of eGFP::KIF9B protein in live *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells. *IFT88^{RNAi}* (A,B) and *IFT140^{RNAi}* (C,D) cells. Images of cells expressing eGFP::KIF9B where circles indicate the base of the flagellum and white arrowheads the tip of flagellum. The left series of images correspond to the phase-contrast image, the second one shows the eGFP::KIF9B signal (white) and the third one shows the merged panels (GFP shown in green). Notice the presence of eGFP::KIF9B at the base of flagellum (circle) in control but at the tip (arrowheads) in induced conditions (Day 3) when IFT becomes inactive. Control, non-induced cells. Scale bars: 5 μ m.

retrograde mutants, a progressive imbalance would emerge between trains that get in and trains that can be recycled, leading to excessive IFT material that cannot traffic anymore.

This loss of IFT activity in mature flagella is not accompanied by flagellum shortening (Fig. 8). Although a reduction of the average flagellum length is observed in trypanosome populations where RNAi has been induced, it is actually explained by the emergence of daughter cells that assembled a new flagellum that was too short. Cells that inherited the long old flagellum remain present, but their

proportion goes down progressively as they are diluted by daughter cells with a shorter flagellum.

To our knowledge, this paper is the first report of a situation where IFT is active in growing and mature flagella but is essential only for construction and not for maintenance of length. This could be explained if the flagellum does not undergo tubulin turnover, presumably because it is never disassembled (see below). Three other situations had been encountered so far in the literature regarding the presence and involvement of IFT in flagellum

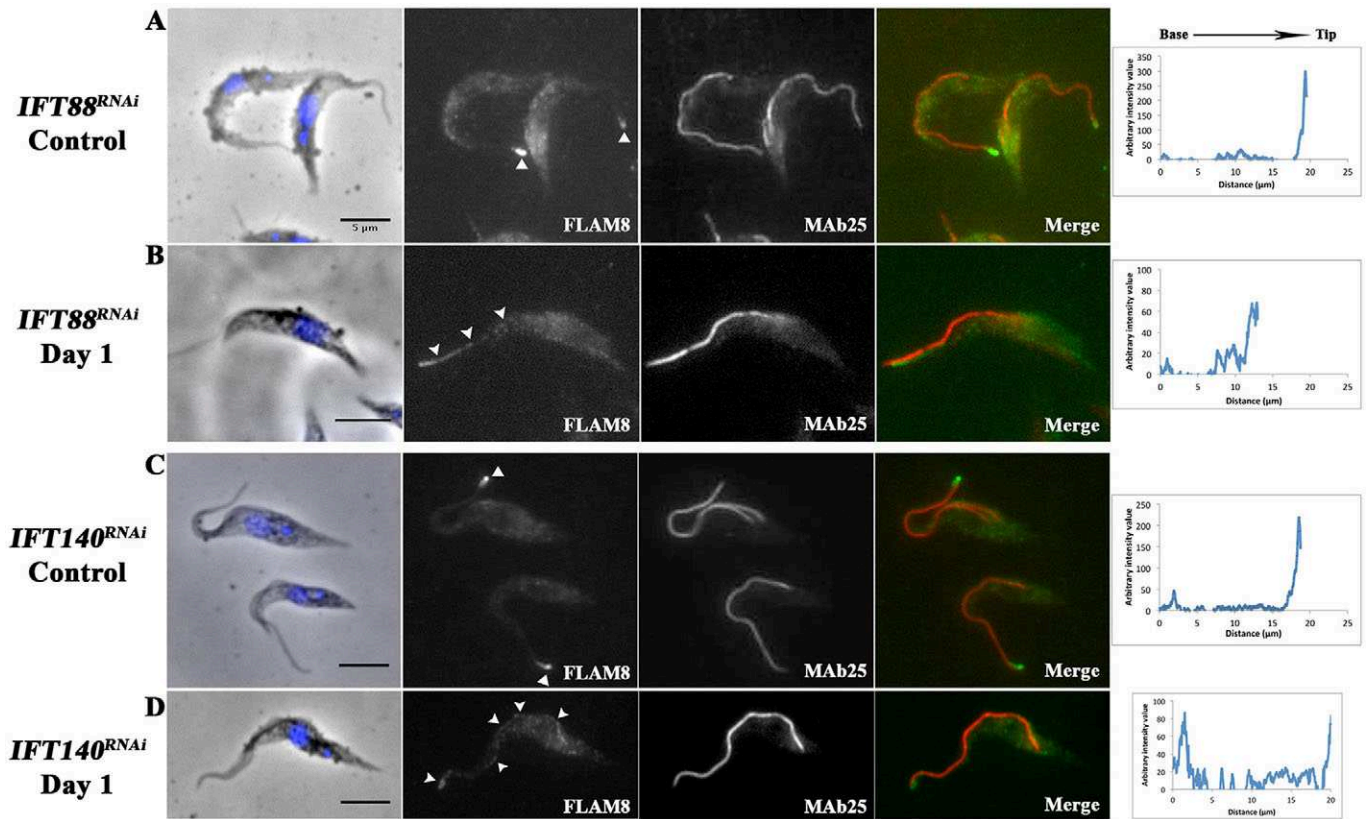


Fig. 7. Visualization of FLAM8::YFP protein in whole *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells. *IFT88^{RNAi}* (A,B) and *IFT140^{RNAi}* (C,D) cells. An IFA was performed using an anti-GFP antibody (white, green in merge), the anti-axoneme MAb25 antibody (white, red in merged panels) and counterstained with DAPI (blue) in the indicated cell lines and conditions. White arrowheads indicate the presence of YFP::FLAM8 protein at the tip of flagella (A,C) or along their length in induced (Day 1) *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells (B,D). Control, non-induced cells. Scale bars: 5 μ m. Right-hand panels, one-axis projections showing the intensity of the signal along the length of the flagellum.

formation and maintenance. First, IFT is active in growing and mature flagella and is essential for construction and maintenance of length. This has formally been proven only in *Chlamydomonas* but often considered as the norm. This makes sense if the organelle undergoes tubulin turnover at its distal end as encountered in *Chlamydomonas* (Marshall and Rosenbaum, 2001) and in *C. elegans* (Hao et al., 2011b). Second, IFT is active and essential only for flagellum construction, but becomes absent once the organelle has matured. This has been reported recently for the flagellum of mouse spermatozoa. IFT proteins are highly abundant during early stages of flagellum construction but are not detected in mature spermatozoa (San Agustin et al., 2015) and inhibition of IFT following absence of the KIF3A motor has severe consequences on flagellum formation (Lehti et al., 2013). This situation is by no means universal for all spermatozoa: for example, substantial amounts of two subunits of the heterotrimeric IFT kinesin II are present in the flagellum of mature spermatozoa in sea urchin and sand dollar (Henson et al., 1997). Third, IFT is absent and obviously not required for flagellum construction when it takes place in the cytoplasm, as reported for *Plasmodium* (Briggs et al., 2004; Sinden et al., 1976) and *Drosophila* (Han et al., 2003; Sarpal et al., 2003). These multiple situations further highlight the need to use different model organisms to study the breath of diversity in cilia and flagella (Morga and Bastin, 2013).

The unique situation reported here for trypanosomes could be explained by closer examination of the biology of the flagellum in this organism. In *Chlamydomonas* and *C. elegans*, IFT is required to bring tubulin to compensate for the continuous turnover that takes

place at the distal end of mature flagella (Craft et al., 2015; Hao et al., 2011b; Marshall and Rosenbaum, 2001). Two pieces of evidence indicate that there is little or no turnover in the skeletal elements of the mature flagellum of *Trypanosoma brucei*. First, tyrosinated tubulin, a marker of recently assembled tubulin, is only encountered at the tip of the new flagellum where immuno-gold staining or IFA displayed a clear gradient from tip to base but virtually no signal in the old flagellum (Sherwin and Gull, 1989; Sherwin et al., 1987). This, however, cannot be investigated directly because tagged tubulin is not incorporated in the trypanosome flagellum (Bastin et al., 1996; Sheriff et al., 2014). Second, inducible expression of an epitope-tagged PFR2 protein, a major component of the PFR (a lattice-like structure associated to the axoneme) (Portman and Gull, 2010) has revealed strong incorporation at the distal region of the new flagellum with only a discrete incorporation all along the old flagellum without any polarity (Bastin et al., 1999). This could well explain the different consequences of the absence of IFT in new and old flagella. When the new flagellum is assembled, tubulin and other flagellar proteins require IFT to be transported to the distal tip; hence IFT inhibition blocks flagellum formation. In the old flagellum, tubulin does not need to be replaced and therefore the loss of IFT does not result in flagellum shortening. This absence of shortening could be due to the sophisticated architecture of the trypanosome flagellum that contains a PFR physically connected to the axoneme and that is attached along most of the length of the cell body via another cytoskeletal structure called the flagellum attachment zone (Sunter and Gull, 2016). Accordingly, when trypanosomes produce developmental stages with a shorter

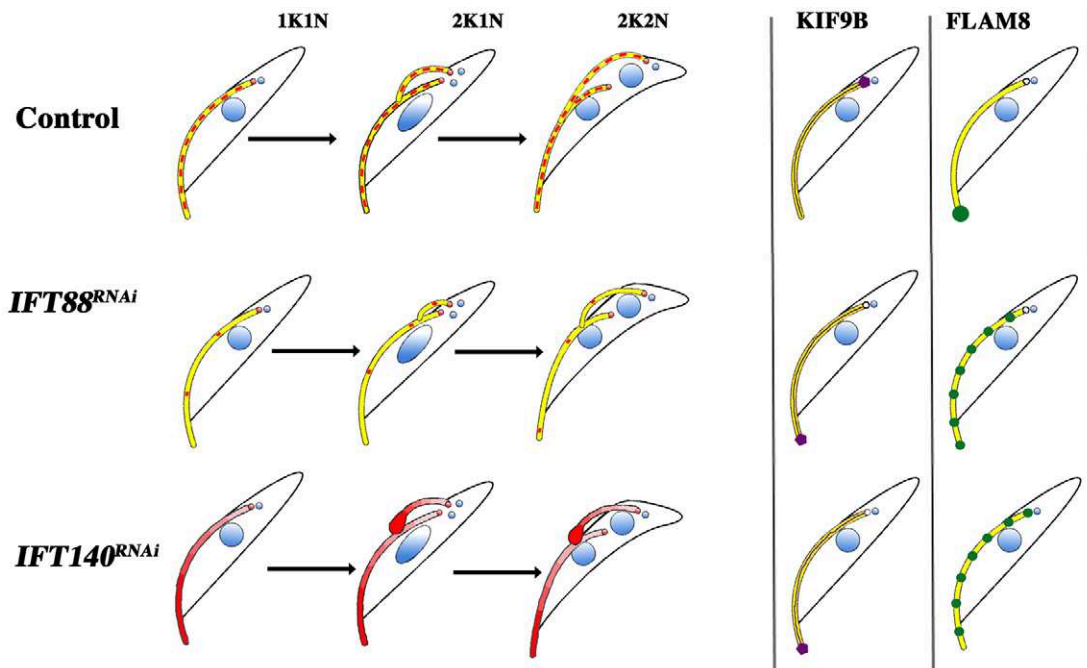


Fig. 8. Absence or arrest of IFT impacts differently on mature or growing flagella. On the left, the situation in each cell cycle stage is indicated for each cell line. The flagellum is shown in yellow, IFT trains are shown in red whereas the nuclei and kinetoplasts are coloured in blue. In the control situation, IFT is active in mature and growing flagellum. Upon RNAi silencing of IFT88, trains become less and less frequent and construction of the new flagellum is slowed down. However, the length of the old flagellum is not affected. Knockdown of IFT140 leads to a failure in train recycling and accumulation of IFT material in both old and new flagella. This interferes with flagellum construction but not with maintenance of the length of the mature flagellum. On the right, the impact of absence or arrest of IFT in the mature flagellum on the distribution of KIF9B (violet) and FLAM8 (green) is shown. IFT trains have not been drawn on these panels for the sake of simplicity.

flagellum length, this is always achieved by mean of an asymmetric division with the construction of a shorter new flagellum and not by shortening an existing flagellum (Ooi and Bastin, 2013; Rotureau et al., 2011; Sharma et al., 2008).

IFT and the maintenance of flagellar components

If IFT remains active in trypanosome flagella after construction, it is likely to fulfil other functions than assembly. One that springs to mind is the maintenance of flagellum components. TEM images show that the structure of the axoneme and of the associated PFR appears normal in the old flagellum of both induced *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells, what is confirmed at the molecular level by the unmodified distribution of hydin, AKB or PFR1 and PFR2. Similar results were obtained in *Chlamydomonas* using metabolic labelling where most axoneme proteins show limited turnover once the flagellum has reached its final length, although the actual contribution of IFT to this process could not formally be demonstrated (Song and Dentler, 2001). Investigation of a temperature-sensitive mutant for the IFT dynein heavy chain in this same organism revealed a twofold and fourfold reduction in anterograde and retrograde IFT frequency, respectively, but flagella maintained their length for ~1 day (Engel et al., 2012), in contrast to the *fla10* mutant where IFT is arrested and flagella are resorbed in 5 h. 2D-difference gel electrophoresis (DIGE) comparative analysis of the composition of such flagella with controls has revealed expected accumulation of several IFT proteins but also perturbations in the amounts of some membrane and matrix proteins, indicating likely functions for IFT in the control of their distribution in mature flagella (Engel et al., 2012).

However, the loss of flagellum beating in the absence of IFT indicates that these flagella are modified. We could identify modifications of the distribution of three non-structural proteins.

The amount of the regulatory subunit of protein kinase A (PKAR) that is normally located in the matrix of the flagellum (Oberholzer et al., 2011) is reduced in the flagellum whereas its concentration in the cytoplasm increases. This is reminiscent of the *Chlamydomonas* aurora-like kinase (CALK) that translocates from the cell body to the flagellum during gamete activation (Pan and Snell, 2000). CALK is resolved as two bands on SDS-PAGE gels, both requiring the activity of the FLA10 kinesin II subunit, one for exclusion from the flagellum and the other one for efficient translocation (Pan and Snell, 2003). Here, we propose that the PKAR shuttles between the cytoplasm and the flagellum in a process that is dependent on IFT. The cytoplasmic and flagellar compartments are separated with a diffusion barrier at the transition zone. This gate would restrict the entry of cytoplasmic molecules on the basis of their size (Kee et al., 2012) and/or shape (Breslow et al., 2013). The PKAR protein (57 kDa) could be too large to enter by diffusion and would require energy to cross the gate. Preliminary FRAP analysis showed that flagellar YFP::PKAR diffuses within the flagellum without displaying typical IFT movement (L. Vincensini and P.B., unpublished data). This suggests that IFT could contribute to the concentration of PKAR in the flagellum, perhaps through a transient association to cross the barrier between the cytoplasm and the flagellar compartment, followed by release and free diffusion inside the flagellum. This can be compared with some membrane ciliary proteins in mammalian cells (Ye et al., 2013) or even some structural components such as DRC4 in *Chlamydomonas* (Wren et al., 2013). In the absence of IFT, the PKAR is still produced in the cytoplasm but it cannot be transported efficiently in the flagellum, hence resulting in an inversion of the flagellum-to-cytoplasm signal ratio.

FLAM8 is a large protein found at the distal tip of the axoneme whose amount increases during flagellum construction, reaching

about half of the concentration found in the mature flagellum at the time of cell division (Subota et al., 2014). We propose that FLAM8 is an IFT cargo that uses anterograde transport to reach the tip where it remains apparently stationary. After cell division, IFT is still active and more FLAM8 can be transported until a plateau is reached when the flagellum becomes mature. In the absence of IFT, FLAM8 proteins present in the old flagellum relocate towards the base, perhaps by diffusion following its concentration gradient (Fig. 8). In a normal situation, anterograde IFT would return these proteins to the distal tip, hence contributing to both constitution and maintenance of the FLAM8 distal location. Such a principle could be applied to other distal tip proteins (Liu et al., 2010; Saada et al., 2014; Woodward et al., 1995) or IFT-independent mechanisms could also exist, as recently shown for the localization of EB1 at the end of flagellar microtubules in *Chlamydomonas* (Harris et al., 2016). The motor action of IFT could hence define a micro-domain at the distal end of the flagellum. This could be important given that trypanosomes swim with the flagellum forward and use the flagellum to attach to the epithelium of the salivary glands during infection in the tsetse fly (Tetley and Vickerman, 1985). Signalling molecules could also be concentrated depending on IFT (Éguether et al., 2014).

KIF9B is present along the axoneme and located at the base of both old and new flagella. In the absence of KIF9B, trypanosomes assemble an apparently normal axoneme but the construction of the PFR is defective: large ‘blocks’ of PFR materials alternate with regions where only the axoneme is present (Demonchy et al., 2009). It has been suggested that the motor activity of KIF9B somehow contributes to the transport of PFR proteins during construction of the structure. We propose that KIF9B walks towards the plus end of flagellum microtubules using its motor activity, perhaps transporting PFR components or other elements necessary for PFR assembly. Once KIF9B reaches the tip of the flagellum, it cannot return by itself and needs retrograde IFT to be recycled to the base. KIF9B would therefore be an IFT cargo but only for retrograde transport. In both mutants where retrograde transport is abolished (directly in *IFT140^{RNAi}* and because of lack of trains in the first place in the *IFT88^{RNAi}* strain), KIF9B would still be able to reach the tip of the flagellum because this would rely solely on its own activity but would not be able to return, resulting in the fluorescent tip signal observed (Fig. 8). This process emerges relatively late (2–3 days after RNAi induction), possibly either because of slow displacement of KIF9B or because only a proportion of KIF9B is motile. This is compatible with the absence of GFP::KIF9B movement in short video acquisitions (Demonchy et al., 2009).

Overall, these data demonstrate that IFT is necessary to create and maintain micro-domains within the flagellum by concentrating or removing specific proteins. IFT activity and association to various cargoes therefore could allow the generation of molecular diversity inside cilia by concentrating (or excluding) sensors, structural elements or other motors. This is relevant for multicellular organisms that produce several types of cilia but also in protists that assemble different types of flagella either in the same cell (Dawson and House, 2010) or in different life cycle stages (Glunz et al., 2010; Rotureau et al., 2012). In addition to protein distribution, IFT could contribute to the transport of other molecules. The lipid composition of flagella appears very different from the rest of the cell membrane (Serricchio et al., 2015) and the fact that IFT trains are in tight contact with the flagellar membrane (Absalon et al., 2008; Kozminski et al., 1993) is intriguing. In conclusion, IFT appears to be a key player in the composition and maintenance of cilia and flagella, in addition to its

well-characterized role in construction. Investigating these functions in different species promises to reveal exciting new features.

MATERIALS AND METHODS

Trypanosome cell lines and cultures

Cell lines used for this work were derivatives of *T. brucei* strain 427 and cultured in SDM79 medium supplemented with hemin and 10% fetal calf serum (Brun and Schonenberger, 1979). The *IFT88^{RNAi}* (Kohl et al., 2003) and *IFT140^{RNAi}* (Absalon et al., 2008) cell lines have been described previously. These cell lines express complementary single-stranded RNA corresponding to a fragment of the *IFT88* or the *IFT140* gene from two tetracycline-inducible T7 promoters facing each other in the pZJM vector (Wang et al., 2000) integrated in the rDNA locus of 29-13 cells that express the T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor (Wirtz et al., 1999). Addition of tetracycline (1 µg/ml) to the medium induces expression of sense and anti-sense RNA strands that can anneal to form double-stranded RNA (dsRNA) and trigger RNAi.

Plasmid construction and transformation in trypanosomes

Genecust Europe (Luxembourg) synthesized the insert *PKAR* (GeneDB number Tb927.11.4610), *RSP9* (Tb927.8.810) and *AKB* (Tb927.10.830) that were then cloned in the p2675 plasmid allowing YFP tagging at the N-terminal end of proteins of interest (Kelly et al., 2007). The gene fragment *PKAR* (1–476 nucleotides relative to the start codon), *RSP9* (1–496 nucleotides) and *AKB* (1–476 nucleotides) were digested with HindIII and ApaI, respectively, and cloned into the corresponding sites of the p2675 vector. Each p2675 construct was linearized with a specific enzyme allowing recombination within the *PKAR* (SgrdI), *RSP9* (BbsI) or *AKB* (NsiI) gene. The eGFP::Hydin fusion contains 1–1200 bp of the hydin gene in frame downstream of the *eGFP* gene in the vector pPCPFRReGFP (Adhiambo et al., 2009). In this vector, the fusion gene is flanked by *PFR1* and *PFR2* intergenic sequences. The vector was linearized by EcoRI and integrated in the hydin endogenous locus, resulting in a reconstructed complete eGFP::Hydin fusion. Plasmids p2675YFPIFT81 (Bhogaraju et al., 2013), pPCPFRReGFPKIF9B (Demonchy et al., 2009) and p3329FLAM8 (Subota et al., 2014) have been described previously.

IFT88^{RNAi} and *IFT140^{RNAi}* cell lines were transfected with the above plasmids by Nucleofector technology (Lonza, Italy) as described previously (Burkard et al., 2007). Transfectants were grown in media with the appropriate antibiotic concentration and clonal populations were obtained by limiting dilution. Cell lines were characterized either by phase contrast or direct fluorescence observation (eGFP or YFP). Cell culture growth was monitored daily with an automatic Muse cell analyser (Merck Millipore, Paris).

Immunofluorescence and live-cell imaging

Cultured parasites were washed twice in SDM79 medium without serum and spread directly onto poly-L-lysine-coated slides. The slides were air-dried for 10 min, fixed in methanol at –20°C for 5 min and rehydrated for 20 min in PBS (Sherwin et al., 1987). For immunodetection, slides were incubated with primary antibodies diluted in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature or at 37°C in a humid chamber. Slides were washed in PBS and appropriate subclass-specific secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Invitrogen), and Cy3 or Cy5 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) were added using a 1:400 dilution in PBS with 0.1% BSA. After 45 min incubation, slides were washed in PBS then 4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) (2 µg/µl) staining of the nucleus and the kinetoplast was performed. Slides were mounted using ProLong antifade reagent (Invitrogen). Samples were observed with a DMI4000 Leica microscope, and images were acquired with a Horca 03G (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) camera. In the case of RNAi mutants, all IFA signals were normalized using the signal obtained in non-induced controls as a reference.

The monoclonal antibody MAb25 (IgG2a) (Pradel et al., 2006), which specifically recognizes the axoneme protein *Trypanosoma brucei* (Tb)SAXO1 (Dacheux et al., 2012), was used as flagellum marker. The IFT complex B IFT172 protein was recognized using anti-IFT172 mouse

monoclonal antibody diluted 1:200 (Blisnick et al., 2014). GFP was observed directly or upon fixation by immunofluorescence using a 1:200 dilution of a rabbit anti-GFP antibody (cat. no. AG455, Invitrogen). FLAM8 was detected using a rabbit polyclonal serum (1:1000 dilution) that was kindly provided by Paul McKean (University of Lancaster, Lancaster, UK).

GFP and YFP visualization on live trypanosomes was performed as described previously (Buisson et al., 2013). IFT videos were acquired using a Zeiss inverted microscope (Axiovert 200; Jena, Germany) equipped with an oil immersion objective (magnification 100× with numerical aperture 1.4) and a spinning disk confocal head (CSU22; Yokogawa, Tokyo, Japan). Images were acquired using Volocity software with an electron-multiplying charge-coupled device camera (C-9100; Hamamatsu) operating in streaming mode. A sample of parasites (6×10^6 to 8×10^6 cells/ml) was taken directly from the culture and trapped between slide and coverslip. The samples were kept at ambient temperature and used for no longer than 30 min. Images were analysed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The NeuronJ plugin was used to measure the flagellum length. Kymograph analysis (Buisson et al., 2013) and cell tracking for motility (Brasseur et al., 2013) were performed exactly as described previously.

FRAP analysis

YFP::IFT81 expression in the *IFT140^{RNAi}* cell line was first observed directly with a DMI4000 Leica microscope using an EL6000 (Leica) or LED light source (Spectra X, Lumencor) for excitation to confirm correct protein expression and localization. For FRAP analysis, a spinning disk confocal head (UltraView Vox, Perkin Elmer) was used. Images were acquired using Volocity software with an EMCCD camera (ImagEM X2, Hamamatsu) operating in streaming mode. A parasite sample from induced *IFT140^{RNAi}* expressing YFP::IFT81 was taken directly from the culture grown at 6×10^6 to 8×10^6 cells/ml and trapped between slide and coverslip. The samples were kept at room temperature and a region of interest was defined within the flagellum. Images were recorded continuously for 5 s before bleaching and then recovery was monitored for 45 s by continuously recording videos with a 100 ms exposure.

Transmission electron microscopy

For TEM, cells were fixed directly in medium during 10 min at room temperature in 2.5% glutaraldehyde (glutaraldehyde 25% stock solution, EM Grade, Electron Microscopy Sciences). Centrifugation was carried out at 4°C for 5 min at 580 g. The supernatant was discarded and the pellet was fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% PFA (paraformaldehyde 32% stock solution, EM Grade, Electron Microscopy Sciences) in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and contrasted with OsO₄ (2%) (Osmium tetroxide 4% Aqueous solution, Electron Microscopy Sciences) in cacodylate buffer. After serial dehydration with ethanol solutions, samples were embedded in Agar 100 (Agar Scientific, UK) and left to polymerize at 60°C for 2 days. Ultrathin sections (50–70-nm thick) were collected on Formvar-carbon-coated nickel grids using a Leica EM UC6 ultra-microtome and stained with uranyl acetate (2%, w/v) (Uranyl Acetate dehydrate, Electron Microscopy Sciences) and lead citrate (80 mM, buffer made in-house). Observations were made on a Tecnai BioTWIN 120 cryo electron microscope (FEI) and images were captured with a MegaView II camera (Arecont Vision, France) and processed with AnalySIS and Adobe Photoshop CS4 (San Jose, CA).

Western blotting

Cells were washed in PBS and pellets were boiled in Laemmli loading buffer before SDS-PAGE separation, loading 20 µg of total cell protein per lane. Proteins were transferred to polyvinylidene fluoride membranes overnight at 4°C under low voltage (25 V). Membranes were blocked with 5% reconstituted skimmed milk in PBS and 0.1% Tween 20 (PBST) and incubated with primary antibodies diluted in 1% reconstituted skimmed milk and PBST. A mixture of two anti-GFP monoclonal antibodies (cat. no. 11814460001, Roche, Life Science) was used to detect YFP and eGFP (1:200 dilution) whereas the anti-BIP was diluted 1:1000 (Bangs et al., 1993) and served as loading control. Three membrane washes were performed with PBST for 5 min. Species-specific secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (GE Healthcare) were diluted 1:20,000 in

PBST containing 1% skimmed milk and incubated for 1 h. Detection was carried out by using an enhanced chemiluminescence assay and the imaging system Pxi (Ozyme, France).

Acknowledgements

We thank Brice Rotureau for help in quantitative analysis of cell motility. We acknowledge Derrick Robinson and Paul McKean for generous gifts of antibodies, and Raphaël Demonchy for preliminary observations of the KIF9B phenotype. We thank Jean-Yves Tinevez (Imagopole) and Gérard Pehau-Arnaudet (Ultrapole) for training and valuable advises for light and electron microscopy, respectively.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

C.F., S.B. and P.B. conceived and designed the experiments; C.F. and S.B. performed the experiments; L.K. contributed reagents, materials and commented on the manuscript; C.F. and P.B. wrote the manuscript.

Funding

This work is supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) [grant numbers 11-BSV8-016, 14-CE35-0009-01]; and from Fondation pour la Recherche Médicale [grant numbers FDT20150532023, Equipe FRM DEQ20150734356]. C.F. is supported by fellowships from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (doctoral school CDV515) and from Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20150532023).

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.188227.supplemental>

References

- Absalon, S., Kohl, L., Branche, C., Blisnick, T., Toutirais, G., Rusconi, F., Cossou, J., Bonhivers, M., Robinson, D. and Bastin, P. (2007). Basal body positioning is controlled by flagellum formation in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* **2**, e437.
- Absalon, S., Blisnick, T., Kohl, L., Toutirais, G., Dore, G., Julkowska, D., Tavenet, A. and Bastin, P. (2008). Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes. *Mol. Biol. Cell* **19**, 929–944.
- Adhiambo, C., Blisnick, T., Toutirais, G., Delannoy, E. and Bastin, P. (2009). A novel function for the atypical small G protein Rab-like 5 in the assembly of the trypanosome flagellum. *J. Cell Sci.* **122**, 834–841.
- Bangs, J. D., Uyetake, L., Brickman, M. J., Balber, A. E. and Boothroyd, J. C. (1993). Molecular cloning and cellular localization of a BIP homologue in *Trypanosoma brucei*. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. *J. Cell Sci.* **105**, 1101–1113.
- Bastin, P., Bagherzadeh, Z., Matthews, K. R. and Gull, K. (1996). A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **77**, 235–239.
- Bastin, P., MacRae, T. H., Francis, S. B., Matthews, K. R. and Gull, K. (1999). Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Mol. Cell Biol.* **19**, 8191–8200.
- Bastin, P., Ellis, K., Kohl, L. and Gull, K. (2000). Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J. Cell Sci.* **113**, 3321–3328.
- Bhogaraju, S., Cajanek, L., Fort, C., Blisnick, T., Weber, K., Taschner, M., Mizuno, N., Lamla, S., Bastin, P., Nigg, E. A. et al. (2013). Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. *Science* **341**, 1009–1012.
- Blisnick, T., Buisson, J., Absalon, S., Marie, A., Cayet, N. and Bastin, P. (2014). The intraflagellar transport dynein complex of trypanosomes is made of a heterodimer of dynein heavy chains and of light and intermediate chains of distinct functions. *Mol. Biol. Cell* **25**, 2620–2633.
- Brasseur, A., Rotureau, B., Vermeersch, M., Blisnick, T., Salmon, D., Bastin, P., Pays, E., Vanhamme, L. and Perez-Morga, D. (2013). *Trypanosoma brucei* FKBP12 differentially controls motility and cytokinesis in procyclic and bloodstream forms. *Eukaryot. Cell* **12**, 168–181.
- Breslow, D. K., Koslover, E. F., Seydel, F., Spakowitz, A. J. and Nachury, M. V. (2013). An in vitro assay for entry into cilia reveals unique properties of the soluble diffusion barrier. *J. Cell Biol.* **203**, 129–147.
- Briggs, L. J., Davidge, J. A., Wickstead, B., Ginger, M. L. and Gull, K. (2004). More than one way to build a flagellum: comparative genomics of parasitic protozoa. *Curr. Biol.* **14**, R611–R612.
- Broadhead, R., Dawe, H. R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S. R., Portman, N., Shaw, M. K., Ginger, M. L., Gaskell, S. J., McKean, P. G. et al. (2006). Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* **440**, 224–227.

- Brown, J. M., Marsala, C., Kosoy, R. and Gaertig, J.** (1999). 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., Fine, N. A., Pandiyani, G., Thazhath, R. and Gaertig, J.** (2003). Hypoxia regulates assembly of cilia in suppressors of *Tetrahymena* lacking an intraflagellar transport subunit gene. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3192-3207.
- Brun, R. and Schonenberger, (1979).** Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop.* **36**, 289-292.
- Buisson, J., Chenouard, N., Lagache, T., Blisnick, T., Olivo-Marin, J.-C. and Bastin, P.** (2013). Intraflagellar transport proteins cycle between the flagellum and its base. *J. Cell Sci.* **126**, 327-338.
- Burkard, G., Fragoso, C. M. and Roditi, I.** (2007). Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **153**, 220-223.
- Cole, D. G., Diener, D. R., Himelblau, A. L., Beech, P. L., Fuster, J. C. and Rosenbaum, J. L.** (1998). *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J. Cell Biol.* **141**, 993-1008.
- Craft, J. M., Harris, J. A., Hyman, S., Kner, P. and Lechtreck, K. F.** (2015). Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism. *J. Cell Biol.* **208**, 223-237.
- Dacheux, D., Landrein, N., Thonnus, M., Gilbert, G., Sahin, A., Wodrich, H., Robinson, D. R. and Bonhivers, M.** (2012). A MAP6-related protein is present in protozoa and is involved in flagellum motility. *PLoS ONE* **7**, e31344.
- Davidge, J. A., Chambers, E., Dickinson, H. A., Towers, K., Ginger, M. L., McKean, P. G. and Gull, K.** (2006). Trypanosome IFT mutants provide insight into the motor location for mobility of the flagella connector and flagellar membrane formation. *J. Cell Sci.* **119**, 3935-3943.
- Dawe, H. R., Shaw, M. K., Farr, H. and Gull, K.** (2007). The hydrocephalus inducing gene product, Hydin, positions axonemal central pair microtubules. *BMC Biol.* **5**, 33.
- Dawson, S. C. and House, S. A.** (2010). Life with eight flagella: flagellar assembly and division in *Giardia*. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 480-490.
- Deane, J. A., Cole, D. G., Seeley, E. S., Diener, D. R. and Rosenbaum, J. L.** (2001). Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr. Biol.* **11**, 1586-1590.
- Demonchy, R., Blisnick, T., Deprez, C., Toutirais, G., Loussert, C., Marande, W., Grellier, P., Bastin, P. and Kohl, L.** (2009). Kinesin 9 family members perform separate functions in the trypanosome flagellum. *J. Cell Biol.* **187**, 615-622.
- Drummond, I. A.** (2012). Cilia functions in development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 24-30.
- Duquesnoy, P., Escudier, E., Vincensini, L., Freshour, J., Bridoux, A.-M., Coste, A., Deschildre, A., de Blic, J., Legendre, M., Montantin, G. et al.** (2009). Loss-of-function mutations in the human ortholog of *Chlamydomonas reinhardtii* ODA7 disrupt dynein arm assembly and cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 890-896.
- Eguether, T., San Agustín, J. T., Keady, B. T., Jonassen, J. A., Liang, Y., Francis, R., Tobita, K., Johnson, C. A., Abdelhamed, Z. A., Lo, C. W. et al.** (2014). IFT27 links the BBSome to IFT for maintenance of the ciliary signaling compartment. *Dev. Cell* **31**, 279-290.
- Engel, B. D., Ishikawa, H., Wemmer, K. A., Geimer, S., Wakabayashi, K.-i., Hirono, M., Craige, B., Pazour, G. J., Witman, G. B., Kamiya, R. et al.** (2012). The role of retrograde intraflagellar transport in flagellar assembly, maintenance, and function. *J. Cell Biol.* **199**, 151-167.
- Franklin, J. B. and Ullu, E.** (2010). Biochemical analysis of PIFT3C3, the *Trypanosoma brucei* orthologue of nematode DYF-13, reveals interactions with established and putative intraflagellar transport components. *Mol. Microbiol.* **78**, 173-186.
- Gluezn, E., Ginger, M. L. and McKean, P. G.** (2010). Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 473-479.
- Han, Y.-G., Kwok, B. H. and Kernan, M. J.** (2003). Intraflagellar transport is required in *Drosophila* to differentiate sensory cilia but not sperm. *Curr. Biol.* **13**, 1679-1686.
- Hao, L., Efimenko, E., Swoboda, P. and Scholey, J. M.** (2011a). The retrograde IFT machinery of *C. elegans* cilia: two IFT dynein complexes? *PLoS ONE* **6**, e20995.
- Hao, L., Thein, M., Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G., Lu, Y., Acar, S., Prevo, B., Shaham, S. and Scholey, J. M.** (2011b). Intraflagellar transport delivers tubulin isotypes to sensory cilium middle and distal segments. *Nat. Cell Biol.* **13**, 790-798.
- Harris, J. A., Liu, Y., Yang, P., Kner, P. and Lechtreck, K. F.** (2016). Single-particle imaging reveals intraflagellar transport-independent transport and accumulation of EB1 in *Chlamydomonas* flagella. *Mol. Biol. Cell* **27**, 295-307.
- Haycraft, C. J., Swoboda, P., Taulman, P. D., Thomas, J. H. and Yoder, B. K.** (2001). The *C. elegans* homolog of the murine cystic kidney disease gene Tg737 functions in a ciliogenic pathway and is disrupted in *osm-5* mutant worms. *Development* **128**, 1493-1505.
- Heddergott, N., Krüger, T., Babu, S. B., Wei, A., Stellamanns, E., Uppaluri, S., Pfohl, T., Stark, H. and Engstler, M.** (2012). Trypanosome motion represents an adaptation to the crowded environment of the vertebrate bloodstream. *PLoS Pathog.* **8**, e1003023.
- Henson, J. H., Cole, D. G., Roesener, C. D., Capuano, S., Mendola, R. J. and Scholey, J. M.** (1997). The heterotrimeric motor protein kinesin-II localizes to the midpiece and flagellum of sea urchin and sand dollar sperm. *Cell Motil. Cytoskeleton* **38**, 29-37.
- Huang, B., Rifkin, M. R. and Luck, D. J.** (1977). Temperature-sensitive mutations affecting flagellar assembly and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **72**, 67-85.
- Huet, D., Blisnick, T., Perrot, S. and Bastin, P.** (2014). The GTPase IFT27 is involved in both anterograde and retrograde intraflagellar transport. *eLife* **3**, e02419.
- Julkowska, D. and Bastin, P.** (2009). Tools for analyzing intraflagellar transport in trypanosomes. *Methods Cell Biol.* **93**, 59-80.
- Kee, H. L., Dishinger, J. F., Blasius, T. L., Liu, C.-J., Margolis, B. and Verhey, K. J.** (2012). A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia. *Nat. Cell Biol.* **14**, 431-437.
- Kelly, S., Reed, J., Kramer, S., Ellis, L., Webb, H., Sunter, J., Salje, J., Marinsek, N., Gull, K., Wickstead, B. et al.** (2007). Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Mol. Biochem. Parasitol.* **154**, 103-109.
- Kohl, L., Sherwin, T. and Gull, K.** (1999). Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**, 105-109.
- Kohl, L., Robinson, D. and Bastin, P.** (2003). Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J.* **22**, 5336-5346.
- Kozminski, K. G., Johnson, K. A., Forscher, P. and Rosenbaum, J. L.** (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5519-5523.
- Kozminski, K. G., Beech, P. L. and Rosenbaum, J. L.** (1995). The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J. Cell Biol.* **131**, 1517-1527.
- Lechtreck, K.-F. and Witman, G. B.** (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* hydin is a central pair protein required for flagellar motility. *J. Cell Biol.* **176**, 473-482.
- Lee, E., Sivan-Loukianova, E., Eberl, D. F. and Kernan, M. J.** (2008). An IFT-A protein is required to delimit functionally distinct zones in mechanosensory cilia. *Curr. Biol.* **18**, 1899-1906.
- Lehti, M. S., Kotaja, N. and Sironen, A.** (2013). KIF3A is essential for sperm tail formation and manchette function. *Mol. Cell. Endocrinol.* **377**, 44-55.
- Liu, W., Apagyi, K., McLeavy, L. and Ersfeld, K.** (2010). Expression and cellular localisation of calpain-like proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **169**, 20-26.
- Marshall, W. F. and Rosenbaum, J. L.** (2001). Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J. Cell Biol.* **155**, 405-414.
- Morga, B. and Bastin, P.** (2013). Getting to the heart of intraflagellar transport using *Trypanosoma* and *Chlamydomonas* models: the strength is in their differences. *Cilia* **2**, 16.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. and Hirokawa, N.** (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**, 829-837.
- Oberholzer, M., Langousis, G., Nguyen, H. T., Saada, E. A., Shimogawa, M. M., Jonsson, Z. O., Nguyen, S. M., Wohlschlegel, J. A. and Hill, K. L.** (2011). Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.010538.
- Ooi, C.-P. and Bastin, P.** (2013). More than meets the eye: understanding *Trypanosoma brucei* morphology in the tsetse. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **3**, 71.
- Orozco, J. T., Wedaman, K. P., Signor, D., Brown, H., Rose, L. and Scholey, J. M.** (1999). Movement of motor and cargo along cilia. *Nature* **398**, 674.
- Pan, J. and Snell, W. J.** (2000). Regulated targeting of a protein kinase into an intact flagellum. An aurora/plp1p-like protein kinase translocates from the cell body into the flagella during gamete activation in *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* **275**, 24106-24114.
- Pan, J. and Snell, W. J.** (2003). Kinesin II and regulated intraflagellar transport of *Chlamydomonas* aurora protein kinase. *J. Cell Sci.* **116**, 2179-2186.
- Pazour, G. J., Dickert, B. L., Vucica, Y., Seeley, E. S., Rosenbaum, J. L., Witman, G. B. and Cole, D. G.** (2000). *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene Tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* **151**, 709-718.
- Pazour, G. J., Baker, S. A., Deane, J. A., Cole, D. G., Dickert, B. L., Rosenbaum, J. L., Witman, G. B. and Besharse, J. C.** (2002). The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J. Cell Biol.* **157**, 103-113.
- Pazour, G. J., Agrin, N., Leszyk, J. and Witman, G. B.** (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol.* **170**, 103-113.
- Pedersen, L. B., Geimer, S. and Rosenbaum, J. L.** (2006). Dissecting the molecular mechanisms of intraflagellar transport in *Chlamydomonas*. *Curr. Biol.* **16**, 450-459.

- Pigino, G., Geimer, S., Lanzavecchia, S., Paccagnini, E., Cantele, F., Diener, D. R., Rosenbaum, J. L. and Lupetti, P.** (2009). Electron-tomographic analysis of intraflagellar transport particle trains in situ. *J. Cell Biol.* **187**, 135-148.
- Piperno, G. and Mead, K.** (1997). Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamydomonas* flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4457-4462.
- Portman, N. and Gull, K.** (2010). The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *Int. J. Parasitol.* **40**, 135-148.
- Pradel, L. C., Bonhivers, M., Landrein, N. and Robinson, D. R.** (2006). NIMA-related kinase TbNRKC is involved in basal body separation in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **119**, 1852-1863.
- Pullen, T. J., Ginger, M. L., Gaskell, S. J. and Gull, K.** (2004). Protein targeting of an unusual, evolutionarily conserved adenylate kinase to a eukaryotic flagellum. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3257-3265.
- Robinson, D. R. and Gull, K.** (1991). Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature* **352**, 731-733.
- Rotureau, D. R., Sherwin, T., Ploubidou, A., Byard, E. H. and Gull, K.** (1995). Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J. Cell Biol.* **128**, 1163-1172.
- Rotureau, B., Subota, I. and Bastin, P.** (2011). Molecular bases of cytoskeleton plasticity during the *Trypanosoma brucei* parasite cycle. *Cell. Microbiol.* **13**, 705-716.
- Rotureau, B., Subota, I., Buisson, J. and Bastin, P.** (2012). A new asymmetric division contributes to the continuous production of infective trypanosomes in the tsetse fly. *Development* **139**, 1842-1850.
- Saada, E. A., Kabututu, Z. P., Lopez, M., Shimogawa, M. M., Langousis, G., Oberholzer, M., Riestra, A., Jonsson, Z. O., Wohlschlegel, J. A. and Hill, K. L.** (2014). Insect stage-specific receptor adenylate cyclases are localized to distinct subdomains of the *Trypanosoma brucei* flagellar membrane. *Eukaryot. Cell* **13**, 1064-1076.
- San Agustín, J. T., Pazour, G. J. and Witman, G. B.** (2015). Intraflagellar transport is essential for mammalian spermiogenesis but is absent in mature sperm. *Mol. Biol. Cell* **26**, 4358-4372.
- Sarpal, R., Todi, S. V., Sivan-Loukianova, E., Shirolkar, S., Subramanian, N., Raff, E. C., Erickson, J. W., Ray, K. and Eberl, D. F.** (2003). *Drosophila* KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails. *Curr. Biol.* **13**, 1687-1696.
- Serricchio, M., Schmid, A. W., Steinmann, M. E., Sigel, E., Rauch, M., Julkowska, D., Bonnefoy, S., Fort, C., Bastin, P. and Butikofer, P.** (2015). Flagellar membranes are rich in raft-forming phospholipids. *Biol. Open* **4**, 1143-1153.
- Sharma, R., Peacock, L., Gluenz, E., Gull, K., Gibson, W. and Carrington, M.** (2008). Asymmetric cell division as a route to reduction in cell length and change in cell morphology in trypanosomes. *Protist* **159**, 137-151.
- Sheriff, O., Lim, L.-F. and He, C. Y.** (2014). Tracking the biogenesis and inheritance of subpellicular microtubule in *Trypanosoma brucei* with inducible YFP-alpha-tubulin. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 893272.
- Sherwin, T. and Gull, K.** (1989a). The cell division cycle of *Trypanosoma brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **323**, 573-588.
- Sherwin, T. and Gull, K.** (1989b). Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell* **57**, 211-221.
- Sherwin, T., Schneider, A., Sasse, R., Seebeck, T. and Gull, K.** (1987). Distinct localization and cell cycle dependence of COOH terminally tyrosinated alpha-tubulin in the microtubules of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* **104**, 439-446.
- Signor, D., Wedaman, K. P., Orozco, J. T., Dwyer, N. D., Bargmann, C. I., Rose, L. S. and Scholey, J. M.** (1999). Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport of IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **147**, 519-530.
- Sinden, R. E., Canning, E. U. and Spain, B.** (1976). Gametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*: a transmission electron microscope study. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **193**, 55-76.
- Song, L. and Dentler, W. L.** (2001). Flagellar protein dynamics in *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* **276**, 29754-29763.
- Subota, I., Julkowska, D., Vincensini, L., Reeg, N., Buisson, J., Blisnick, T., Huet, D., Perrot, S., Santi-Rocca, J., Duchateau, M. et al.** (2014). Proteomic analysis of intact flagella of procyclic *Trypanosoma brucei* cells identifies novel flagellar proteins with unique sub-localization and dynamics. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 1769-1786.
- Sun, Z., Amsterdam, A., Pazour, G. J., Cole, D. G., Miller, M. S. and Hopkins, N.** (2004). A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development* **131**, 4085-4093.
- Sunter, J. D. and Gull, K.** (2016). The Flagellum attachment zone: 'The Cellular Ruler' of trypanosome morphology. *Trends Parasitol.* **32**, 309-324.
- Tetley, L. and Vickerman, K.** (1985). Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat. *J. Cell Sci.* **74**, 1-19.
- Vincensini, L., Blisnick, T. and Bastin, P.** (2011). 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biol. Cell* **103**, 109-130.
- Wang, Z., Morris, J. C., Drew, M. E. and Englund, P. T.** (2000). Inhibition of *trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J. Biol. Chem.* **275**, 40174-40179.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C. and Cross, G. A.** (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**, 89-101.
- Woodward, R., Carden, M. J. and Gull, K.** (1995). Immunological characterization of cytoskeletal proteins associated with the basal body, axoneme and flagellum attachment zone of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **111**, 77-85.
- Wren, K. N., Craft, J. M., Tritschler, D., Schauer, A., Patel, D. K., Smith, E. F., Porter, M. E., Kner, P. and Lechtreck, K. F.** (2013). A differential cargo-loading model of ciliary length regulation by IFT. *Curr. Biol.* **23**, 2463-2471.
- Ye, F., Breslow, D. K., Koslover, E. F., Spakowitz, A. J., Nelson, W. J. and Nachury, M. V.** (2013). Single molecule imaging reveals a major role for diffusion in the exploration of ciliary space by signaling receptors. *eLife* **2**, e00654.

Supplementary data

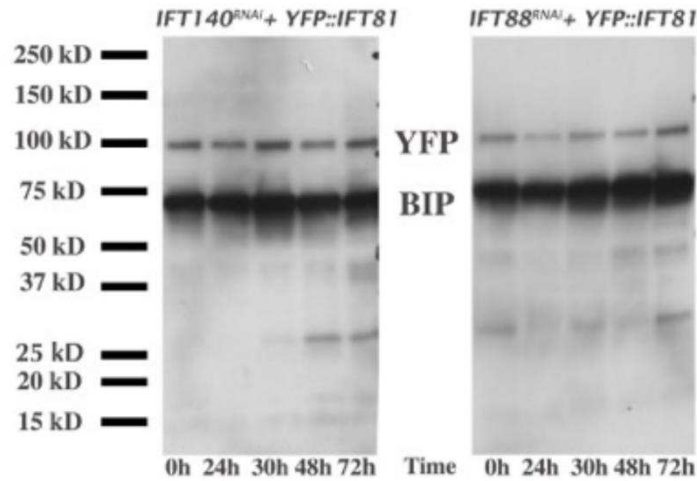


Fig. S1: Western blot showing expression levels of the YFP::IFT81 fusion protein in *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells. Proteins were separated on a 4-12% polyacrylamide gel, transferred and incubated simultaneously with an anti-GFP and the anti-BIP as loading control. Induction times are shown at the bottom. The total amount of YFP::IFT81 (“YFP”, expected molecular weight 113 kDa) follows that of the loading control (“BIP”, expected molecular weight 71 kDa) and is not affected by IFT inhibition. The position of molecular weight markers is indicated on the left. One representative gel out of two is shown.

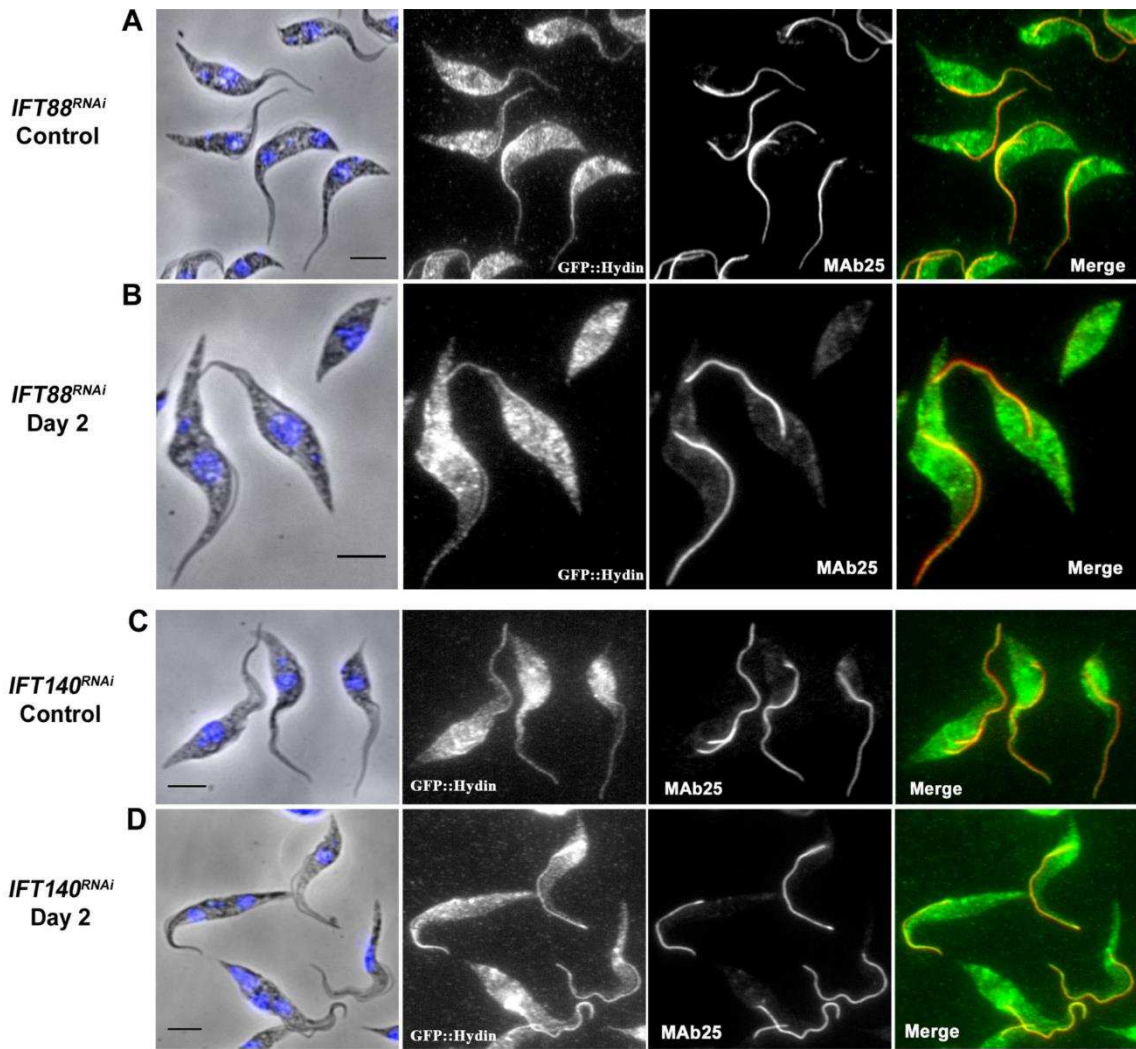


Fig. S2: Visualization of eGFP::Hydin distribution in *IFT88^{RNAi}* (A-B) and *IFT140^{RNAi}* (C-D) cells expressing eGFP::hydin from the endogenous locus. IFA was performed using the anti-GFP antibody to detect the fusion protein (white, green in merged panels), the anti-axoneme MAb25 antibody (red) and counterstained with DAPI (blue) in the indicated cell lines and conditions. The fusion protein is equally present along the whole length of flagellum in both induced and non-induced conditions. Bar, 5 μ m.

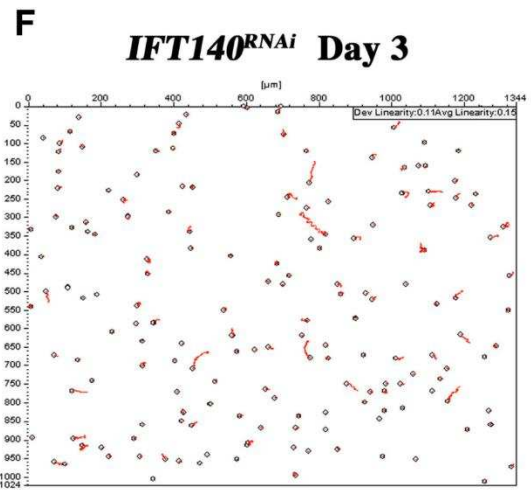
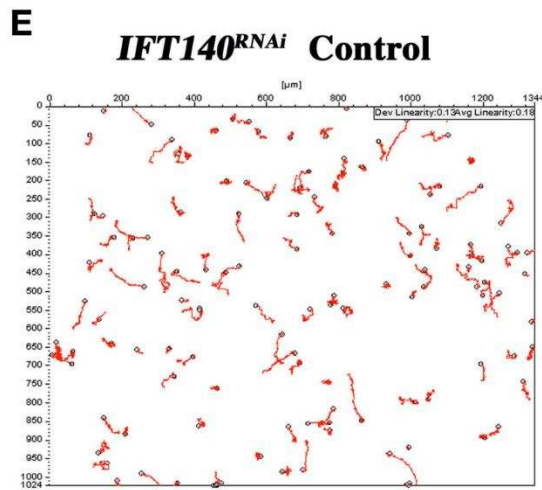
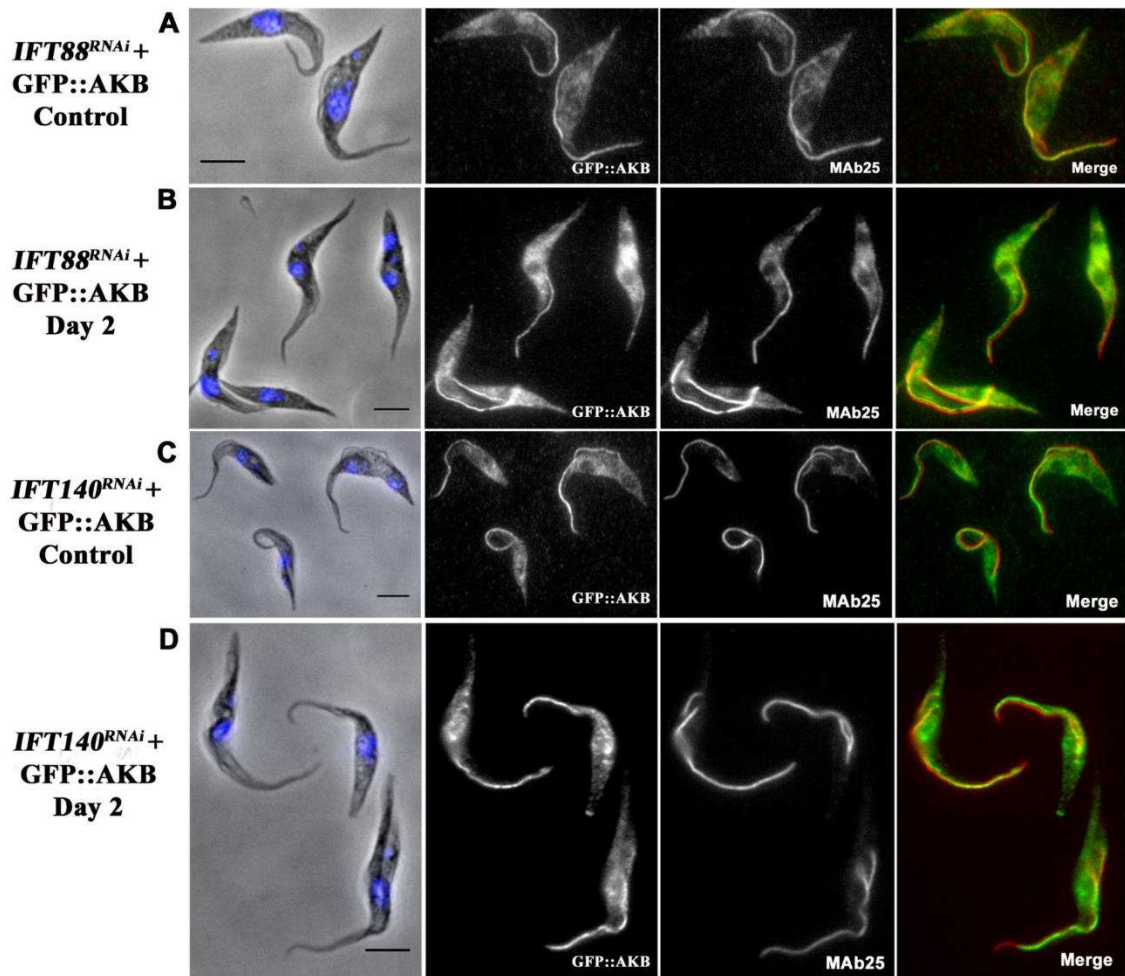


Fig. S3: Visualization of YFP::AKB protein in the old flagellum in *IFT88^{RNAi}* (A-B) and *IFT140^{RNAi}* (C-D) cells. Trypanosomes have been fixed in methanol and stained with the anti-GFP antibody (white, green in merged panels), the anti axoneme MAb25 antibody (white, red in merged panels) and DNA was stained with DAPI (in blue). YFP::AKB protein is slightly shifted from the axoneme signal as expected for a PFR protein. The fusion protein is equally present along the length of the PFR in both induced and non-induced conditions. Bar, 5 μ m.

(E-F) Motility is arrested in induced *IFT140^{RNAi}* cells. Velocities of control non-induced (left) and 3-day induced (right) *IFT140^{RNAi}* cells were monitored by cell tracking. Most cells showed little or no movement in the induced conditions (right) whereas sustained motility was observed in the control (left).

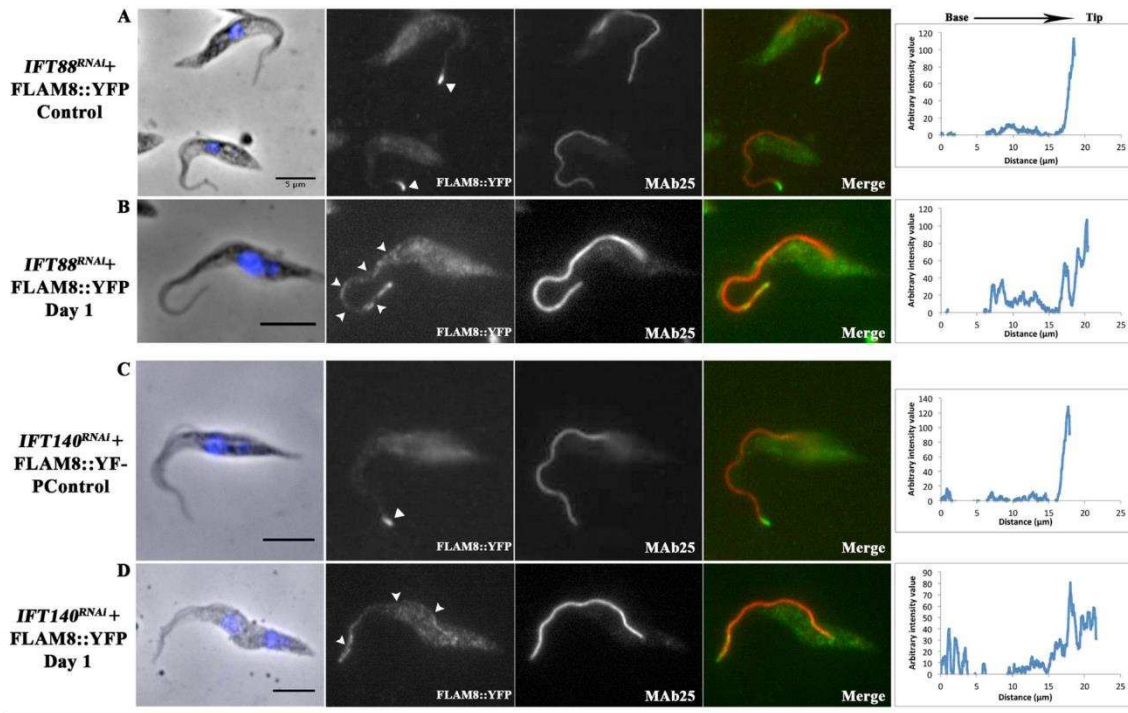


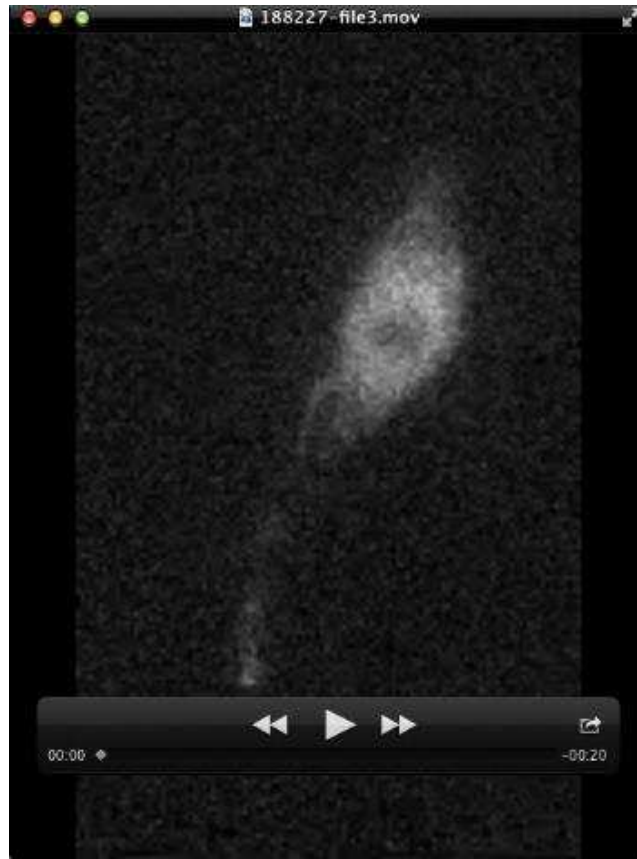
Fig. S4: Visualization of FLAM8 in whole *IFT88^{RNAi}* (A-B) and *IFT140^{RNAi}* (C-D) cells. IFA was performed using a rabbit anti-FLAM8 antibody (white and green in merge), the anti axoneme MAb25 antibody (white, red in merged panels) and counterstained with DAPI (blue) in the indicated cell lines and conditions. White arrowheads indicate the presence of FLAM8 at the tip of flagella (A, C) or along their length in induced *IFT88^{RNAi}* and *IFT140^{RNAi}* cells (B, D). Bar, 5 μm . Right, one-axis projections show the intensity of the signal along the length of the flagellum.



Movie S1: Visualisation of YFP::IFT81 in non-induced *IFT88^{RNAi}* cells.

Live, time-lapse fluorescence microscopy of YFP::IFT81 in non-induced *IFT88^{RNAi}* cells.

Robust IFT is visible. All acquisitions were made at room temperature with frames taken every 100 ms for 30 sec. Videos were exported to .AVI format with the ImageJ 1.47e software.



Movie S2: Visualisation of YFP::IFT81 in *IFT88^{RNAi}* cells after two days of induction.

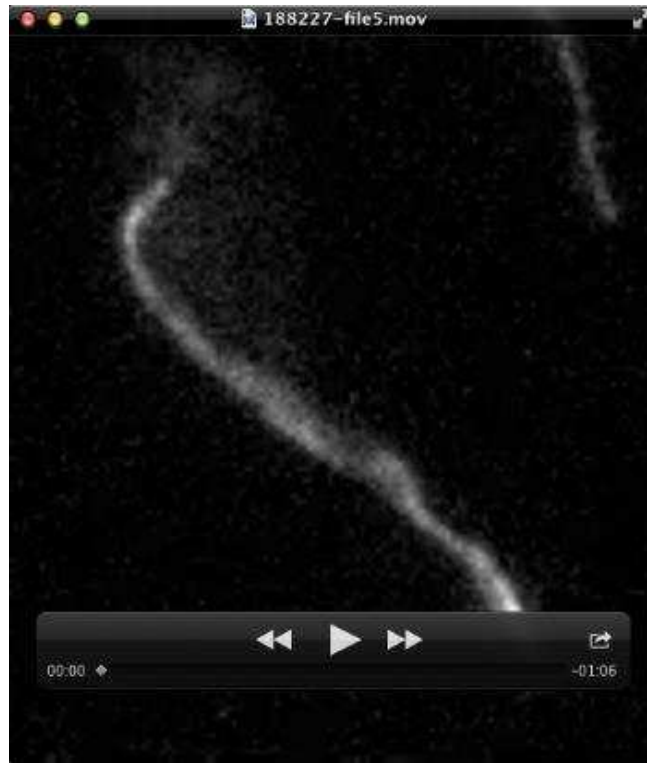
Live, time-lapse fluorescence microscopy of induced YFP::IFT81 in *IFT88^{RNAi}* cells. No trafficking is detected. All acquisitions were made at room temperature with frames taken every 100 ms for 30 sec.



Movie S3: Visualisation of YFP::IFT81 in non-induced *IFT140^{RNAi}* cells.

Live, time-lapse fluorescence microscopy of non-induced YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells.

Robust IFT is visible. All acquisitions were made at room temperature with frames taken every 100 ms for 30 sec.



Movie S4: Visualisation of YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells after 53h of induction.

Live, time-lapse fluorescence microscopy of induced YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells. IFT signal accumulates towards the end of the flagellum. All acquisitions were made at room temperature with frames taken every 100 ms for 30 sec.



Movie S5: Visualisation of YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells after 53h of induction.

Live, time-lapse fluorescence microscopy of induced YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells. IFT signal strongly accumulates towards the end of the flagellum. All acquisitions were made at room temperature with frames taken every 100 ms for 30 sec.



Movie S6: Visualisation of YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells at 53h of induction.

Live, time-lapse fluorescence microscopy of induced YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells. A gradient of IFT signal is observed from the tip to the base of the flagellum. All acquisitions were made at room temperature with frames taken every 100 ms for 30 sec.



Movie S7: Visualisation of YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells after 53h of induction.

Live, time-lapse fluorescence microscopy of induced YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells following photobleaching (time 5s). All acquisitions were made at room temperature with frames taken every 100 ms for 30 sec.



Movie S8: Visualisation of YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells after 53h of induction.

Live, time-lapse fluorescence microscopy of induced YFP::IFT81 in *IFT140^{RNAi}* cells following photobleaching (time 5s). All acquisitions were made at room temperature with frames taken every 100 ms for 30 sec.

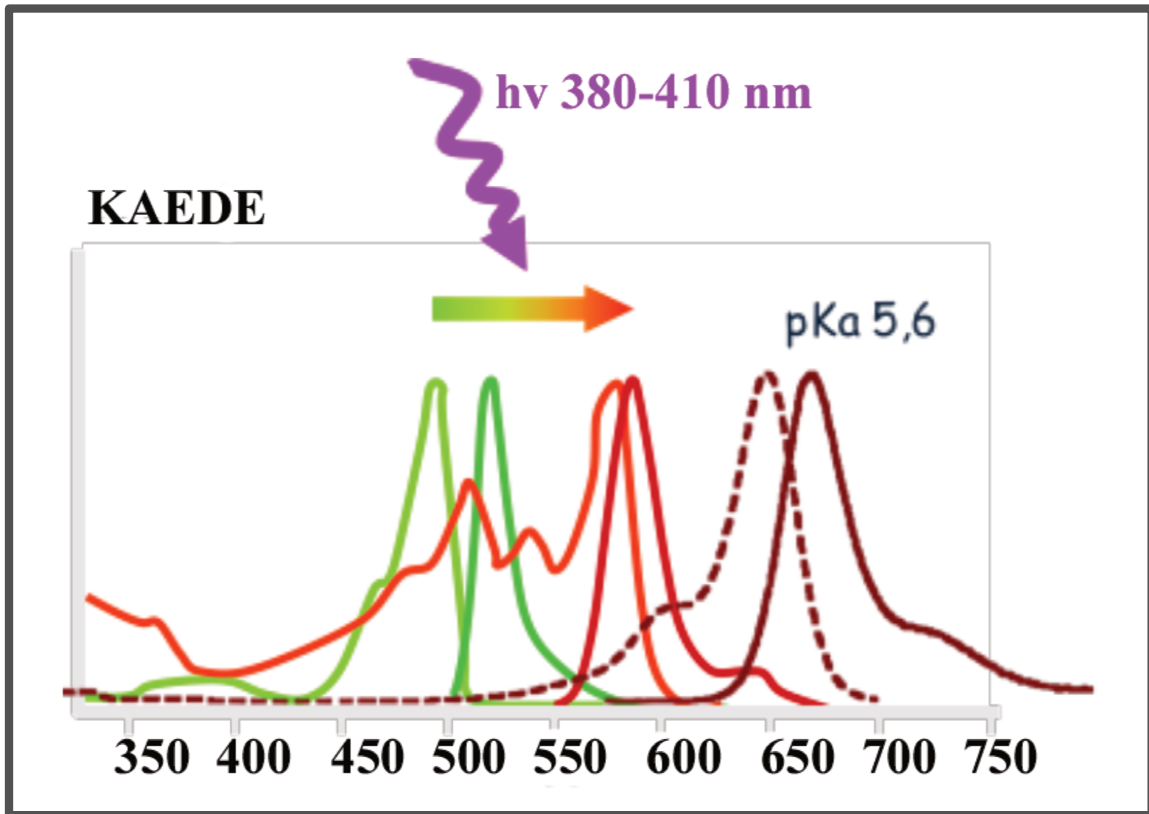


Figure 31 : Schéma de photoconversion de la KAEDE

Avant photoconversion, la protéine KAEDE a une longueur d'onde d'absorption à 508 nm. Quand elle est excitée à 480 nm (courbe verte fluorescente), l'émission de la fluorescence est à 518 nm (courbe verte). Lorsque la protéine KAEDE est irradiée par un pulse laser UV ou violet, il y a un changement du pic d'absorption à 572 nm. Dans ces conditions, quand la protéine est excitée à 572 nm (courbe rouge clair), son pic d'émission est à 582 nm avec un épaulement à 627 nm (courbe rouge foncé).

Figure de Brown S, non publiée.

4.2 Recyclage des protéines IFT et échange avec le cytoplasme

Matériels & Méthodes :

Cells

Toutes les cellules utilisées pour ce travail sont dérivées de la souche 427 de *T. brucei* et ont été cultivées dans le milieu de culture SDM79 complété avec de l'hémine (1,5%) et du sérum de veau fœtal (10%) (Brun and Schonenberger 1979).

Pour ce projet, Genecust Europe (Luxembourg) a synthétisé l'insert KAEDE (Ando, Hama et al. 2002) qui a été cloné entre les sites HindIII et XhoI du vecteur p2675IFT81 (Bhogaraju, Cajanek et al. 2013). Le plasmide a été digéré avec l'enzyme XcmI et nucléofecté dans les trypanosomes de type sauvage, ce qui conduit à l'intégration par recombinaison homologue dans le locus endogène d'*IFT81*. Les cellules ont été cultivées dans un milieu approprié avec de la puromycine à une concentration de 1 µg/mL. Les lignées cellulaires ont été caractérisées par l'observation directe de la fluorescence (Kaede). La croissance des cellules a été contrôlée quotidiennement avec le compteur cellulaire Muse (Merck Milipore, Paris).

Photoconversion d'une population

La photoconversion d'une population cellulaire a été réalisée pendant 5 min sur un microscope inversé Leica (DMI6000B) en enlevant l'objectif pour assurer la photoconversion totale d'une culture cellulaire de 5 mL qui a été placée dans une petite boîte à Pétri de 90 mm de diamètre. La lumière de basse longueur d'onde (lampe à mercure, filtre DAPI : 350-450 nm) a été utilisée pour la photoconversion et l'ensemble de la population a été photoconvertie du vert au rouge de façon irréversible (Figure 31), alors que les cellules non irradiées présentes dans une seconde flasque sont restées vertes. Les cellules sont ensuite montées entre lame et lamelle et imagées par microscopie de fluorescence à disque rotatif en utilisant un objectif à immersion x100 d'ouverture 1,4. Le cycle de l'IFT est enregistré à température ambiante pendant 30 sec à une vitesse maximale d'acquisition et à une exposition de 100 ms pour le canal vert et de 500 ms pour le canal rouge. La protéine Kaede verte a un pic d'émission compris entre 500 et 528 nm pour une excitation à 488 nm. Après photoconversion de la région d'intérêt sous UV à 405 nm, la protéine Kaede rouge présente un pic d'émission à 582 nm pour une excitation à 540 nm.

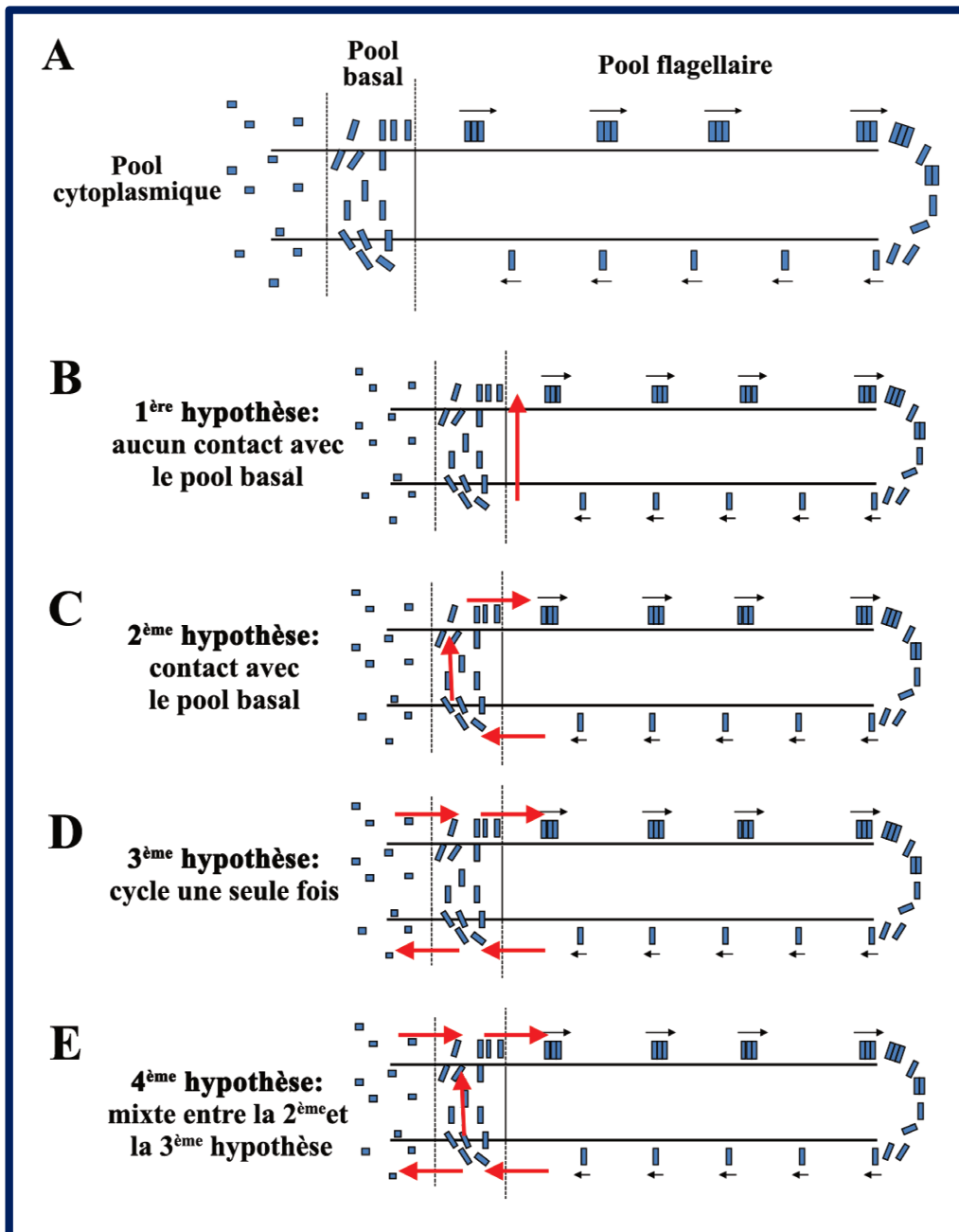


Figure 32 : Localisation des pools de protéines IFT dans le flagelle et proposition de schémas pour le recyclage des trains rétrograde

- A) Schéma représentant la répartition des trois pools de protéines IFT dans la cellule : on retrouve le pool cytoplasmique, le pool basal et le pool flagellaire.
- B) Dans le premier modèle, les protéines des trains IFT rétrogrades sont recyclés directement en trains antérogrades et n'entrent pas en contact avec le pool basal.
- C) Dans le second modèle, les protéines des trains rétrogrades se mélangent au pool basal et les protéines des trains rétrogrades sont recyclées pour un second cycle.
- D) Dans le troisième modèle, les protéines des trains rétrogrades subissent un unique cycle dans le flagelle et sont aussitôt dégradées dans le cytoplasme.
- E) Dans le dernier modèle, certains trains IFT voyagent une seule fois tandis que d'autres sont recyclés.

Photoconversion d'une région d'intérêt

Pour les expériences de photoconversion sur des zones localisées, les cellules ont été montées entre lame et lamelle et observées par microscopie de fluorescence à disque rotatif à température ambiante. Des séquences de time-lapse ont été acquises dans le canal vert (488 nm) à une exposition de 200 ms par image et dans le canal jaune (525 nm) à une exposition de 500 ms par image. Les films ont été pris à une vitesse maximale d'acquisition. L'enregistrement de chaque film a été fait sur un total de 50 sec : les 5 premières secondes sont allouées à l'enregistrement de la fluorescence verte puis le pulse laser UV vient photoconvertir la région d'intérêt. Dans cette étude, la zone d'intérêt est définie au niveau de la base du flagelle. Ensuite, la fluorescence dans les deux canaux (vert et rouge) est enregistrée simultanément de façon continue pendant 45 secs. Pour ce faire, un dispositif optique divise le faisceau de lumière en deux parties : chaque partie est alors collectée par des caméras EMCCD indépendantes (ImagEM X2, Hamamatsu).

Introduction :

Le transport intraflagellaire est détecté après couplage entre une protéine fluorescente et un composant du complexe IFT-A/B ou des sous unités du moteur dynéine responsable du transport rétrograde ((Absalon, Blisnick et al. 2008) ; (Buisson, Chenouard et al. 2013) ; (Blisnick, Buisson et al. 2014) ; (Huet, Blisnick et al. 2014)). En absence de ribosomes, les protéines IFT sont synthétisées dans le cytoplasme. Une fois synthétisées, les protéines IFT doivent être concentrées au corps basal. Une fois à la base du flagelle, les trains antérogrades se forment, entrent dans le cil et voyagent jusqu'à son extrémité distale. A ce moment, les trains antérogrades sont convertis en trains rétrogrades. On peut donc définir 3 pool de protéines IFT : cytoplasmique, basal et flagellaire (Figure 32A) ((Cole, Diener et al. 1998) ; (Pazour, Baker et al. 2002) ; (Deane, Cole et al. 2001) ; (Absalon, Blisnick et al. 2008)).

Pour comprendre le recyclage des protéines IFT et les échanges possibles avec le cytoplasme, la surexpression des protéines du transport intraflagellaire a été développée au laboratoire (Absalon, Blisnick et al. 2008) et permet de visualiser en temps réel leur localisation et leur déplacement à l'intérieur du cil. Une fois le cycle du transport effectué, les protéines présentes dans les trains rétrogrades regagnent la base du flagelle. Les protéines IFT pourraient alors être recyclées pour construire de nouveaux trains antérogrades ou échanger avec les protéines IFT cytoplasmiques ou encore être détruites. Plusieurs hypothèses concernant leur

recyclage sont proposées (Figure 32B-E). Commençons par le cas le plus simple : le pool flagellaire cycle en permanence à l'intérieur du flagelle, sans aucun échange avec le pool basal (Figure 32B). Dans le second cas, les protéines IFT issues du transport rétrograde échangent avec le pool basal et subissent un recyclage au niveau de la zone de transition ou des fibres de transition (Figure 32C). Dans le troisième cas, les protéines IFT réalisent un seul cycle dans le flagelle pour être aussitôt dégradées au niveau du cytoplasme (Figure 32D). Enfin, un mélange de l'ensemble des deux dernières hypothèses peut être aussi envisagé (Figure 32E).

Afin de comprendre comment sont recyclées les protéines IFT, des expériences de FRAP à la base du flagelle ont été réalisées au laboratoire et le modèle proposé suggère qu'une partie des protéines IFT reviennent du flagelle et sont mélangées avec celles qui sont présentes à la base de l'organite pour réintégrer la structure flagellaire. Après photoblanchiment, le taux de récupération à la base du flagelle est analysé sur une modélisation mathématique. Cette modélisation est d'abord basée sur un concept de recyclage où les protéines IFT issues des trains rétrogrades sont mélangées avec les protéines présentes dans le pool à la base du flagelle, sans aucune contribution avec les protéines du corps cellulaire. Le modèle le plus simple propose que l'ensemble des protéines du stock IFT à la base du flagelle est mobilisé pour participer au transport intraflagellaire du flagelle. La forme de la courbe de récupération de fluorescence indique que le pool basal représente 45 % du total et est recyclé en contribuant à la formation de nouveaux trains IFT antérogrades (Buisson, Chenouard et al. 2013). Toutefois, ces expériences ne permettent pas de distinguer le matériel recyclé du matériel néo-synthétisé. L'utilisation de protéine photoconvertible est alors un bon procédé pour tenter d'apporter de nouveaux éléments de réponse à cette question puisqu'il sera possible de distinguer les protéines photoconverties des protéines nouvellement synthétisées ou recyclées. Nous présentons ici des données préliminaires qui ouvrent quelques pistes de réponse.

Résultats

Photoconversion d'une population

L'expression de la protéine de fusion Kaede::IFT81 à partir du locus d'*IFT81* est d'abord vérifiée au microscope à fluorescence. Afin de s'assurer que la photoconversion de la protéine est possible, une population de parasites est photoconvertie de manière globale.

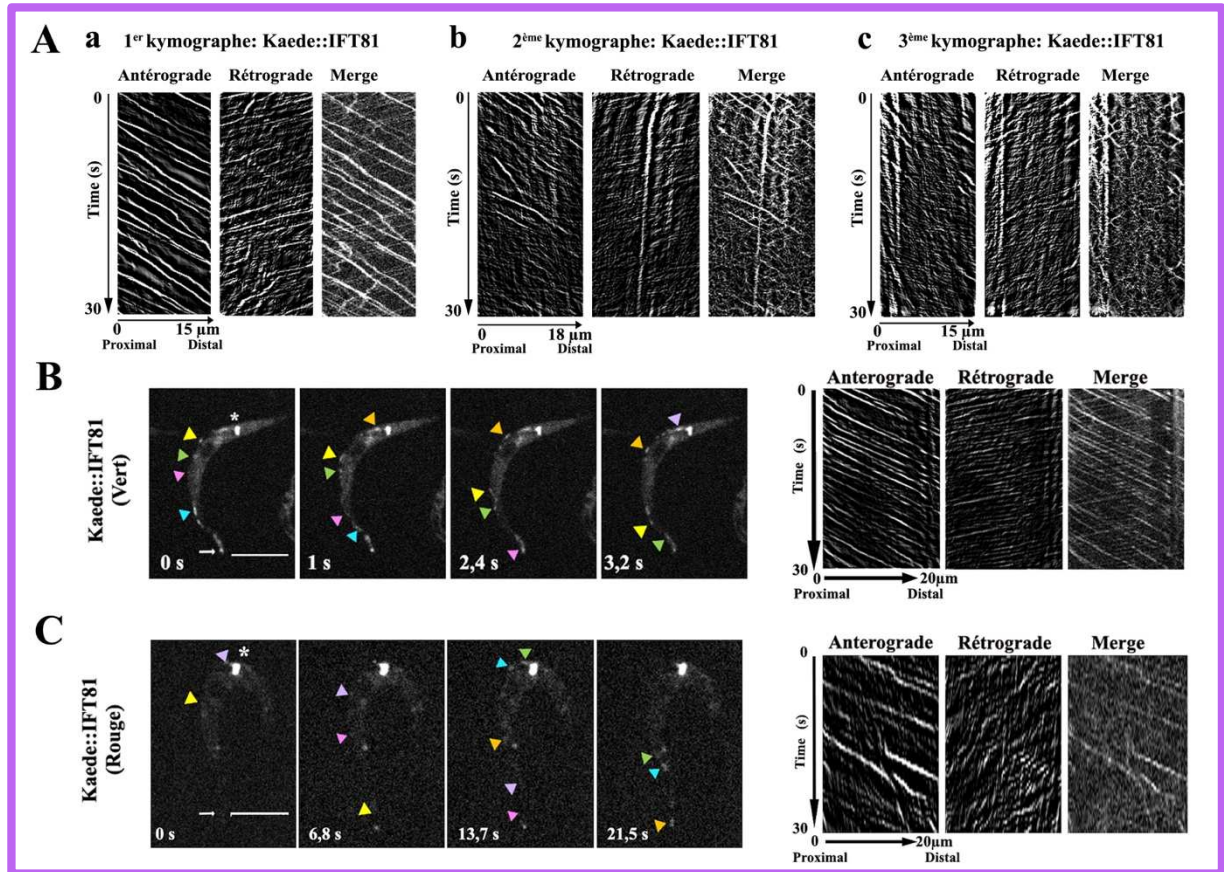


Figure 33 : Dynamique de la protéine Kaede::IFT81 dans les cellules WT avant et après photoconversion

- A) Kymographes issus de trois cellules différentes exprimant la protéine Kaede::IFT81 montrant l'hétérogénéité de la souche.
- B) Les images arrêtées sont issues de films de cellules exprimant la protéine Kaede::IFT81 avant et après photoconversion par un pulse UV (C). Sur chaque image, les flèches de couleurs indiquent la position successive de plusieurs trains antérogrades et le temps est indiqué. Sur la première image de la figure B et C, l'astérisque indique la base du flagelle et la flèche blanche indique l'extrémité distale du flagelle. Les trois derniers panneaux de la figure B et C indiquent, de gauche à droite, les kymographes montrant le transport antérograde, rétrograde et leur superposition.

Barre d'échelle : 5µm

L'observation des cellules vivantes a révélé un trafic IFT hétérogène d'une cellule à l'autre (Figure 33A). La protéine verte Kaede::IFT81 est concentrée à la base du flagelle et les trains se déplacent plus ou moins rapidement dans les deux sens. Dans le premier cas présenté, la vitesse et la fréquence des protéines IFT antérogrades (2,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour une fréquence de 0,7 trains/sec) et rétrogrades (2,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour une fréquence de 0,6 trains/sec) dans le vieux flagelle sont en dessous des valeurs expérimentales obtenues dans la majorité des souches étudiées au laboratoire. Il a été démontré que la vitesse moyenne des protéines IFT antérogrades est d'environ 2,4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour une fréquence de 0,9 trains/sec et la vitesse moyenne des protéines IFT rétrogrades est de 5,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour une fréquence de 2,5 trains/sec (Buisson, Chenouard et al. 2013). Dans le second cas, les protéines IFT antérogrades voyagent plus lentement et la fréquence est réduite. Au niveau du transport rétrograde, la détection des trains n'est pas aisée et quelques trains apparaissent à l'arrêt (représenté par un trait fluorescent verticale le long du kymographe) (Figure 33 Ab). Cette hétérogénéité est également visible dans le troisième cas : quelques trains sont à l'arrêt et peu de trains antérogrades et rétrogrades circulent (Figure 33 Ac).

Dans les figures qui vont suivre, l'analyse de la vitesse des particules IFT a été limitée aux cellules ayant des caractéristiques similaires aux cellules exprimant une protéine IFT tagguée avec un marqueur fluorescent non photoconvertible. La circulation des trains IFT est filmée en continu et représentée sur des images fixes (flèches de couleurs) avant (Figure 34B) et après photoconversion (Figure 33C). Les kymographes ont été extraits afin de déterminer la vitesse et la fréquence des trains antérogrades et rétrogrades dans les cellules exprimant la protéine Kaede avant (verte, Figure 33B) et après (rouge, Figure 33C) photoconversion. La vitesse moyenne des trains antérograde dans les cellules exprimant la protéine Kaede verte présenté dans le premier kymographe est de 2,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour une fréquence de 0,8 trains/sec tandis que la vitesse moyenne des trains IFT rétrogrades est de 6,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour une fréquence de 1,3 train/sec (Figure 33B). L'analyse du kymographe antérograde de cette cellule permet de corrélérer ce résultat avec ceux obtenus précédemment au laboratoire. Néanmoins, la vitesse des protéines IFT rétrogrades est plus rapide et la fréquence des trains est réduite par rapport aux valeurs de référence (Buisson, Chenouard et al. 2013), indiquant un problème possible de détection.

Par la suite, les cellules exprimant la protéine Kaede::IFT81 ont été photoconverties pendant 5 min comme décrit ci-dessus. La photoconversion de la population est totale et les

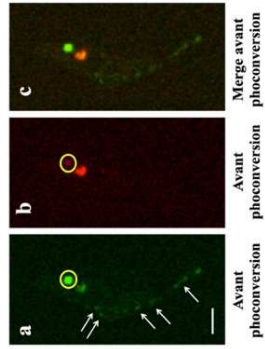
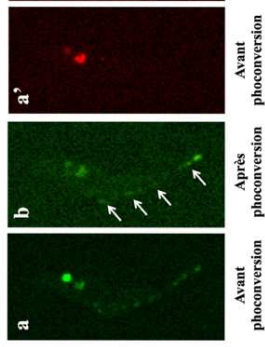
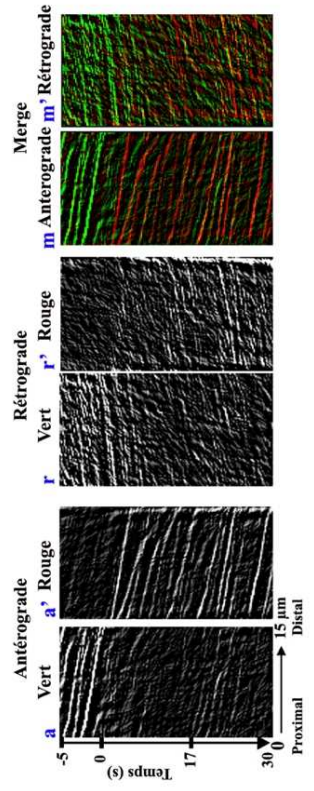
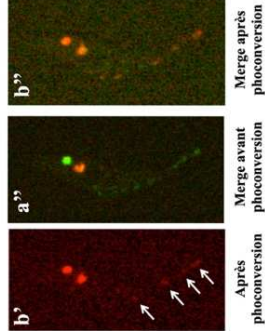
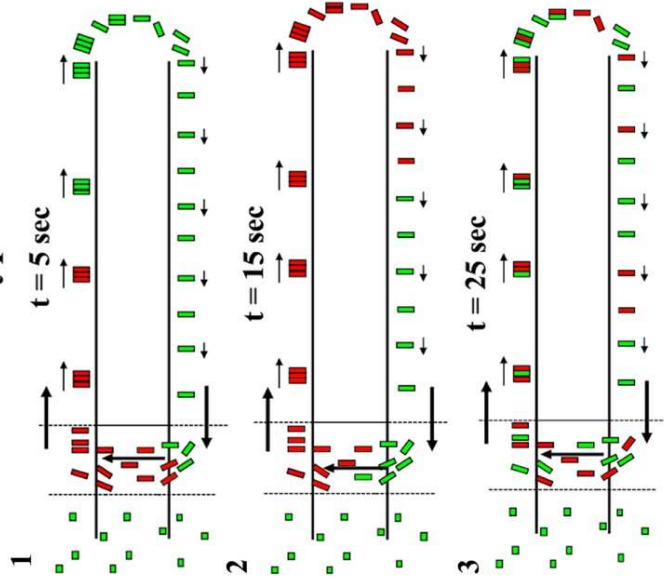
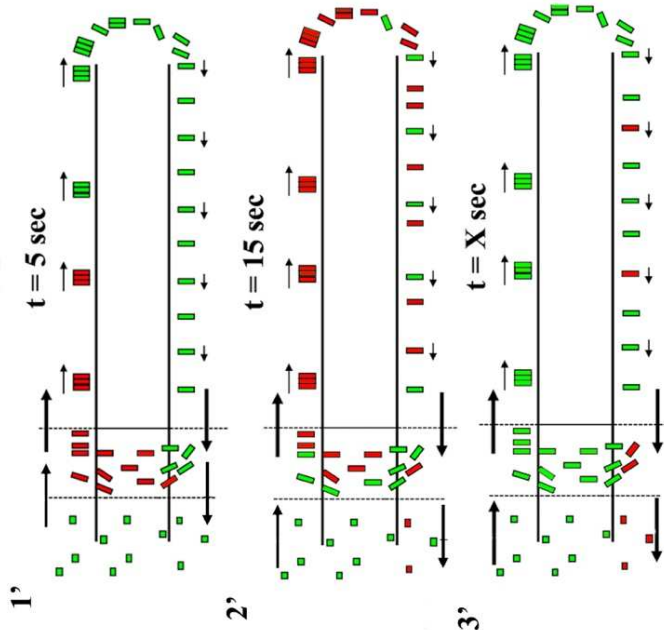
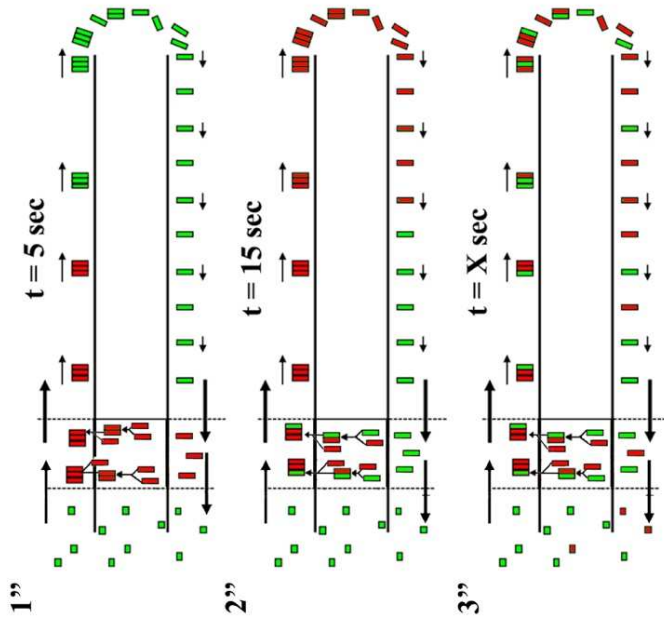
A**B****C****D****1^{ère} hypothèse****2^{ème} hypothèse****3^{ème} hypothèse**

Figure 34 : Recyclage des protéines IFT à la base du flagelle

Les images arrêtées sont issues du film d'une cellule exprimant la protéine Kaede::IFT81 avant (A) et après photoconversion du signal à la base du flagelle (A-B). Sur les images Aa, Bb et Bb', les flèches blanches indiquent la position de trains antérogrades verts ou rouges. (A) La région d'intérêt dessinée en jaune au niveau de la base du flagelle détermine la zone de photoconversion.

(B) Les images arrêtées avant (a, a') et après photoconversion (b, b') sont représentées. Une superposition de la situation initiale (a'') et de la situation après photoconversion (b'') est présentée.

(C) Les kymographes dans les canaux vert (a, r) et rouge (a', r') sont extraits dans le sens antérograde (a, a') et rétrograde (r, r'). Une superposition des kymographes vert/rouge dans le sens antérograde et rétrograde est également présenté (m, m').

(D) Ces schémas récapitulatif montrent les 3 différentes hypothèses proposées : la première hypothèse montre un échange avec le pool basal, la seconde hypothèse propose un échange avec le pool cytoplasmique et la troisième hypothèse propose un système de recyclage à la queue leu leu.

cellules expriment une fluorescence Kaede rouge à la base du flagelle. Il est néanmoins difficile d'observer le trafic des trains IFT rouges dans les deux sens de circulations puisque leur fréquence est basse (Figure 33C) par rapport à une souche de référence. Ces résultats ne sont pas en corrélation avec les précédentes études menées au laboratoire ((Blisnick, Buisson et al. 2014) ; (Buisson, Chenouard et al. 2013) ; (Huet, Blisnick et al. 2014)), laissant penser que cette méthode de photoconversion pourrait être toxique pour les cellules. Une autre procédure moins agressive sera dès lors privilégiée : la photoconversion pendant un temps très court d'une zone d'intérêt.

Photoconversion de la base du flagelle dans les cellules WT Kaede::IFT81

Afin de visualiser le recyclage des protéines IFT et les échanges avec le cytoplasme, les cellules exprimant Kaede::IFT81 sont immobilisées entre lame et lamelle puis observées directement au microscope. Le pool de protéines IFT est concentré à la base du flagelle qui est délimitée par un cercle jaune représentant la zone d'intérêt pour la photoconversion. La délimitation d'une zone d'intérêt permet de photoconvertir par illumination UV une faible zone sans engendrer de dommage visible à la cellule. Les premières images issues d'un film de cellule exprimant la protéine Kaede::IFT81 montrent l'état initial de la cellule dans le canal vert (Figure 34 Aa) et rouge avant photoconversion (Figure 34 Ab). Les deux canaux sont superposés à la Figure 34 Ac. Dans le canal vert, les flèches blanches pointent les trains antérogrades voyageant dans le flagelle à un instant donné (Figure 34 Aa). Dans le canal rouge, une très faible fluorescence est visible à la base du flagelle (délimité par la ROI jaune d'intérêt) (Figure 34 Ab). Néanmoins, la présence d'un spot interne rouge est flagrante en dessous de la base du flagelle, au niveau du lysosome. Il est dû à l'accumulation dans le lysosome du rouge phénol présent dans le milieu de culture (Figure 34 Ab). La superposition des deux canaux permet d'avoir une vue générale de la cellule avant photoconversion (Figure 34 Ac).

Les différentes étapes d'une des expériences réalisées sur des cellules uni flagellées exprimant Kaede::IFT81 sont segmentées en fonction des canaux observés (Figure 34 C). Avant photoconversion de la base du flagelle, le transport intraflagellaire est enregistré pendant 5 secondes (Figure 34 Ba). Après photoconversion du matériel présent à la base du flagelle (Figure 34 Bb'), les trains Kaede verts (Figure 34 Bb) et rouges (Figure 34 Bb') sont pointés à l'aide de flèches blanches. Après les dix premières secondes qui ont suivi la photoconversion, une fluorescence orange est observée à la base du flagelle (Figure 34 Bb'') ce qui suggère qu'il

Il y a une mixture de protéines IFT vertes et rouges dans ce compartiment flagellaire. Les premières protéines IFT rétrogrades vertes qui sont proches de la base du flagelle quelques secondes après la photoconversion ne sont pas directement éliminées après leur premier cycle de transport et restent confinées à la base pour y être recyclées ou pour y subir un second cycle. Il n'est pas à exclure qu'il existe également un équilibre entre les protéines cytoplasmiques et la base du flagelle.

Les kymographes (Figures 34C) sont extraits du film présenté précédemment et permettent de déterminer la vitesse et la fréquence des trains aller et retour dans le flagelle. Sur le premier kymographe représenté à gauche de la figure, les protéines IFT vertes voyageant dans le flagelle sont nettement visibles (entre -5 sec et 0 sec) (Figure 34 Ca). Au temps $t = 0$ seconde, les protéines IFT à la base du flagelle sont photoconverties en rouge de façon irréversible. Les protéines photoconverties rentrent dans le flagelle et sont alors détectées sur le kymographe du canal rouge (Figure 34 Ca'). De plus, dans ces deux premiers kymographes, aucune protéine IFT verte ne circule pendant les 17 premières secondes après la photoconversion de la base. Néanmoins, dans le transport rétrograde, des protéines IFT vertes et rouges sont visualisées (Figure 34 Cr, Cr'). La superposition des kymographes verts et rouges au niveau du transport antérograde ou rétrograde montre quelques colocalisations visibles entre les protéines IFT vertes et rouges ce qui suggère qu'elles s'associent entre elles (Figure 34 Cm, Cm').

Discussion

La photoconversion d'une population de cellules a montré une hétérogénéité de profil « de trafficking » de la fusion Kaede::IFT81. L'étude de quatorze cellules a permis de déterminer une vitesse moyenne pour les protéines IFT vertes antérogrades de l'ordre de 1,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ et une fréquence de 0,5 trains/sec. Ces valeurs sont inférieures aux observations réalisées précédemment au laboratoire qui expriment une protéine IFT tagguée à un marqueur fluorescent non photoconvertible (vitesse antérograde : 2,4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour une fréquence de 0,9 trains par seconde). Cette diminution de fréquence peut s'expliquer soit par un effet d'agrégation de la protéine Kaede (qui est un tétramère) qui empêche les protéines IFT d'entrer dans le flagelle ou soit par la compétition entre les protéines Kaede::IFT81 et les protéines IFT81 non tagguées. Ces résultats sont préliminaires mais l'instabilité de la lignée au cours du temps n'a pas permis d'augmenter le nombre de cellules étudiées. Il aurait également été important de catégoriser et d'analyser les différentes populations observées. Enfin, cette étude

préliminaire nous a permis de conclure que l'exposition prolongée de la culture cellulaire à une base longueur d'onde perturbe l'IFT.

La photoconversion d'une région d'intérêt au niveau de la base du flagelle ne montre pas de dommage à la cellule et a permis d'étudier le transport intraflagellaire et le recyclage des protéines IFT à la base du flagelle. A travers ces expériences, trois hypothèses de recyclage des protéines IFT sont proposées (Figure 34D). A l'état initial, les protéines IFT vertes sont concentrées à la base du flagelle et les trains IFT verts trafiquent dans les deux directions. Dans ces trois hypothèses, à un instant $t = 0$ seconde, le pool IFT à la base du flagelle est photoconverti par le pulse UV et l'ensemble du pool basal est constitué de protéines IFT rouges.

Dans la première hypothèse, à $t = 5$ secondes, les premières protéines IFT Kaede rouges commencent leur voyage dans le flagelle (Figure 34 D1) tandis que les protéines IFT vertes déjà engagées continuent leur cycle du transport. A un temps $t = 25$ secondes, le premier cycle des protéines IFT Kaede vertes est terminé et les protéines IFT rétrogrades se mélangent au pool basal pour y être soit recyclées ou pour y subir un nouveau cycle. Le pool cytoplasmique est laissé vert puisqu'aucune fluorescence rouge n'a été détectée dans le cytoplasme (Figure 34 D3).

Dans la seconde hypothèse, à un temps $t = 5$ secondes, les premières protéines IFT Kaede rouges voyagent dans le flagelle et les protéines IFT Kaede vertes continuent leur cycle. A un temps $t = 15$ secondes, une mixture de protéines IFT Kaede vertes et rouges est détectée au niveau du transport rétrograde (Figure 34 Cm', 35 D2'). A partir de 17 secondes, de nouvelles protéines IFT Kaede vertes sont détectées dans le flagelle. Dès lors, nous proposons qu'il y a une entrée cytoplasmique de protéines IFT vertes fraîches à la base du flagelle. A partir des 20 premières secondes les premières protéines IFT Kaede rouges sont directement dégradées dans le cytosol et ne sont pas recyclées (Figure 34 D3'). Dans le troisième modèle, le regroupement des protéines IFT antérogrades et rétrogrades peuvent s'effectuer par un système de « queue leu leu », c'est-à-dire que le démontage des trains rétrogrades est pris en compte dans l'ordre d'arrivée des protéines IFT rétrogrades et que l'assemblage de nouveaux trains s'effectuerait en fonction de leur localisation. Dès lors, à un temps $t = 15$ secondes, les premières protéines IFT vertes cytoplasmiques sont assemblées avec des protéines IFT rouges et se préparent à subir un cycle de transport (Figure 34 D2''). Une fois le cycle terminé, les protéines IFT rétrogrades sont directement recyclées dans le cytosol (Figure 34 D3''). Enfin, une mixture des trois hypothèses n'est pas à exclure. Les protéines IFT vertes peuvent être soit

recyclées au niveau du pool basal ou soit venir du pool cytoplasmique de protéines IFT fraîches. Le système de queue leu leu peut également être mis en place avec le recyclage des protéines IFT à la base du flagelle et un recrutement de nouvelles protéines IFT fraîches venant du pool cytoplasmique.

Pour conclure, ces expériences sont préliminaires et des problèmes liés à l'instabilité de l'expression de la protéine de fusion n'ont pas permis de poursuivre ces travaux. En effet, la fluorescence décroît rapidement et n'est plus détectée dans les trois semaines suivant la nucléofection. La transfection du plasmide dans d'autres cellules de type Antat a donné le même résultat. Pour pallier à ce problème, la protéine photoconvertible mEos3.2 a été également testée mais la stabilité dans le temps n'a pas été avérée : la perte de la fluorescence a été également constatée dans les 3 semaines qui ont suivi la nucléofection.

Néanmoins, c'est par l'intermédiaire de cette étude qu'un nouveau projet utilisant les protéines photoconvertibles a vu le jour au laboratoire afin d'étudier le transport d'une des protéines IFT-B de son lieu de synthèse jusqu'à la base de l'organite.

4.3 Transport de la tubuline par les IFT

4.3.1 Résumé de l'article

La tubuline est l'un des constituants majeurs de l'axonème et elle est transportée de la base à la pointe distale du flagelle par IFT. Néanmoins, les mécanismes moléculaires permettant son transport étaient inconnus. L'équipe de Esben Lorentzen a démontré que la partie N-terminal de la protéine IFT81 forme un domaine d'homologie à la calponine capable de lier la tubuline *in vitro*. Cette liaison à la tubuline est renforcée par l'interaction avec IFT74. Des études fonctionnelles au moyen de différentes mutations de IFT81 ont identifié les résidus essentiels à la liaison de la tubuline. L'extinction d'IFT81 par siRNA chez les cellules RPE-1 réduit fortement le pourcentage de cellules ciliées. Ce phénotype est complété par la surexpression de la protéine IFT81 normale tandis que les différents mutants d'IFT81 dont la capacité de lier la tubuline est réduite, entraîne une sauvegarde partielle de la formation des cils. L'expression de la protéine mutée dans laquelle la liaison de la tubuline est abolie ne permet pas la sauvegarde des cils. Le phénotype obtenu peut être interprété comme une impossibilité à transporter la tubuline mais il n'est pas à exclure que la mutation entraîne un défaut de la formation des trains. *In vitro*, IFT81 n'est pas requis pour la formation et la stabilité du complexe IFT-B. Une collaboration avec notre laboratoire a été développée et ma contribution a permis de distinguer une de ces deux possibilités. L'expression d'une version normale d'IFT81 et d'une version qui porte une double mutation dans le domaine CH de la liaison à la tubuline a été réalisées chez *T. brucei*. L'imagerie des cellules vivantes et les analyses kymographiques révèlent que la localisation et la vitesse des trains contenant IFT81 ou IFT81 muté sont similaires à ceux observés pour d'autres protéines IFT. L'ensemble de ces résultats confirme que le phénotype observé précédemment est dû à une carence de la liaison de la tubuline. Cette étude a donc permis de démontrer que les protéines IFT74/IFT81 forment un module de liaison à la tubuline et que ce module est nécessaire pour la ciliogenèse et non pour la formation des trains et leur déplacement. On notera toutefois que la vitesse du transport rétrograde est légèrement modifiée chez la protéine mutante.

4.3.2 Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81

Article publié dans Science en Août 2013.

Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81.

Bhogaraju S1, Cajanek L, Fort C, Blisnick T, Weber K, Taschner M, Mizuno N, Lamla S, Bastin P, Nigg EA, Lorentzen E.

ensuring that multiple genes have precisely timed transcription starts and sufficient levels of activation (21).

The ancestral roles of the mammalian pluripotency control factors Pou5f1 and Sox2 during the early development of nonmammalian vertebrates have long been a mystery (28). Our results show that the composition of post-MBT Pou5f1 and Sox2 binding sites, co-occupancy with Nanog, their chromatin state, and Pol II binding are similar in zebrafish embryos and mammalian ES cells (fig. S13 and supplementary text). Thus, the ancestral function of the pluripotency factors is zygotic gene activation and developmental timing control in the early vertebrate embryo. In a sense, it is a first major reprogramming event from transcriptionally silent cleavage-stage cells to pluripotent post-MBT blastomeres. In this context, Pou5f1 and Sox2 contribute to all main embryonic regulatory pathways. Considered together with the orthology of target gene sets, the zygotic priming-activation-timing mechanism may have evolved to control the cell pluripotency state in mammalian development.

References and Notes

1. W. Tadros, H. D. Lipshitz, *Development* **136**, 3033–3042 (2009).
2. A. J. Giraldez *et al.*, *Science* **312**, 75–79 (2006).
3. H. L. Liang *et al.*, *Nature* **456**, 400–403 (2008).
4. J. R. ten Bosch, J. A. Benavides, T. W. Cline, *Development* **133**, 1967–1977 (2006).
5. R. Satija, R. K. Bradley, *Genome Res.* **22**, 656–665 (2012).
6. C. Y. Nien *et al.*, *PLoS Genet.* **7**, e1002339 (2011).
7. E. Z. Kvon, G. Stampfel, J. O. Yáñez-Cuna, B. J. Dickson, A. Stark, *Genes Dev.* **26**, 908–913 (2012).
8. M. M. Harrison, X. Y. Li, T. Kaplan, M. R. Botchan, M. B. Eisen, *PLoS Genet.* **7**, e1002266 (2011).
9. D. A. Kane, C. B. Kimmel, *Development* **119**, 447–456 (1993).
10. C. Xu *et al.*, *Dev. Cell* **22**, 625–638 (2012).
11. H.-G. Belting *et al.*, *Development* **128**, 4165–4176 (2001).
12. Y. Okuda *et al.*, *Dev. Dyn.* **235**, 811–825 (2006).
13. Y. Okuda, E. Ogura, H. Kondoh, Y. Kamachi, *PLoS Genet.* **6**, e1000936 (2010).
14. X. Chen *et al.*, *Cell* **133**, 1106–1117 (2008).
15. J. Kim, J. Chu, X. Shen, J. Wang, S. H. Orkin, *Cell* **132**, 1049–1061 (2008).
16. Y. H. Loh *et al.*, *Nat. Genet.* **38**, 431–440 (2006).
17. K. Lunde, H. G. Belting, W. Driever, *Curr. Biol.* **14**, 48–55 (2004).
18. G. Reim, M. Brand, *Development* **133**, 2757–2770 (2006).
19. G. Reim, T. Mizoguchi, D. Y. Stainier, Y. Kikuchi, M. Brand, *Dev. Cell* **6**, 91–101 (2004).
20. H. G. Belting *et al.*, *Dev. Biol.* **356**, 323–336 (2011).
21. D. Onichtchouk *et al.*, *Mol. Syst. Biol.* **6**, 354 (2010).
22. I. Papatsenko, M. Levine, D. Papatsenko, *Bioinformatics* **26**, 2731–2736 (2010).
23. H. Aanes *et al.*, *Genome Res.* **21**, 1328–1338 (2011).
24. M. Lagha, J. P. Bothma, M. Levine, *Trends Genet.* **28**, 409–416 (2012).

25. L. C. Lindeman *et al.*, *Dev. Cell* **21**, 993–1004 (2011).
26. R. H. Morley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 3829–3834 (2009).
27. Z. Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.* **286**, 28520–28532 (2011).
28. B. Fernandez-Tresguerres *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 19955–19960 (2010).
29. C. Y. McLean *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **28**, 495–501 (2010).

Acknowledgments: We thank S. Shvartsman for scientific discussion; S. Arnold, G. Pyrowolakis, V. Taylor, A. Fuchs, S. Eckerle, and M. Fernandes for comments; B. Wendik and J. Paddeken for participating in initial stages of this work; Y. Kamachi for Sox3/19a/19b antibody; L. Yampolsky for help with statistics; and S. Götter for fish care. Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft grants DFG-EXC294 and DFG-SFB592 (W.D. and D.O.) and Bundesministerium für Bildung und Forschung grant BMBF-0313921FRISYS (W.D.). Microarray and CHIP-Seq data GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) accession numbers: CHIP-seq data, GSE39780; microarray data, GSE41107, GSE17655, and GSE17656.

Supplementary Materials

www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.1242527/DC1

Materials and Methods

Supplementary Text

Figs. S1 to S13

Tables S1 to S10

References (30–56)

28 June 2013; accepted 31 July 2013

Published online 15 August 2013;

10.1126/science.1242527

Molecular Basis of Tubulin Transport Within the Cilium by IFT74 and IFT81

Sagar Bhogaraju,¹ Lukas Cajanek,² Cécile Fort,³ Thierry Blisnick,³ Kristina Weber,¹ Michael Taschner,¹ Naoko Mizuno,¹ Stefan Lamla,^{4*} Philippe Bastin,³ Erich A. Nigg,² Esben Lorentzen^{1,†}

Intraflagellar transport (IFT) of ciliary precursors such as tubulin from the cytoplasm to the ciliary tip is involved in the construction of the cilium, a hairlike organelle found on most eukaryotic cells. However, the molecular mechanisms of IFT are poorly understood. Here, we found that the two core IFT proteins IFT74 and IFT81 form a tubulin-binding module and mapped the interaction to a calponin homology domain of IFT81 and a highly basic domain in IFT74. Knockdown of IFT81 and rescue experiments with point mutants showed that tubulin binding by IFT81 was required for ciliogenesis in human cells.

Cilia are microtubule-based organelles that function in motility, sensory reception, and signaling (1). Ciliary dysfunction results in numerous diseases and disorders commonly known as ciliopathies. Intraflagellar transport (IFT) is involved in cilium formation (2, 3) but also

functions in other cellular processes, such as the recycling of T cell receptors at the immune synapse (4). IFT relies on kinesin-2 and IFT-dynein molecular motors moving along the microtubule-based axoneme of cilia (5–7) and on the IFT complex, which contains at least 20 different protein subunits. Although ~600 proteins are known to reside in the cilium (8), we know very little about how they are recognized as ciliary cargo by the IFT machinery (9–11).

To identify potential cargo-binding sites on the IFT complex, we carried out bioinformatical and biochemical screening and identified conserved domains that were not required for IFT complex formation. We reasoned that such domains could protrude from the IFT particle-core structure and would thus be in a prime position for cargo rec-

ognition. The two IFT core proteins IFT74 and IFT81 were found to possess N-terminal domains (IFT74N and IFT81N) that were not required for IFT complex formation or stability (fig. S1). Whereas IFT81N is highly conserved in sequence and predicted to be a folded domain, IFT74N was likely to be disordered and was highly basic with an isoelectric point (pI) > 12 (fig. S2). To characterize the properties of IFT74N and IFT81N, we purified recombinant *Homo sapiens* (Hs) IFT81N, *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr) IFT81N, and a truncated HsIFT74/81 heterodimeric complex (fig. S3) (IFT74N alone degraded rapidly and could not be purified) and determined the crystal structure of CrIFT81N (Fig. 1, A to C; fig. S4, A to D; and table S1). The crystal structure revealed that IFT81N adopts the fold of a calponin homology (CH) domain with unexpected structural similarity to the kinetochore complex component NDC80 with microtubule (MT)-binding properties (12). Given that the cilium consists of a MT-based axoneme, IFT of large quantities of tubulin is required for cilium formation (13). We thus tested the tubulin-binding properties of HsIFT81N using affinity pull-downs (Fig. 1D and fig. S4E) and microscale thermophoresis (MST) with unpolymerized bovine $\alpha\beta$ -tubulin (Fig. 1, E and F). HsIFT81N bound tubulin with a dissociation constant (K_d) of 16 μ M via a highly conserved, positively charged surface patch, which was enhanced 18-fold by IFT74N (Fig. 1G and fig. S3). Because this result was unexpected, we also carried out MT sedimentation assays and electron microscopy (EM) to visualize IFT81 or IFT74/81 bound to MT (fig. S5). The IFT74/81 complex,

¹Department of Structural Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany. ²Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstrasse 50/70, CH-4056 Basel, Switzerland. ³Trypanosome Cell Biology Unit, Institut Pasteur and CNRS URA2581, 25 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. ⁴Department of Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.

*Present address: Anni-Albers-Straße 11, D-80807 München, Germany.

†Corresponding author. E-mail: lorentze@biochem.mpg.de

but not IFT81N, at low μM concentration cosedimented with MT during ultracentrifugation (fig. S5, D and E) and decorated MT (fig. S5F). Thus, the tubulin-binding module is formed by the IFT74/81 complex rather than by IFT81N alone.

To dissect the binding mode in the IFT74/81: $\alpha\beta$ -tubulin complex, samples were prepared from MT and unpolymerized $\alpha\beta$ -tubulin lacking the highly acidic C-terminal tails, often referred to as E-hooks (12) (fig. S5A). $\alpha\beta$ -tubulin lacking E-hooks had similar affinity for IFT81N as intact tubulin (fig. S5, B and C), which suggested that IFT81N recognizes the globular domain of $\alpha\beta$ -tubulin with no substantial interaction with the E-hooks. IFT74/81 displayed robust MT binding in sedimentation assays, which was, however, reduced to background levels in the absence of the β -tubulin E-hook (fig. S5E). Thus, IFT81N appears to bind the globular domain of tubulin to provide specificity, and IFT74N recognizes the β -tubulin tail to increase affinity (Fig. 1H).

To examine the role of tubulin binding by IFT74/81 in a cellular system, we transiently expressed Flag-HsIFT81 or Flag-HsIFT81 ΔN in human RPE-1 cells and induced formation of primary cilia either by treatment with 0.5 μM cytochalasin D (Fig. 2) (14) or serum starvation (fig. S6, A and D). In these experiments, centrioles were visualized by staining for CAP350 and cilia by staining for the small guanosine triphosphatase Arl13b

or acetylated tubulin. We detected both Flag-HsIFT81 and Flag-HsIFT81 ΔN at the tip of the primary cilium and, to a minor extent, also along the axoneme (fig. S6A), suggesting that IFT81N is not required for the transport of IFT81 within the primary cilium. Remarkably, however, the expression of Flag-HsIFT81 ΔN had a strong negative impact on the extent of ciliogenesis (fig. S6, B to D), suggesting that excess IFT81 ΔN caused a dominant-negative effect, presumably through formation of IFT complexes unable to bind tubulin.

To further investigate the function of the tubulin-binding domain of IFT81 in ciliogenesis, we carried out small interfering RNA (siRNA)-rescue experiments. siRNA-mediated depletion of IFT81 (fig. S6E) strongly reduced the percentage of ciliated cells (Fig. 2), which could be rescued by coexpression of an siRNA-resistant full-length IFT81, as expected. In contrast, none of the IFT81 mutants deficient in tubulin binding in vitro (HsIFT81mut¹ and HsIFT81mut²) compensated fully for the depletion of endogenous IFT81. Whereas expression of the deletion mutant (HsIFT81 ΔN) or the mutant with reduced tubulin-binding ability (HsIFT81mut¹) resulted in partial rescue, expression of HsIFT81mut², in which the entire tubulin-binding patch was mutated, completely failed to rescue the siRNA-mediated knockdown of IFT81 (Fig. 2B). Thus, the entire negative effect on cilium formation by IFT81 depletion was reca-

pitulated with a specific tubulin-binding-deficient mutant.

The fact that IFT81 ΔN formed stable IFT core complexes (fig. S1) suggested that the ciliogenesis phenotype was because of reduced tubulin binding and not a general failure of IFT. To rule out whether mutation of the IFT81N CH domain resulted in general IFT deficiency, we turned to the unicellular protozoan parasite *Trypanosoma brucei*, where IFT has been well studied (15), and tested the effect of IFT81N CH-domain disruption on IFT. Yellow fluorescent protein (YFP)-tagged but otherwise normal IFT81 or mutant IFT81 (IFT81_{146D,147D}, Dm) where the CH domain was unfolded (fig. S7A) were expressed at wild-type levels. One of the two *IFT81* alleles was replaced with either YFP::IFT81 or YFP::IFT81Dm, leaving one WT *IFT81* allele unaltered (fig. S7B). Both the localization and the IFT speed of IFT81 and IFT81Dm were similar to that observed for other IFT proteins as judged by live-cell imaging and kymographic analysis (Fig. 3 and movies S1 and 2) (15). Thus, IFT81N is not required for IFT complex assembly or normal IFT in vivo, which corroborates that the ciliogenesis phenotype observed upon IFT81N CH-domain mutation (Fig. 2) was indeed because of tubulin-binding deficiency.

Axonemal precursors such as tubulin are added to the tip of the cilium in a length-dependent man-

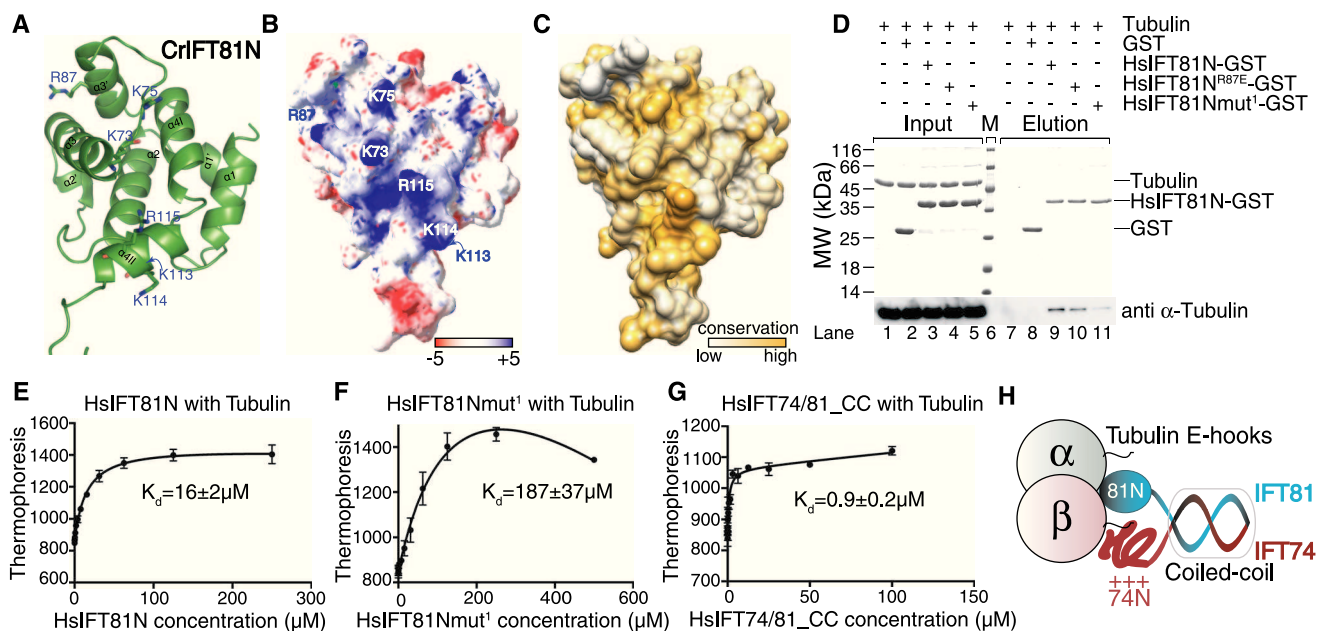


Fig. 1. IFT81 and IFT74 form a tubulin-binding module. (A) Cartoon representation of the crystal structure of CriIFT81N domain, with conserved lysines and arginines implicated in tubulin binding shown as sticks. (B) Electrostatic surface potential of IFT81N displaying the positively charged patch with the residues labeled according to the HsIFT81 sequence. (C) Surface conservation of IFT81N demonstrates that the basic patch is well conserved among different species (also see fig. S2). (D) Tubulin binding evaluated by glutathione (GSH) affinity pull-down of bovine $\alpha\beta$ -tubulin using glutathione S-transferase (GST)-HsIFT81N. Whereas tubulin does not bind the GST alone, a substantial portion is pulled down by GST-HsIFT81N, demonstrating binding. Whereas the single-point mutation R87E does not

strongly impair binding, the K73K75/EE double mutant (mut¹) results in reduced amounts of pulled-down tubulin, indicating reduced binding. (E) Quantification of tubulin binding to untagged HsIFT81N by microscale thermophoresis reveals a K_d of 16 μM . (F) The HsIFT81N mut¹ has drastically reduced binding with a K_d of 187 μM , showing that the basic patch is required for tubulin binding. (G) Microscale thermophoresis titration of tubulin with truncated HsIFT74/81 complex reveals a K_d of 0.9 μM . The curves in (E), (F), and (G) are calculated for three independent experiments, and the error bars represent the mean \pm SD. (H) The experiments shown in (D) to (G), along with the data in fig. S5, suggest a model in which IFT81N recognizes the globular domain of tubulin, providing specificity, and IFT74N binds the acidic tail of β -tubulin, providing increased affinity.

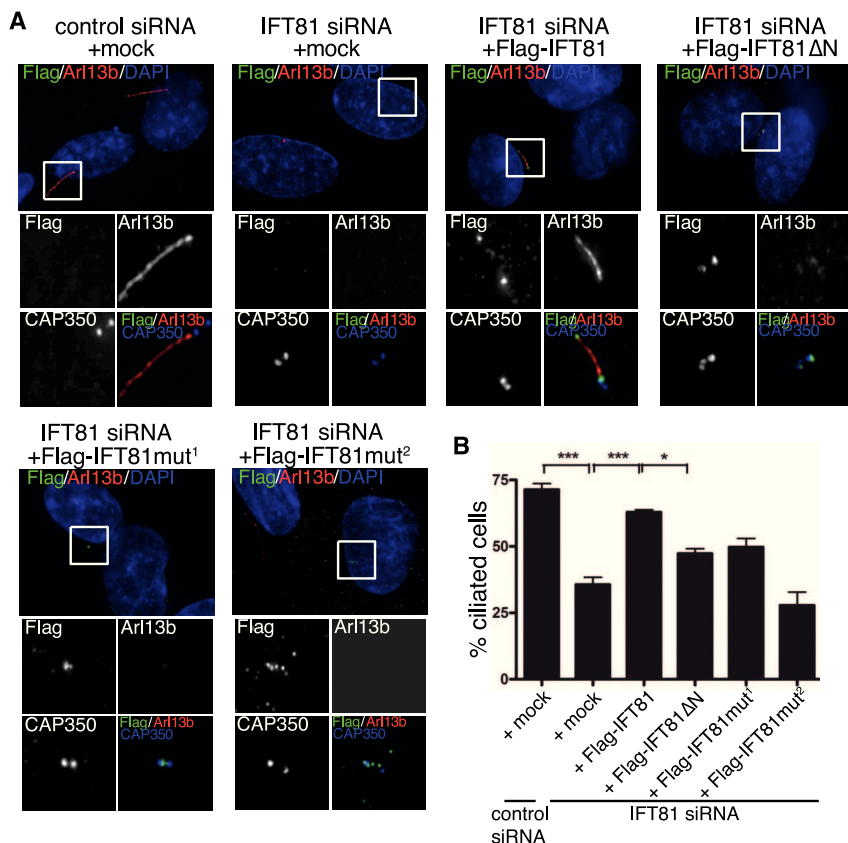


Fig. 2. Tubulin binding by IFT81 is required for ciliogenesis in human cells. (A) Transient expression of Flag-IFT81, but not the tubulin-binding-deficient IFT81 mutants (in green), rescues the ciliogenesis defect after IFT81 siRNA knockdown. Primary cilia formation was induced by 0.5 μ M cytochalasin D and detected by antibody to Arl13b (in red). CAP350 (in blue, inset images only) was used to visualize centrosomes. Mut¹ and Mut² are K73K75/EE and K73K75K113K114R115/EEEE tubulin-binding mutants, respectively. Scale bar, 5 μ m. (B) Quantification of the rescue experiment shown in (A). $n = 3$ independent experiments; statistical analyses by one-way analysis of variance.

ner (16, 17). The removal of tubulin from the axonemal tip, on the other hand, appears to be constant, with no dependence on cilium length (17, 18). These observations inspired the balance-point model, in which the length of a mature cilium is the result of equal delivery and removal rates for axonemal precursors (17, 19). Furthermore, the concentration of tubulin in the cytoplasm influences ciliogenesis and cilium length in mammalian cells (20). Based on the measured affinity between IFT74/81 and tubulin ($K_d = 0.9 \mu$ M) (Fig. 1G), we calculated the fraction of IFT complexes bound to $\alpha\beta$ -tubulin as a function of tubulin concentration (Fig. 4A). Because the cellular tubulin concentration is estimated to be in the low μ M range (21) and tubulin expression is induced at the onset of ciliogenesis (22), the IFT74/81:tubulin affinity is optimal for regulating cilium length via tubulin transport (Fig. 4B). The prediction is thus that most IFT complexes are loaded with tubulin during early stages of ciliogenesis, whereas lower occupancies are found during steady-state cilium length (Fig. 4), which agrees well with previously obtained data demonstrating that tubulin transport in full-length cilia yields only faint traces on kymographs, likely due to low tubulin occupancy on IFT complexes (13). During cilium growth, both anterograde IFT complex concentration and tubulin binding are negatively correlated with cilium length, resulting in a decreasing assembly rate as the cilium approaches steady-state length.

Here, we have shown that the two core IFT proteins IFT74 and IFT81 form a tubulin-binding module required for ciliogenesis, which suggests a role of IFT74/81 in the transport of tubulin within cilia. The fact that the high-affinity binding of tubulin occurs only for the IFT74/81 complex and

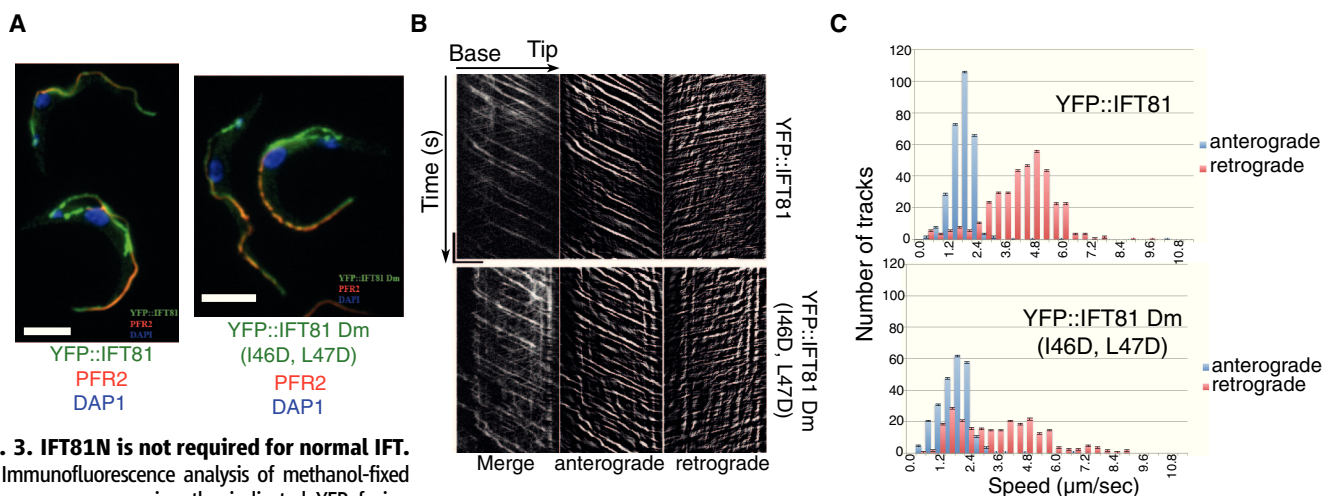


Fig. 3. IFT81N is not required for normal IFT. (A) Immunofluorescence analysis of methanol-fixed trypanosomes expressing the indicated YFP fusion proteins from the endogenous locus stained with an antibody to green fluorescent protein (GFP) (green) and with the antibody to PFR2 L8C4 to visualize the flagellum (red). The left panel corresponds to a control strain expressing YFP::IFT81 and the right panel to the mutant YFP::IFT81Dm, where the IFT81N CH domain is unfolded. Scale bar, 5 μ m. (B) Kymograph generation and separation of anterograde and retrograde traces. Kymographs were extracted from videos of cells expressing YFP::IFT81 (movie S1) or YFP::IFT81Dm (movie S2). Panels show the complete kymograph, anterograde events, and retrograde events (from left to right). The x axis corresponds to the length of the flagellum (horizontal scale bar,

5 μ m) and the y axis to the elapsed time (vertical scale bar, 5 s). (C) Quantitation of the kymograph analysis shown in (B). Anterograde (blue) and retrograde velocity (red) distribution of IFT particles are calculated from cells expressing YFP::IFT81 and YFP::IFT81Dm. The kymographic analysis reveals robust anterograde trafficking with a speed of $1.75 \pm 0.55 \mu$ m/s for YFP::IFT81 ($n = 294$ tracks from 15 cells) and $1.68 \pm 0.72 \mu$ m s^{-1} for YFP::IFT81Dm ($n = 244$ tracks from 15 cells). These values are in line with those reported for anterograde movement of GFP-IFT52 (15). Curiously, retrograde transport was slowed down in the case of YFP::IFT81Dm, where a second population of relatively slow trains was detected.

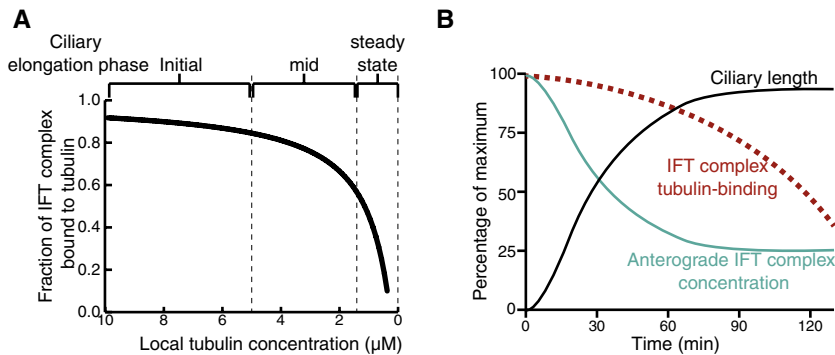


Fig. 4. Model for tubulin transport and ciliary length control. (A) Fraction of IFT complex bound to tubulin at varying tubulin concentrations is plotted using the equation $O_{\text{IFT}} = [\text{Tub}]/\{K_d + [\text{Tub}]\}$. O_{IFT} is the fraction of IFT bound to tubulin, K_d is the binding constant that is experimentally determined in this study as $0.9 \mu\text{M}$, and $[\text{Tub}]$ is the local concentration of free tubulin at the base of the cilium. (B) From the point of initiation of flagellar regeneration, the relationship between the ciliary length, the concentration of anterograde IFT particles, and O_{IFT} is plotted.

not for IFT81 alone could help ensure that tubulin cargo only binds in the context of properly assembled IFT complexes. Because tubulin constitutes the backbone of all cilia, it makes sense that the tubulin has a dedicated cargo-binding site on the IFT core complex (23). We hypothesize that, although abundant ciliary cargo proteins such as tubulin may undergo IFT via dedicated transport modules, less abundant ciliary proteins are likely to compete for generic cargo-binding sites on the IFT complex.

References and Notes

- H. Ishikawa, W. F. Marshall, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 222–234 (2011).
- K. G. Kozminski, K. A. Johnson, P. Forscher, J. L. Rosenbaum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5519–5523 (1993).
- J. L. Rosenbaum, G. B. Witman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 813–825 (2002).
- F. Finetti *et al.*, *Nat. Cell Biol.* **11**, 1332–1339 (2009).

- K. G. Kozminski, P. L. Beech, J. L. Rosenbaum, *J. Cell Biol.* **131**, 1517–1527 (1995).
- D. G. Cole *et al.*, *J. Cell Biol.* **141**, 993–1008 (1998).
- G. J. Pazour, B. L. Dickert, G. B. Witman, *J. Cell Biol.* **144**, 473–481 (1999).
- G. J. Pazour, N. Agrin, J. Leszyk, G. B. Witman, *J. Cell Biol.* **170**, 103–113 (2005).
- H. Qin, D. R. Diener, S. Geimer, D. G. Cole, J. L. Rosenbaum, *J. Cell Biol.* **164**, 255–266 (2004).
- Y. Hou *et al.*, *J. Cell Biol.* **176**, 653–665 (2007).
- G. Piperno, K. Mead, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 4457–4462 (1997).
- C. Ciferri *et al.*, *Cell* **133**, 427–439 (2008).
- L. Hao *et al.*, *Nat. Cell Biol.* **13**, 790–798 (2011).
- J. Kim *et al.*, *Nature* **464**, 1048–1051 (2010).
- J. Buisson *et al.*, *J. Cell Sci.* **126**, 327–338 (2013).
- K. A. Johnson, J. L. Rosenbaum, *J. Cell Biol.* **119**, 1605–1611 (1992).
- W. F. Marshall, J. L. Rosenbaum, *J. Cell Biol.* **155**, 405–414 (2001).
- L. Song, W. L. Dentler, *J. Biol. Chem.* **276**, 29754–29763 (2001).
- W. F. Marshall, H. Qin, M. Rodrigo Brenni, J. L. Rosenbaum, *Mol. Biol. Cell* **16**, 270–278 (2005).

- N. Sharma, Z. A. Kosan, J. E. Stallworth, N. F. Barberi, B. K. Yoder, *Mol. Biol. Cell* **22**, 806–816 (2011).
- G. Hiller, K. Weber, *Cell* **14**, 795–804 (1978).
- R. E. Stephens, *Dev. Biol.* **61**, 311–329 (1977).
- B. F. Lucker *et al.*, *J. Biol. Chem.* **280**, 27688–27696 (2005).

Acknowledgments: We thank the staff at SLS for help with x-ray diffraction data collection; the crystallization facility of the Max Planck Institute of Biochemistry (Munich) for access to crystallization screening; the staff at Biozentrum Imaging Core Facility for assistance; C. Basquin for static light-scattering experiments; C. Jung for help with microscale thermophoresis; and S. Chakrabarti, A. Cook, and B. D. Engel for carefully reading and correcting the manuscript. B. D. Engel is additionally acknowledged for assistance with Fig. 4 and for many valuable discussions concerning ciliary length control. We thank the Plateforme d’Imagerie Dynamique for providing access to their equipment and Jean-Yves Tinevez for technical advice. We acknowledge M. Morawetz and M. Stiegler for technical assistance with molecular biology. This work was funded by an Emmy Noether grant (DGF; LO1627/1-1), the European Research Council (ERC grant 310343), and the European Molecular Biology Organization Young Investigator program. Work at the Institut Pasteur was funded by Agence Nationale de la Recherche grant ANR-11-BSV8-016. C.F. is funded by a fellowship from the Ministère de l’Enseignement et de la Recherche (ED387). E.A.N. acknowledges support from the University of Basel and the Swiss National Science Foundation (31003A_132428/1). M.T. is the recipient of an Erwin Schrödinger stipend granted by the Austrian Science Fund J3148-B12, S.B. was supported by the International Max Planck Research School for Molecular and Cellular Life Sciences (IMPRS), and L.C. was supported by the FEBS long-term fellowship. The authors declare that they have no conflict of interest. The data presented in this paper are tabulated in the main paper and the supplementary materials. Structural coordinates have been deposited at the Protein DataBank, accession nos. 4LVP and 4LVR.

Supplementary Materials

www.sciencemag.org/cgi/content/full/341/6149/1009/DC1
Materials and Methods
Supplementary Text
Figs. S1 to S8
Table S1
References (24–47)

24 May 2013; accepted 1 August 2013
10.1126/science.1240985

Crystal Structure of MraY, an Essential Membrane Enzyme for Bacterial Cell Wall Synthesis

Ben C. Chung,¹ Jinshi Zhao,^{1*} Robert A. Gillespie,^{1*} Do-Yeon Kwon,² Ziqiang Guan,¹ Jiyong Hong,^{2,3} Pei Zhou,^{1,2} Seok-Yong Lee^{1†}

MraY (phospho-MurNAc-pentapeptide translocase) is an integral membrane enzyme that catalyzes an essential step of bacterial cell wall biosynthesis: the transfer of the peptidoglycan precursor phospho-MurNAc-pentapeptide to the lipid carrier undecaprenyl phosphate. MraY has long been considered a promising target for the development of antibiotics, but the lack of a structure has hindered mechanistic understanding of this critical enzyme and the enzyme superfamily in general. The superfamily includes enzymes involved in bacterial lipopolysaccharide/teichoic acid formation and eukaryotic N-linked glycosylation, modifications that are central in many biological processes. We present the crystal structure of MraY from *Aquifex aeolicus* (MraY_{AA}) at 3.3 Å resolution, which allows us to visualize the overall architecture, locate Mg²⁺ within the active site, and provide a structural basis of catalysis for this class of enzyme.

Bacteria maintain their cell shapes at different osmotic pressures by using the mesh-like layers of the cell wall to surround and

stabilize the membrane. The cell wall of both Gram-negative and Gram-positive bacteria is composed of peptidoglycan, a cross-linked polymer

of carbohydrates and amino acids. Because biosynthesis of peptidoglycan is a critical process for bacteria, it has been a major target for antibiotics (1, 2). Peptidoglycan biosynthesis involves three main stages. First, the peptidoglycan precursor UDP-*N*-acetylmuramoyl (MurNAc)-pentapeptide (L-Ala-γ-D-Glu-diaminopimelic acid/L-Lys-D-Ala-D-Ala) is synthesized in the cytosol. Second, this hydrophilic precursor is attached to a carrier lipid, and the lipid-linked precursor is flipped across the membrane to the periplasm. Third, peptidoglycan precursors are polymerized to form the cell wall.

MraY, or phospho-MurNAc-pentapeptide translocase, is an integral membrane protein responsible for the second stage of peptidoglycan

¹Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, 2 Genome Ct, Durham, NC 27710, USA. ²Department of Chemistry, Duke University, Durham, NC 27708, USA. ³Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. E-mail: sylee@biochem.duke.edu

significant difference (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)). Results are presented as mean plus standard error of the mean (SEM).

Generation of trypanosome expressing YFP::IFT81 cell lines

All cells used for this work were derived from *T. brucei* strain 427 (procyclic stage) and were cultured in SDM79 medium supplemented with hemin and 10% foetal calf serum. Cell lines expressing unaltered or mutated YFP::IFT81 were obtained after endogenous tagging. The first 500 nucleotides of the *IFT81* gene (Gene DB number Tb927.10.2640) were chemically synthesized (GeneCust, Luxembourg) and cloned in frame with the *YFP* gene within the HindIII and ApaI sites of the p2675 vector (33). The construct was linearized within the *IFT81* sequence with the enzyme XcmI and nucleofected (34) in wild-type trypanosomes, leading to integration by homologous recombination in the endogenous locus and to expression of the full length coding sequence of IFT81 fused to YFP. Expression of an IFT81-YFP fusion protein of the correct size was confirmed by western blotting with an anti-GFP antibody (Roche) that cross-reacts with YFP. The IFT81 I46D, L47D double-mutant (YFP::IFT81Dm) was generated from the p2675IFT81 plasmid using the Quikchange site directed mutagenesis protocol from Agilent Technologies[®]. The construct was linearized and transfected, leading to similar expression levels of YFP::IFT81Dm as for unaltered YFT-IFT81 described above.

Life microscopy analysis of trypanosome cells

Trypanosomes were taken from cultures grown at 1.10^7 cells/mL and the expression of YFP::IFT81 or YFP::IFT81DM was observed in live cells using a spinning disk

UltraView Vox microscope equipped with an oil immersion objective (magnification x100 with a 1.4 numerical aperture). Images were acquired using the Volocity software (Perkin Elmer) with an EMCCD camera (ImagEM X2, Hamamatsu) operating in streaming mode. Images were captured with an exposure time of 100ms during 30secs. Images were analysed using the Volocity software and Image J and kymographs were extracted using Quia (15).

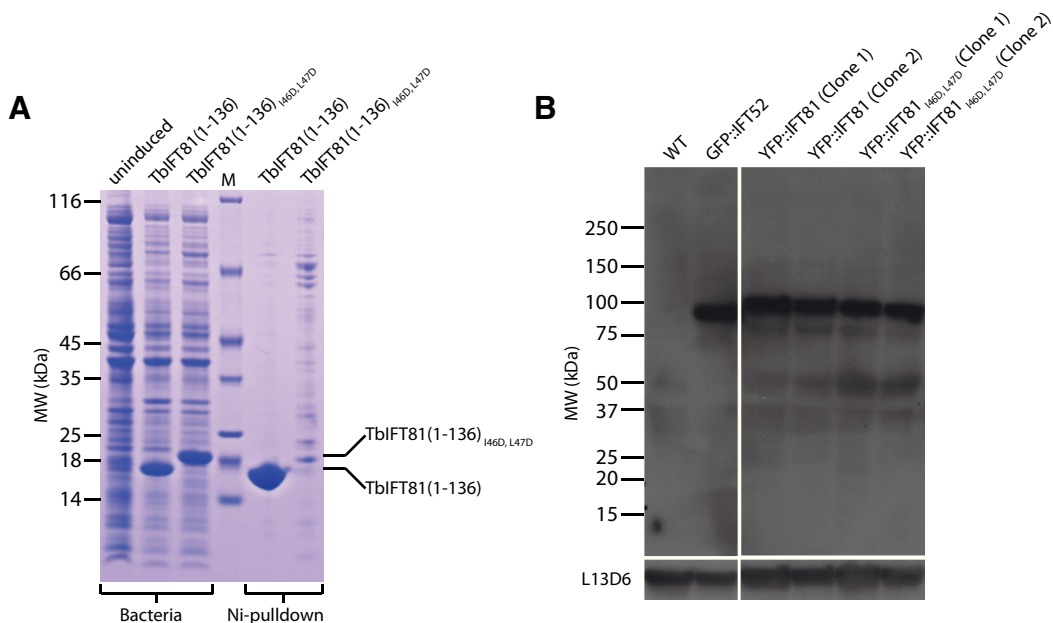


Fig. S7

(A) Expression and Ni-NTA pulldown of His tagged WT and I46D, L47D (Dm) structure-based mutant of *Trypanosoma brucei* (Tb) IFT81(1-136). Both proteins are highly expressed as seen from the lanes labeled ‘Bacteria’. The ‘Ni-pulldown’ lanes show that while the WT construct is highly soluble, the mutant solubility is severely compromised indicating that this double mutation disrupts the fold of the N-terminal domain of TbIFT81. **(B)** Western blotting analysis of total protein samples from the Tb cells expressing normal and the mutant (Dm) version of IFT81. 50µg of total protein for each lane are separated on a 4-15% SDS-PAGE and probed with the anti-GFP marker to detect the fusion proteins GFP-IFT52 (47), YFP::IFT81 or YFP::IFT81(I46D, L47D). The blot was reprobed with L13D6 to detect paraflagellar rod (PFR) proteins as loading control.

4.4 Les voies du transport intraflagellaire

4.4.1 Résumé de l'article

Les trains IFT se reconnaissent sur les coupes transversales de flagelle en microscopie électronique à transmission comme des structures denses aux électrons qui sont prises en sandwich entre les doublets de microtubules et la membrane flagellaire. Chez *T. brucei*, la microscopie électronique à transmission a montré que ces particules sont rencontrées presque exclusivement sur les doublets de microtubules 4 et 7 de l'axonème. Dans cette section, nous avons réalisé des études immunologiques sur des coupes transversales de flagelles de *T. brucei* au moyen d'anticorps contre les protéines IFT22 et IFT172 et confirmé que ces particules denses aux électrons contiennent bien des protéines IFT. Les trains étant présents sur seulement deux doublets, l'hypothèse de l'utilisation d'une voie spécifique pour le transport antérograde et une pour le rétrograde a été envisagée. En mai de cette année, une étude chez *Chlamydomonas* a mis en évidence que le transport antérograde et rétrograde avait lieu sur les mêmes doublets mais sur des microtubules séparés, avec les trains antérogades voyageant sur le B et les rétrogrades sur le A. Nous avons utilisé le FIB-SEM, une technique de reconstruction 3D en microscopie électronique, pour étudier la distribution des trains sur les doublets 4 et 7 des trypanosomes et montré que la longueur des trains IFT est hétérogène sur deux doublets. L'utilisation d'un microscope à super-résolution TIRF-SIM a permis de montrer pour la première fois sur cellules vivantes l'existence des deux voies pour le trafic IFT bidirectionnel. Afin de comprendre pourquoi les trains IFT voyagent préférentiellement sur ces deux doublets, nous avons posé l'hypothèse qu'ils pouvaient présenter un profil différent de modifications post-traductionnelles de la tubuline. Par immuno-microscopie, nous avons mis en évidence une polyglutamylation spécifique au niveau des doublets 4 et 7 des microtubules. Pour savoir si la polyglutamylation joue un rôle important dans la définition des voies du transport intraflagellaire, nous avons bloqué par ARN interférence l'expression de 7 gènes encodant des polyglutamylases potentielles appartenant à la famille des TTLL (en complet). Au cours de l'extinction par ARNi, on observe bien une réduction de la polyglutamylation sur les nouveaux flagelles qui sont construits plus courts et, en second lieu, on constate l'inhibition de la formation du flagelle. Dans ces conditions, les moteurs et les protéines IFT s'accumulent à la base du flagelle, au niveau des fibres de transition, et sont presque absents des nouveaux flagelles. Ces résultats indiquent que l'IFT a besoin de la polyglutamylation pour avoir lieu, en accord avec l'hypothèse de départ.

4.4.2 Article en soumission

Cet article sera soumis à Science en Août 2016.

Title: Tubulin polyglutamylation determines two microtubule doublets as railway tracks for intraflagellar transport

Authors: Cécile Fort^{1,2}, Thierry Blisnick¹, Sylvain Trépout^{3,4}, Moara Lemos¹, Sylvie Perrot¹, Jean-Yves Tinevez⁵, Adeline Mallet⁶, Sue Vaughan⁷, Carsten Janke^{8,9}, Sergio Marco^{3,4} Philippe Bastin^{1,*}

Affiliations:

¹Trypanosome Cell Biology Unit, INSERM U1201, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

²Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Cellule Pasteur-UPMC, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

³Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, CNRS UMR9187, F-91405 Orsay, France

⁴Institut Curie, PSL Research University, INSERM U1196, F-91405 Orsay, France

⁵Imagopole, Citech, Institut Pasteur, 28 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

⁶Ultrapole, Citech, Institut Pasteur, 28 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

⁷ Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Health and Life Science, Oxford Brookes University

⁸ Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR3348, F-91405 Orsay, France

⁹Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, CNRS UMR3348, F-91405 Orsay, France

* Correspondence to pbastin@pasteur.fr

Abstract:

Cilia and flagella are composed of 9 doublet microtubules and are assembled by intraflagellar transport (IFT). In *Chlamydomonas*, each doublet is used as a double-track railway for anterograde and retrograde IFT train trafficking on the B and A tubules respectively. Using immunogold and Focus Ion Beam Scanning Electron Microscopy, we show that in the protist *Trypanosoma brucei*, IFT trains are restricted only to doublets 4 and 7. High-resolution imaging of live cells revealed that bidirectional IFT trafficking indeed takes place exclusively along two distinct tracks. This selectivity is controlled by increased polyglutamylation of doublets 4 and 7. Combined knockdown of multiple glutamylases interferes with flagellum formation and restricts IFT trafficking, with IFT trains and motors accumulating at the base of the organelle. Hence, differential tubulin polyglutamylation determines dedicated functions of individual microtubule doublets.

One sentence summary: In the trypanosome flagellum, intraflagellar transport trains travel on only two out of nine microtubule doublets whose identity is defined by tubulin polyglutamylation

Main text:

Cilia and flagella are organelles conserved in most eukaryotic cells that are involved in multiple sensing, motility or morphology functions. They share a unique architecture made of a cylinder of 9 doublet microtubules whose construction relies on intraflagellar transport (IFT). IFT is a process in which molecular motors transport multi-protein complexes (or IFT trains) that carry tubulin and other flagellar components to the tip of the organelle for assembly (1, 2). One or more kinesin motors are responsible for anterograde transport whereas a dynein motor returns the trains to the base of the organelle during retrograde transport. Quantification of IFT in animal cells, green algae or trypanosomes revealed remarkably high speed ($1-5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) and frequency ($\sim 1-3 \text{ trains}\cdot\text{s}^{-1}$) of IFT trains in both directions (3-6). In transmission electron microscopy (TEM), IFT trains appear as electron dense particles sandwiched between microtubule doublets and the flagellum membrane (7-9). Despite the high bi-directional trafficking frequency of relatively large trains, collisions have not been reported. Recently, an elegant study based on an analysis by correlative light electron microscopy of *Chlamydomonas* cells expressing a fluorescent IFT protein demonstrated that anterograde trains are positioned on the B-tubule of each microtubule doublet whereas retrograde trains are found on the A-tubule (10). This unique distribution provides a nice explanation to the absence of collisions.

In the protist *Trypanosoma brucei*, transmission electron microscopy (TEM) has shown that electron dense particles looking like IFT trains were encountered almost exclusively on microtubule doublets 4 and 7 of the axoneme (8, 11). Live cell analysis of trypanosomes expressing GFP::IFT52 revealed frequent fusion events between anterograde trains of different speeds, indicating trafficking on the same track (4). These results could be explained by the double-track model described above but with IFT trains limited to doublets 4 and 7. Another tantalising explanation would be that one of these two doublets serves as track for anterograde

transport and the other one for retrograde trafficking. To determine which hypothesis is correct, we first investigated IFT train distribution along the length of the trypanosome flagellum.

IFT train distribution in *Trypanosoma brucei*

IFT trains can adopt different configurations (9, 12) and recent results indicated that especially retrograde trains could easily be missed by conventional TEM (10). To formally prove that the previously described electron dense structures do indeed correspond to IFT trains and to evaluate the possibility that IFT proteins could be found along doublets other than 4 or 7 (fig. S1A), immunogold analysis of trypanosome flagella was performed using an antiserum against the IFT protein IFT22/RABL5 (13) and the positioning of gold particles found around the axoneme was investigated (fig. S1B). Gold particles were found mostly along the axoneme in cross sections and sometimes in longitudinal sections (fig. S1C). Most of them were present in proximity to doublets 4 and 7 (>65% of the total gold particles, n=107) whereas the neighbouring doublets 3, 6 and 8 hosted 7% each (fig. S1D). Less than 5% of the gold particles were detected per remaining doublets and at the central pair. Similar results were obtained using a polyclonal antibody against IFT172 (fig. S2). This formally confirms that electron dense structures correspond to IFT trains and that IFT proteins are located predominantly to doublets 4 and 7.

The twisted shape of the trypanosome flagellum (14) restricts the use of classic TEM tomography to short portions of the axoneme. To determine the 3-D positioning of the IFT trains, we turned to Focussed Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) that allows trimming a fixed sample over several μm (15). Wild-type trypanosomes were fixed and processed for FIB-SEM and observation of individual images revealed the typical cellular architecture (Fig. 1A, top). The flagellum could be recognised with its characteristic axoneme, the associated paraflagellar rod [PFR, a lattice-like structure tightly associated to the axoneme at doublets 5 and

6 (16) only present in Euglenozoa (17)] and the electron-dense IFT particles (Fig. 1A, bottom). Although individual dynein arms were difficult to recognise with this approach, the presence of the thick projection between doublet 7 and the PFR made doublet numbering non-ambiguous (Fig. 1A, arrow, compare with fig S1A). The orientation of the flagellum along the trypanosome cell body was striking from the stack, allowing the definition of proximal and distal part and hence the orientation of the dynein arms (movie S1). IFT particles were visible both at the level of doublet 4 and 7 (Fig. 1A, red) and were manually annotated (movie S1). Since several portions of flagella were encountered in a volume, axonemes were individually marked with different colours and IFT trains were indicated in red (Fig. 1B and movie S1). The trains were found all along doublets 4 and 7, exhibiting various sizes (Fig. 1B and fig. S3A). We detected 88 trains on doublet 4 and 73 trains on doublet 7 in 27 distinct flagella (total cumulated axoneme length 191.4 μm , average length of sections $7.09 \pm 3.73 \mu\text{m}$). The calculated average number of trains reported to the theoretical full length flagellum of 20 μm was ~ 8.8 on doublet 4 and ~ 7.6 on doublet 7, which is compatible with the expected numbers of 8.6 anterograde trains and 8.9 retrograde trains per flagellum deduced from their speed and frequency in live cells (4). The length of the trains was measured as $255 \pm 360 \text{ nm}$ (n=88) for those present on doublet 4 and $387 \pm 678 \text{ nm}$ (n=73) for those encountered on doublet 7 (fig. S3B,C). These values are in agreement with kymograph analysis of GFP::IFT52 movement that estimated the average length of fluorescent spots between 250 and 393 nm (4) and with data recently reported for *Chlamydomonas* (10, 12). The variability was expected given the frequent phenomena of fusion and fission (4). There was no statistical difference (two-sample t-statistic test, p-value 0.14) in the length of the trains between doublet 4 and 7, hence these results highlight that IFT trains do appear to be limited to doublets 4 and 7.

FIB-SEM is carried out on fixed samples and although it gives a global view of the distribution of IFT trains, it does not provide any information about their directionality. Since IFT

takes place on only two microtubule doublets that are separated by ~100 nm, we turned to live cell analysis by high-resolution imaging and Structured Illumination Microscopy (SIM)(18) to visualise IFT trafficking. Trypanosomes expressing GFP::IFT52 (4) were observed live and strikingly two parallel but distinct tracks were visible in each flagellum (Fig. 1C). Closer examination showed that both anterograde and retrograde IFT trafficking are taking place on each of these tracks (Fig. 1C and movie S2). Kymograph analysis revealed independent trafficking on each of these tracks and the superposition of these two images yielded kymographs (Fig. 1D) similar to those obtained upon analysis of videos acquired with conventional microscopy (4).

These images demonstrate that both anterograde and retrograde trains traffic on the same tracks that should correspond to doublets 4 and 7. Therefore, trypanosomes use a modified system compared to *Chlamydomonas* where IFT trains are detected on all 9 doublets (10). This difference could be the consequence of the presence of the PFR that is attached to the axoneme between doublets 4 to 7. However, physical hindrance by the PFR would not explain the absence of IFT trains on doublets 1, 2 and 9 that are not in contact with the PFR. Thus, we propose a different scenario where the restriction of IFT to two doublets would represent an evolutionary advantage by liberating the other seven doublets from constraints imposed by IFT train presence, thereby offering the potential for acquiring other structures such as the PFR or the flagellar connector (11). The restriction of IFT to specific doublets could be of interest for cilia in other organisms, such as in the sensory neurons of *C. elegans*. These are composed of a middle segment made of 9 doublet microtubules whereas the distal segment is only composed of singlet microtubules (continuation of A-tubule from the middle segment), yet bidirectional IFT was observed on both segments without collisions (3). If some microtubules were used only for anterograde IFT and others for retrograde IFT, it would provide a way to avoid collisions (19).

Microtubule doublets 4 and 7 are differentially polyglutamylated

What makes these two doublets different from the others? One possibility is that they contain biochemical information that is preferentially recognised by the IFT molecular motors. Obvious candidate mechanisms are post-translational modifications of tubulin such as (poly)glycylation or (poly)glutamylated, of which the latter has been shown to act as a regulator of molecular motors (20, 21). These modifications are overwhelmingly represented in cilia and flagella in multiple species and their alteration has been reported to affect structure and formation of these organelles (22-26). Mass spectrometry showed that trypanosome tubulin is extensively polyglutamylated, with variable numbers of glutamate residues added to both cytoplasmic and flagellar microtubules. In contrast, no glycylation was detected (27). This absence of glycylation was later confirmed by the absence of glycylation enzymes in the genome of *T. brucei* (24, 25). We thus focused on polyglutamylated, using two antibodies to characterise its distribution in trypanosomes: the GT335 monoclonal antibody that detects all forms of glutamylated tubulin no matter the length of the chain (28) and an anti-polyE antiserum that binds selectively to polyglutamate chains longer than 3 glutamate residues (29). By immunofluorescence, GT335 stained the cell body and the flagellum as expected (30)(Fig. 2A). We then turned to immunoelectron microscopy on detergent-extracted trypanosome cytoskeletons (Fig. 2B). This revealed that GT335 stained equally the nine doublets and the central pair, each sharing about 10% of the total gold particles (Fig. 2C). The polyE antibody also stained the cell body and the flagellum by immunofluorescence (Fig. 2D) and scanning immunoelectron microscopy revealed a positive signal on the sub-pellicular microtubules and on both mature and elongating flagella where gold particles were only detected on the axoneme but not on the PFR (fig. S4). In striking contrast to GT335, the polyE signal by TEM immunogold was overrepresented on doublets 4 and 7 with close to 50% of the gold particles compared to less than 10% for each of the other doublets (Fig.

2E and F). This localisation matching the one of the IFT trains, it is tempting to speculate that higher levels of polyglutamylation of doublets 4 and 7 are associated to the selective presence of IFT trains.

Polyglutamylation is required for flagellum assembly

To test this hypothesis, we targeted tubulin polyglutamylation in the flagellum. Addition of glutamate residues to the C-terminal tail of tubulins is catalysed by glutamylases of the TTLL (Tubulin Tyrosine Ligase-Like) enzyme family (31, 32). In *T. brucei*, at least 8 genes encode putative TTLL enzymes among which seven showed clear homology to previously identified mammalian glutamylases. Moreover, previous work had demonstrated glutamylating activity for some of these enzymes, and initial functional analyses indicated some redundancy (30). To efficiently reduce tubulin glutamylation, we generated a cell line expressing in a tetracycline-dependent manner a long double-stranded RNA capable of simultaneous targeting of all TTLLs that were classified as glutamylases by sequence homology or direct experimental evidence, which are TTLL1, 4A, 4B, 4C, 6A, 6B & 9. Such a combined RNAi approach was used successfully for other trypanosome genes (33). In the absence of tetracycline, the *TTLL1469^{RNAi}* cell line grew almost normally but triggering RNAi led to rapid growth arrest (fig S5). Morphological analysis by scanning electron microscopy of non-induced cells showed the typical elongated trypanosome shape, with the flagellum attached to the cell body (Fig. 3A and fig S6A). When these cells enter the cell cycle, a new flagellum grows from the posterior end and follows the path of the existing flagellum (34)(fig S6A, orange arrowhead). Once the flagellum has reached ~85% of its mature length, cytokinesis is initiated at the anterior end (35). After one day in RNAi conditions, two new phenotypes were detected: 21% of the cells showed an excessive elongation of the posterior end of the cell, indicative of cytoskeletal defects (fig. S6B, left) and

16% of them exhibited a new flagellum that was detached from the cell body and looked shorter than usual (Fig. 3A and fig S6B, right panel). The proportion of cells with a detached flagellum rose to 37% after two days in RNAi conditions (Fig. 3A, fig. S6C and D). RNAi induction was not pursued further because of significant cell mortality. DAPI staining showed that nuclear and kinetoplast (the large granule containing the DNA from the single mitochondrion) DNA duplicated normally but cell division did not happen (Fig. 3B-D), which explains the growth arrest. Immunofluorescence with GT335 and the anti-polyE showed that microtubules present within existing cytoplasmic and flagellar microtubules remained polyglutamylated (Fig. 3B and C). This observation is in agreement with the mode of replication of the trypanosome cytoskeleton that grows by intercalation and elongation at the posterior end without disassembling the existing corset (14, 36). The short new flagellum was still positive for tubulin polyglutamylation, although the signal appeared systematically reduced (compare old and new flagella at Fig. 3B and C). In agreement with these observations, western blot analysis using GT335 showed a modest but reproducible reduction in tubulin polyglutamylation (10-35% with 4 different antigen concentrations, fig. S7). These data indicate that inhibition of TTL1469 interferes with microtubule formation but not with their maintenance in *T. brucei*, presumably because existing microtubules remain poly-glutamylated.

We focussed on the role of tubulin polyglutamylation in the flagellum and its contribution to the formation of cytoplasmic microtubules will be reported elsewhere. To evaluate the impact of TTL1469 knockdown on flagellum length, control and RNAi-induced cells were fixed and stained with Mab22 and Mab25 antibodies that recognise the basal body and the axoneme, respectively (Fig. 3D). Particular attention was paid to cells about to divide that possess a mature flagellum of $18.3 \pm 2.28 \mu\text{m}$ and a growing flagellum of $12.8 \pm 1.7 \mu\text{m}$ in non-induced controls (Fig. 3E). After one day in RNAi conditions, the length of the old flagellum was unchanged but

that of the new flagellum was reduced to 11.4 μm with a large standard deviation of 3.4 μm due to the emergence of cells exhibiting really short new flagella, a feature that was never encountered in controls (Fig. 3D and E)(35). Two days after RNAi induction, late dividing cells (with 2 kinetoplasts and 2 nuclei or 2K2N) cells possessed 3 or 4 basal bodies. Remarkably, many new basal bodies failed to assemble a flagellum or constructed only tiny flagella whose average length was $7.1 \pm 4.5 \mu\text{m}$ (Fig. 3D yellow arrows, and E). In summary, reduction of *TTL1469* amounts led first to the construction of shorter flagella and second to inhibition of flagellum formation despite normal duplication of the basal bodies.

Reducing tubulin polyglutamylation interferes with IFT

The profile of *TTL1469* knockdown shares remarkable similarities with knockdown of the expression of various *IFT* genes that also leads first to formation of short flagella and next to absence of a new flagellum (8, 37, 38). We therefore used TEM to examine the structure of the flagella and looked for IFT train distribution in *TTL1469^{RNAi}* cells induced for 48 hours. Since the new flagellum is detached, it can be discriminated from the mature flagellum on cross-sections by the absence of a nearby cell body. Cross sections through detached flagella of induced *TTL1469^{RNAi}* cells showed a variety of construction defects including in the PFR structure and shape (Fig. 4A), the central pair orientation (Fig. 4A, B) or composition (Fig. 4C) or the peripheral doublets (Fig. 4D). These multiple defects are indicative of problems in flagellum construction. IFT trains were still detected but at a much lower frequency: only 15% of the sections for the mature flagellum and less than 10% for the new flagellum, compared to close to 50% in the control cell line (Fig. 4E).

IFT proteins and motors are normally concentrated at the base of the flagellum and distributed along the length of the flagellum, in addition to their presence in the trypanosome cell

body (8, 38, 39). Double staining of non-induced cells with FTZC, a marker of the transition zone (40) and with IFT proteins or motors confirmed that these are present at the transition fibres, exactly at the interface between the cell body and the flagellar compartment (Fig. 4F and G). When *TLL1469^{RNAi}* cells were induced for one day, the IFT motors kinesin II (KIN2A) and dynein (DHC2.1) were still present in the mature flagellum. In contrast, their abundance in the shorter new flagellum was reduced and the distribution was more heterogeneous (compare old and new flagella in Fig. 4F and G). However, the most striking phenotype was the increased concentration of these IFT motors at the base of the flagellum, always below the marker for the transition zone. This was also the case for *TLL1469^{RNAi}* cells induced for two days in which new basal bodies were present without a new flagellum (data not shown). Similar profiles were observed for IFT proteins such as IFT22/RABL5 (Fig. 4H) or IFT172 (fig. S8). IFT proteins and motors therefore failed to access flagella efficiently when polyglutamylation is reduced.

Outlook

Our results show that inefficient tubulin polyglutamylation does not interfere visibly with basal body duplication or membrane anchoring since the flagellum transition zone marker FTZC still produced a positive signal (Fig. 4F and G). However, inefficient tubulin polyglutamylation is accompanied by a reduction in the abundance of IFT motors and proteins in the new flagellum that is concomitant to reduced organelle elongation. At advanced stages of RNAi, IFT proteins fail to gain access to the flagellum and the construction is halted or severely inhibited, similarly to what has been observed in the absence of IFT proteins (37). To explain these results, we propose that selective polyglutamylation of microtubule doublets 4 and 7 favours recruitment of IFT motors and associated trains. Insights into a potential molecular mechanism are provided by *in vitro* experiments using engineered tubulin with various post-translational modifications.

These data revealed that the recruitment and processivity of the homodimeric IFT kinesin motor KIF17 was stimulated by polyglutamylation whereas it was reduced by tubulin tyrosination (21). In trypanosomes, kinesin 2 is very likely homodimeric (41) and during the construction of the new flagellum, the tip of the axoneme microtubules contains exclusively tyrosinated tubulin (36). This could inhibit kinesin recruitment and IFT. We propose that selective enrichment of polyglutamylation on doublets 4 and 7 could relieve this inhibition and allow access of IFT motors and consequently IFT trains to move specifically on these two microtubule doublets. Selective polyglutamylation could therefore be a way to dedicate flagellar microtubules to specific functions. Our work reveals that IFT trains in the trypanosome flagellum use only two microtubule doublets for bidirectional IFT and that these tracks are defined by specific tubulin polyglutamylation. This provides a striking example of how differential post-translational modification can confer dedicated functions to selected microtubules.

References and notes:

1. K. G. Kozminski, K. A. Johnson, P. Forscher, J. L. Rosenbaum, A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5519-5523. (1993).
2. J. M. Craft, J. A. Harris, S. Hyman, P. Kner, K. F. Lehtreck, Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism. *J Cell Biol* **208**, 223-237 (2015).
3. J. J. Snow *et al.*, Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on *C. elegans* neurons. *Nat Cell Biol* **6**, 1109-1113 (2004).
4. J. Buisson *et al.*, Intraflagellar transport proteins cycle between the flagellum and its base. *J Cell Sci* **126**, 327-338 (2013).
5. C. Iomini, V. Babaev-Khaimov, M. Sassaroli, G. Piperno, Protein particles in *Chlamydomonas* flagella undergo a transport cycle consisting of four phases. *J Cell Biol* **153**, 13-24 (2001).
6. T. Y. Besschetnova *et al.*, Identification of signaling pathways regulating primary cilium length and flow-mediated adaptation. *Curr Biol* **20**, 182-187 (2010).
7. D. L. Ringo, Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* **33**, 543-571 (1967).
8. S. Absalon *et al.*, Intraflagellar Transport and Functional Analysis of Genes Required for Flagellum Formation in Trypanosomes. *Mol Biol Cell* **19**, 929-944 (2008).
9. G. Pigino *et al.*, Electron-tomographic analysis of intraflagellar transport particle trains in situ. *J Cell Biol* **187**, 135-148 (2009).
10. L. Stepanek, G. Pigino, Microtubule doublets are double-track railways for intraflagellar transport trains. *Science* **352**, 721-724 (2016).

11. J. L. Hoog *et al.*, 3D Architecture of the Trypanosoma brucei Flagella Connector, a Mobile Transmembrane Junction. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004312 (2016).
12. E. Vannuccini *et al.*, Two classes of short intraflagellar transport train with different 3D structures are present in Chlamydomonas flagella. *J Cell Sci* **129**, 2064-2074 (2016).
13. C. Adhiambo, T. Blisnick, G. Toutirais, E. Delannoy, P. Bastin, A novel function for the atypical small G protein Rab-like 5 in the assembly of the trypanosome flagellum. *J Cell Sci* **122**, 834-841 (2009).
14. T. Sherwin, K. Gull, The cell division cycle of Trypanosoma brucei brucei: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **323**, 573-588 (1989).
15. C. Kizilyaprak, J. Daraspe, B. M. Humbel, Focused ion beam scanning electron microscopy in biology. *J Microsc* **254**, 109-114 (2014).
16. L. C. Hughes, K. S. Ralston, K. L. Hill, Z. H. Zhou, Three-dimensional structure of the Trypanosome flagellum suggests that the paraflagellar rod functions as a biomechanical spring. *PLoS One* **7**, e25700 (2012).
17. N. Portman, K. Gull, The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *International journal for parasitology* **40**, 135-148 (2010).
18. D. Li *et al.*, Advanced Imaging. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science* **349**, aab3500 (2015).
19. S. Kuhns, O. E. Blacque, Cilia Train Spotting. *Dev Cell* **37**, 395-396 (2016).
20. A. Konno, M. Setou, K. Ikegami, Ciliary and flagellar structure and function--their regulations by posttranslational modifications of axonemal tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* **294**, 133-170 (2012).

21. M. Sirajuddin, L. M. Rice, R. D. Vale, Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* **16**, 335-344 (2014).
22. N. Pathak, C. A. Austin, I. A. Drummond, Tubulin tyrosine ligase like genes TTL3 and TTL6 maintain zebrafish cilia structure and motility. *J Biol Chem* **286**, 11685-11695 (2011).
23. J. E. Lee *et al.*, CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. *Nat Genet* **44**, 193-199 (2012).
24. D. Wloga *et al.*, TTL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev Cell* **16**, 867-876 (2009).
25. K. Rogowski *et al.*, Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglucylation. *Cell* **137**, 1076-1087 (2009).
26. M. Bosch Grau *et al.*, Tubulin glucylases and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia. *J Cell Biol* **202**, 441-451 (2013).
27. A. Schneider, U. Plessmann, K. Weber, Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei* are extensively glutamylated. *J Cell Sci* **110**, 431-437 (1997).
28. A. Wolff *et al.*, Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur J Cell Biol* **59**, 425-432 (1992).
29. K. Rogowski *et al.*, A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* **143**, 564-578 (2010).
30. M. Casanova *et al.*, Characterisation of polyglutamylases in trypanosomatids. *International journal for parasitology*, (2014).
31. C. Janke *et al.*, Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* **308**, 1758-1762 (2005).

32. J. van Dijk *et al.*, A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylolation. *Mol Cell* **26**, 437-448 (2007).
33. Z. Wang, J. C. Morris, M. E. Drew, P. T. Englund, Inhibition of trypanosoma brucei gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J Biol Chem* **275**, 40174-40179 (2000).
34. F. F. Moreira-Leite, T. Sherwin, L. Kohl, K. Gull, A trypanosome structure involved in transmitting cytoplasmic information during cell division. *Science* **294**, 610-612. (2001).
35. D. R. Robinson, T. Sherwin, A. Ploubidou, E. H. Byard, K. Gull, Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J Cell Biol* **128**, 1163-1172. (1995).
36. T. Sherwin, K. Gull, Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell* **57**, 211-221 (1989).
37. L. Kohl, D. Robinson, P. Bastin, Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *Embo J* **22**, 5336-5346 (2003).
38. J. B. Franklin, E. Ullu, Biochemical analysis of PIFTC3, the Trypanosoma brucei orthologue of nematode DYF-13, reveals interactions with established and putative intraflagellar transport components. *Mol Microbiol* **78**, 173-186 (2010).
39. T. Blisnick *et al.*, The intraflagellar transport dynein complex of trypanosomes is made of a heterodimer of dynein heavy chains and of light and intermediate chains of distinct functions. *Mol Biol Cell* **25**, 2620-2633 (2014).
40. F. Bringaud *et al.*, Characterization and disruption of a new Trypanosoma brucei repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition. *Mol Biochem Parasitol* **111**, 283-297 (2000).

41. B. Morga, P. Bastin, Getting to the heart of intraflagellar transport using *Trypanosoma* and *Chlamydomonas* models: the strength is in their differences. *Cilia* **2**, 16 (2013).

Acknowledgements:

We thank Derrick Robinson and Chris Tschudi for generous gifts of antibodies, Sudarshan Gadadhar for antibody purification and characterization and Gérard Pehau-Arnaudet (Ultrapole) for training and help for electron microscopy; Alexandre Benmerah, Eloïse Bertiaux, Michel Bornens, Bénédicte Durand, Keith Gull, Jamin Jung, Linda Kohl, Pietro Lupetti, Gaia Pigino and Félix Rey for critical reading of the manuscript and useful suggestions. SIM microscopy work was performed at the Advanced Imaging Center, Janelia Research Campus, jointly sponsored by the Howard Hughes Medical Institute and the Gordon & Betty Moore Foundation. We are grateful to Lin Shao for training and invaluable advices.

C.F. is supported by fellowships from French National Ministry for Research and Technology (doctoral school CDV515) and from La Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20150532023). This work is funded by ANR grants (11-BSV8-016 and 14-CE35-0009-01) and by La Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20150734356). The work of CJ was supported by the program “Investissements d’Avenir” launched by the French Government and implemented by ANR (ANR-10-LBX-0038, ANR-10-IDEX-0001-02 PSL), by the Institut Curie, the French National Research Agency (ANR) award ANR-12-BSV2-0007, the INCA grant 2014-1-PL BIO-11-ICR-1. Live imaging at the AIC, Janelia Farm Research Campus was supported by the Citech (Centre d’Innovation et Recherche Technologique) of the Institut Pasteur.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Fig. 1: IFT trains are present on doublets 4 and 7 and travel in both directions on each. (A).

Single images issued from a stack of wild-type trypanosomes obtained by FIB-SEM (movie S1). Top row, low magnification of sections numbers 475, 424 and 374 with indicated organelles (ER, endoplasmic reticulum, G, glycosomes, M, mitochondrion). In this case, the progression is from posterior to anterior of the cell. Bottom row, higher magnification of the flagellum cross-section from to the above image with the axoneme (A) and the PFR. The arrow indicates the projection between doublet 7 of the axoneme and the PFR. IFT particles are circled in red on doublet 4 (left) or 7 (right). **(B).** Several portions of flagella reconstructed by FIB-SEM analysis of wild-type (WT) procyclic trypanosomes. Each axoneme is stained with a different colour and the IFT trains are shown in red (see the full 3-D reconstruction in movie S1). Doublet numbers and position of the basal body (BB) and the tip are indicated for the dark green flagellum. **(C).** Still images of a video of live trypanosomes expressing the GFP::IFT52 fusion protein imaged at high-resolution (movie S2). The top panel shows images of the whole cell where two tracks of IFT trains are clearly visible and drawn in yellow on the right image. The bottom panels show a magnification of the region of interest (white rectangle) at the indicated times. Green and red arrowheads indicate the position of trains on the left and right tracks, respectively. Darker arrowheads point at retrograde trains. **(D).** Kymograph analysis of IFT trafficking from movie S2 showing left (red) and right (green) track, followed by the merged image.

Fig. 2: Microtubules 4 and 7 are differentially glutamylated. (A,D).

Immunofluorescence staining of wild-type trypanosomes with GT335 **(A)** or the anti-polyE **(D)**. The top panels show phase contrast and DAPI (cyan) image whereas the bottom panels show the fluorescence signal (white). **(B,E).** Post-embedding immuno-gold staining of detergent-extracted cytoskeletons from wild-type trypanosome sections stained with GT335 **(B)** or the anti-polyE **(E)**. Position of gold

particles is shown with white arrowheads. (C,F) Graphs showing the proportion of gold particles on the 9 doublet microtubules and the central pair (CP) in samples stained with (C) GT335 diluted 1/5,000 (n=290 flagellum cross-sections, total of 4 separate experiments) or (F) the anti-polyE diluted 1/2,500 (n=165, with one representative experiment shown out of 4 with 3 different dilutions: 1/500-1/2,500-1/50,000). Since more than one particle can be encountered on the same doublet, counts were made per number of gold particles (red) or per event (positive signal no matter the number of particles, blue) per microtubule.

Fig. 3: Interfering with tubulin poly-glutamylolation reduces flagellum elongation. (A) SEM analysis of non-induced (left), 24h (middle) and 48h-induced *TLL1469^{RNAi}* cells. Old and new flagella are indicated with white and orange arrows, respectively. B, C. IFA with GT335 (B) or the anti-polyE (C) reveal maintenance of glutamylation on existing microtubules but reduced staining (white) on new flagella. (D) IFA with Mab25 (axoneme marker, red) and Mab22 (basal body marker, yellow). After 48h of induction, *TLL1469^{RNAi}* cells possess basal bodies without flagella (yellow arrows). (E) The length of the old (OF, open circles) and of the new (NF, closed circles) flagellum was measured in cells possessing two nuclei *TLL1469^{RNAi}* at the indicated times of induction (n=50).

Fig. 4: Flagellum structure and IFT distribution are affected by reduced tubulin glutamylation.

(A-E) TEM analysis of 48h-induced *TLL1469^{RNAi}* cells showing from left to right defects in PFR structure, central pair (CP) orientation, central pair composition and peripheral doublets (PD). (E) Data were quantified on the right with attached and detached flagella corresponding to the old flagellum and the new flagella assembled before and after RNAi, respectively (n=50). The

frequency of IFT trains is also presented. The recipient cell line 29-13 was used as a positive control. (F,G) IFA was performed on control or induced *TLL1469^{RNAi}* cells with antibodies recognising the kinesin 2 subunit KIN2A (F) or the dynein-2 subunit DHC2.1 (G)(white, green in the insert) and the transition zone marker FTZC (insert, red). The phase contrast image is merged with the DAPI staining (cyan). (H) IFA with the train component IFT22 shown in white.

Supplementary Materials:

Materials and Methods

Figures S1-S8

Movies S1-S2

Figures

Figure 1

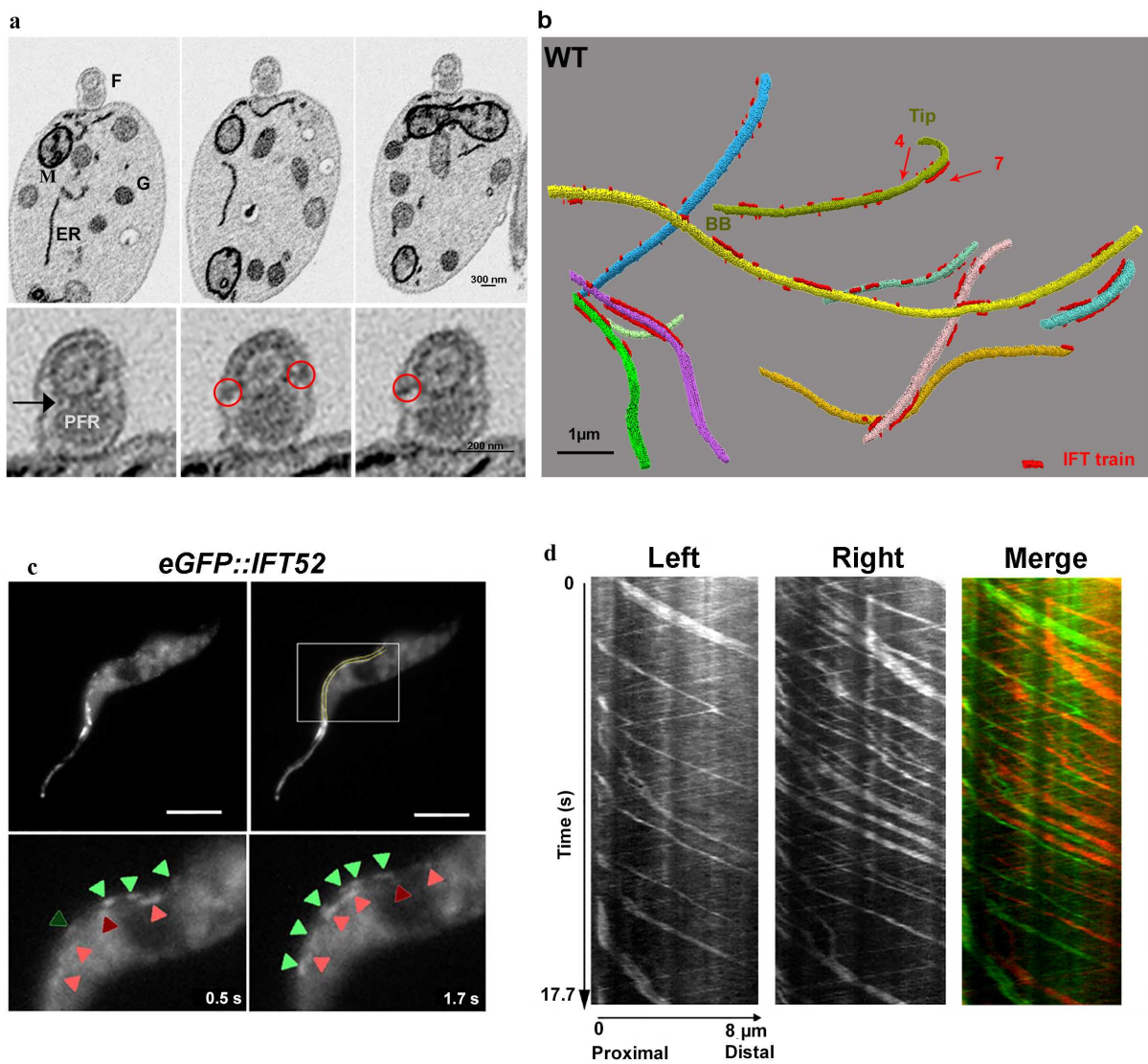


Fig. 1: IFT trains are present on doublets 4 and 7 and travel in both directions on each.

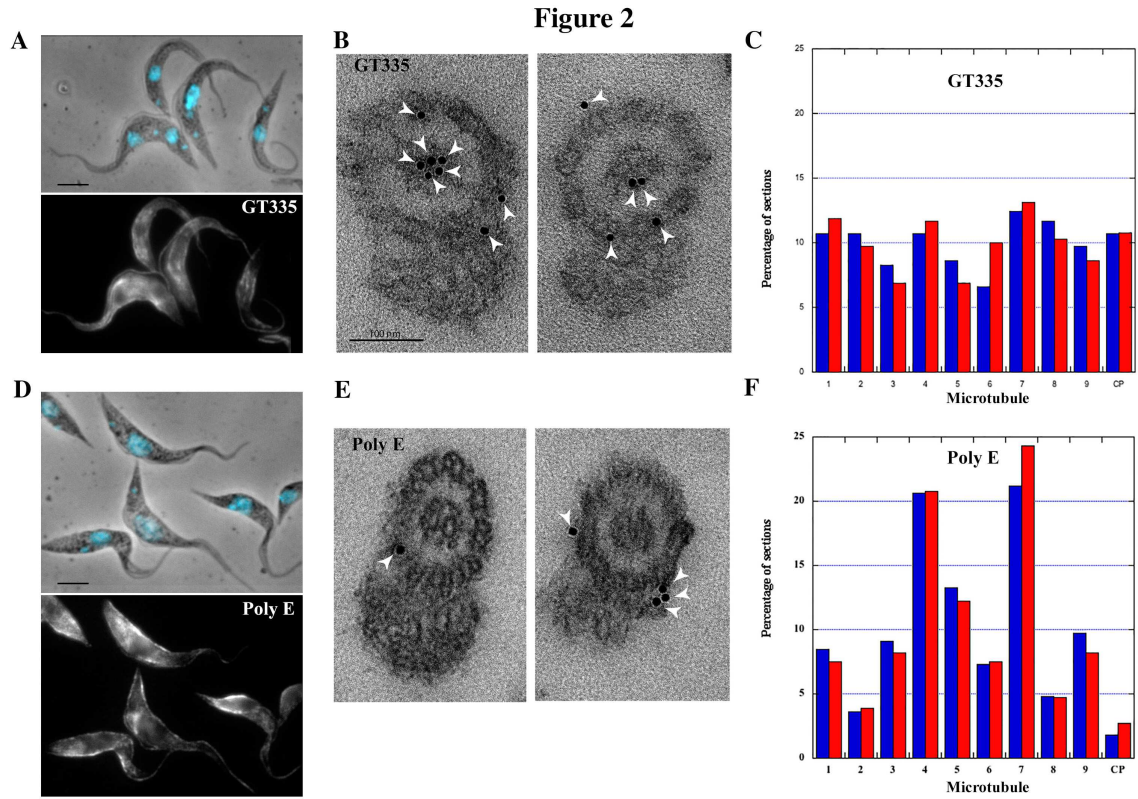


Fig. 2: Microtubules 4 and 7 are differentially glutamylated.

Figure 3

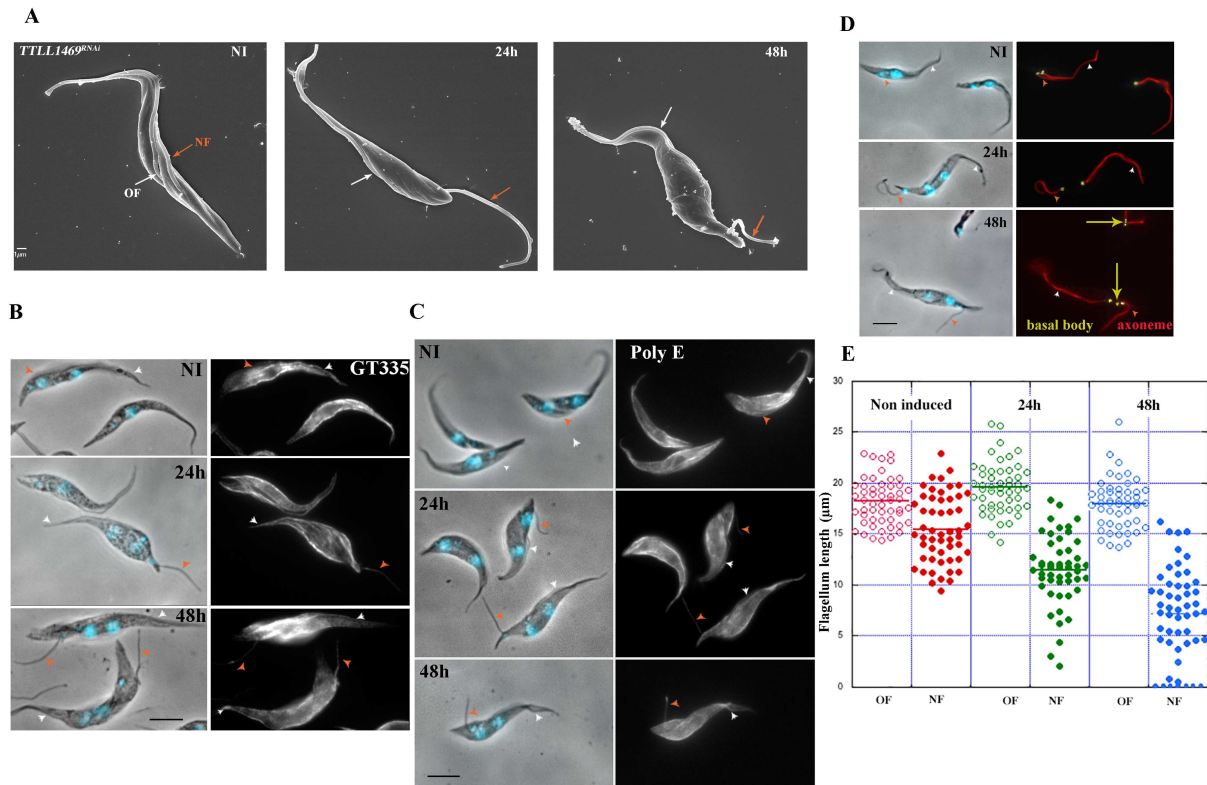


Fig. 3: Interfering with tubulin poly-glutamylation reduces flagellum elongation.

Figure 4

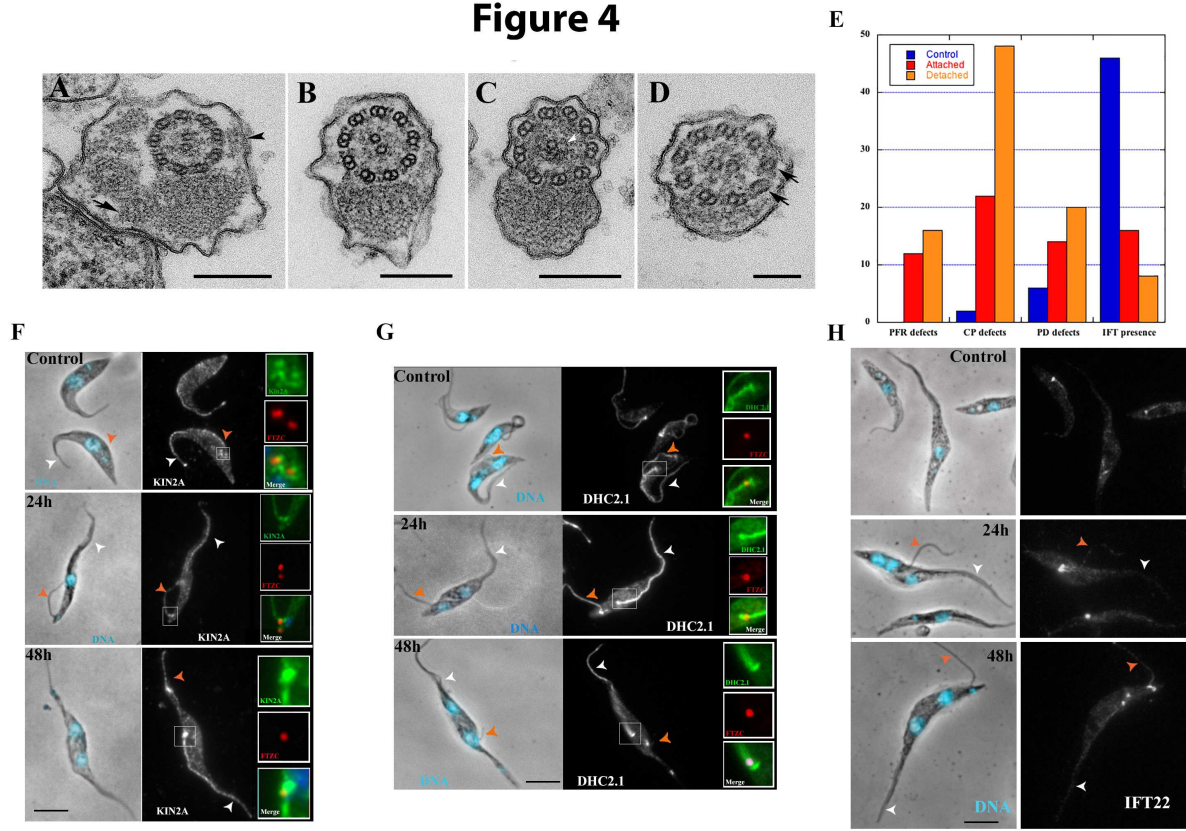


Fig. 4: Flagellum structure and IFT distribution are affected by reduced tubulin glutamylation.

Materials and Methods

Plasmid construction and transformation in trypanosomes

The same *TTL* gene nomenclature was used as in (1). The 7 *TTL* genes likely to have enzymatic activity are spread in different regions of the genome, preventing a strategy by classic gene deletion. We therefore turned to RNAi knockdown but since the *TTL* genes do not share common sequences at the DNA level, targeting all of them or even several of them with a common piece of double-stranded RNA was not possible. Therefore fragments of each were synthesised and annealed for insertion in the pZJM plasmid (2) allowing tetracycline-inducible expression of the corresponding double-stranded RNA. Chemical synthesis of a large piece of DNA was carried out (Genecust Europe, Luxembourg) with in the following order segments of *TTL1* (position in the nucleotide coding sequence: 869-1176), *TTL9* (87-473), *TTL6A* (528-863), *TTL6B* (888-1213), *TTL4A* (311-411), *TTL4B* (888-1213) and *TTL4C* (1607-2000). These segments were selected based on the RNAit software (3). The pZJMTTL1469 vector was linearized by NotI and integrated in the inverted rDNA spacer that is supposed to be transcriptionally silent, ensuring that dsRNA production is controlled by tetracycline addition (4). The plasmid was introduced in the 29-13 cell line expressing a YFP::IFT81 fusion protein from the *IFT81* locus (5) by Nucleofector technology (Lonza, Italy) as described (6). Transfectants were grown in media with the appropriate antibiotic concentration and clonal populations were obtained by limiting dilution. For unknown reasons, the YFP fusion protein was not detected anymore after selection. Cell culture growth was monitored daily with an automatic Muse cell analyzer (Merck Millipore, Paris).

Trypanosome cell lines and cultures

Cell lines used for this work were derivatives of *T. brucei* strain 427 and cultured in SDM79 medium supplemented with hemin and 10% foetal calf serum (7). For RNAi, expression of double-stranded RNA is controlled by two tetracycline-inducible T7 promoters facing each other in the pZJM vector (2) integrated in the rDNA locus of 29-13 cells that express the T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor (8). Addition of tetracycline (1µg/mL) to the medium induces expression of sense and anti-sense RNA strands that can anneal to form double-stranded RNA (dsRNA) and trigger RNAi. IFT imaging in live cells was carried out with a cell line expressing GFP::IFT52 from the pHD430 vector (9) under the control of the tet-repressor (produced by plasmid pHD360 (4)) and a Tandem Tomato::IFT81 fusion produced from its endogenous locus (5).

Immuno-electron microscopy

Whole cells or detergent-extracted cytoskeletons from trypanosomes (50 ml of cultures at 5.10^6 cells/ml) were washed in 0.1M PIPES (pH 7.0) and fixed for 2 h with 1% paraformaldehyde (made fresh) and 0.5% glutaraldehyde in 0.1M PIPES. For GT335 and the anti-polyE, wild-type trypanosomes were used whereas for the anti-IFT22 and anti-IFT172, the non-induced *IFT140^{RNAi}* cell line was used (9). Cells were washed 5 times in 0.1M PIPES and dehydrated in graded series of ethanol. Samples were embedded in LR white resin first in a 1:1 ratio with ethanol for 2 h, next in 100% resin overnight at 4°C and then three times for 30 min before incubation at 50-60°C for 24 h. Sections were

incubated for 1 h in PBS containing 2% BSA and 0.1% acetylated BSA (BSA-c, Aurion, The Netherlands) for blocking and then incubated in PBS-BSAc 0.1% containing the anti-IFT22 (1/100) or the anti-IFT172 (1/100) for IFT protein detection on whole cells, or with GT335 (1/5,000) or the anti-poly E (1/2,500, 1/5,000 or 1/50,000) for detection of tubulin glutamylation on cytoskeletons. Sectioning was carried out as above and samples were washed 5 times 6 minutes in PBS-BSAc 0.1% before incubation with secondary antibodies detecting either mouse (IFT22, IFT172, GT335) or rabbit (poly E) IgG coupled to 10 nm gold particles () at 1/200 dilution. Samples were washed 5 times 6 minutes in PBS-BSAc 0.1% and then twice for 5 minutes in PBS alone. Grids were fixed for 5 minutes in PBS containing 1% glutaraldehyde, washed 3 times 5 minutes in water and for 45 minutes with uranyl acetate 4%, rinsed 5 times 5 minutes in water and treated with lead citrate 80 mM for 5 minutes and rinsed 5 times 5 minutes in water. Samples were observed and images acquired as above.

Focus Ion Beam-Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM)

Trypanosomes were fixed directly in medium with 2.5% glutaraldehyde (Sigma) for 1h. Samples were washed 3 times with 0.1M HEPES buffer (5 min each) and post fixed with 1% osmium (EMS) / 1.5% potassium ferrocyanide (Sigma) for 1h. Samples were treated for 30 min with 1% tannic acid (Sigma) and 1h with 1% osmium tetroxide (EMS), rinsed in water and dehydrated in ethanol (Sigma) series of 25%, 50%, 75%, 90% and 100% (15 min each). Cells were embedded in epoxy resin (EMS) after 48h at 60°C of polymerization. Embedded samples were mounted on aluminum stubs. Blocks were trimmed with glass knives in a way that vertical faces allowed lateral milling by Focus Ion Beam FIB. Tomographic datasets were obtained using a FESEM Zeiss Auriga microscope equipped by a CrossBeam workstation (Carl Zeiss) and acquired using ATLAS 3D software (Carl Zeiss). For milling with the focused Ga-ion beam, the conditions were as follows: 0.5–1nA milling current of the Ga-emitter, leading to the removal of 10 nm at a time from the epoxy resin. SEM images were recorded with an aperture of 60 μm in the high-current mode at 1.5 or 2 kV of the in-lens EsB detector with the EsB grid set to -1000 V. Depending on the respective magnification, voxel size was in a range between 10 and 20 nm in x/y and 10 nm in z . Contrast of the images was inverted to conventional bright field.

Data processing and 3-D-reconstruction

Alignment of image stacks was done with the open source software ImageJ for data alignment (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) and Amira Software for visualization (FEI, V 5.4.3). Segmentation and 3-D reconstructions were performed semi-automatically using Amira software and were corrected manually.

Measurement of IFT trains

Segmentation results were manually separated to isolate individual cells with the flagella and the corresponding IFT trains. Segmentations of flagella and IFT trains were then skeletonized in ImageJ using the Skeletonize 3D plugin. The number of voxels composing the generated skeletons was computed in ImageJ using the Object Counter 3D plugin. The length of analysed biological structures (flagella and IFT trains) was

calculated as the number of voxels constituting the structure multiplied by the size of the voxel.

High-resolution imaging of IFT trafficking

The cell line expressing GFP::IFT52 and Tdt::IFT81 was grown in standard conditions and samples were mounted between glass and coverslip for observation on a custom built microscope (10) based on a Zeiss AxioObserver D1 stand equipped with an UAPON100XOTIRF 1.49 NA objective (Olympus) and an Orca Flash 4.0 sCMOS camera (Hamamatsu). GFP fluorophores were excited with a 488 nm laser (500 mW, SAPPHIRE 488-500, Coherent) and detected through an adequate emission filter (BP 500-550 nm). The sequence contains a series of 300 images exposed for 20 ms each, for a total duration of 17.7 s. Kymographs of individual paths of IFT were extracted using Fiji (11). The two IFT tracks were manually annotated as segmented lines on the temporal maximal intensity projection of the sequence. These two lines were then used to re-slice the sequence data, generating the kymographs.

Immunofluorescence (IFA) imaging

Cultured parasites were washed twice in SDM79 medium without serum and spread directly onto poly-L-lysine coated slides. The slides were air-dried for 10 min, fixed in methanol at -20°C for 5 min and rehydrated for 20 min in PBS. For immunodetection, slides were incubated with primary antibodies diluted in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA) for 1 hour at room temperature or at 37°C in a humid chamber. Slides were washed in PBS and appropriate subclass-specific secondary antibodies coupled to Alexa 488 or Alexa 594 (Invitrogen), and Cy3 or Cy5 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) were added using a 1:400 dilution in PBS with 0.1% BSA. After 45 min incubation, slides were washed in PBS then 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ($2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) staining of the nucleus and the kinetoplast was performed. Slides were mounted using ProLong antifade reagent (Invitrogen). Samples were observed with a DMI4000 Leica microscope, and images were acquired with a Horca 03G (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) camera. In the case of RNAi mutants, all IFA signals were normalized using the signal obtained in non-induced controls as a reference.

The monoclonal antibody MAb25 (IgG2a)(12), which specifically recognizes the axoneme protein TbSAXO1 (13), was used as flagellum marker and the MAb22 that detects an unidentified protein present on the fibres linking the basal body to the kinetoplasts was used as marker of the basal body (14). A monoclonal antibody detecting IFT172 was used at 1:200 dilution (15), and mouse polyclonal antibodies against DHC2.1 (15), RABL5/IFT22 (16) and the homodimeric KIN2A (Bonney et al., unpublished) were used at a 1:100 dilution. For double staining with the rabbit anti-FTZC (dilution 1:500)(17), specific secondary antibodies were used against rabbit IgG Fab fragment coupled to AlexaFluor 488 (1:400) in combination with either secondary anti-mouse IgG1 coupled to Cy3 (Jackson) or secondary anti-mouse total IgG coupled to Cy3 both at a 1:400 dilution.

Transmission electron microscopy (TEM)

For transmission electron microscopy (TEM), cells were fixed directly in medium during 10 min at room temperature in 2.5% glutaraldehyde (Glutaraldehyde 25% stock solution,

EM Grade, Electron Microscopy Sciences). Centrifugation was carried out at 4°C for 5 min at 580 g. The supernatant was discarded and the pellet was fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% PFA (paraformaldehyde 32% stock solution, EM Grade, Electron Microscopy Sciences) in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and contrasted with OsO₄ (2%) (Osmium tetroxide 4% Aqueous solution, Electron Microscopy Sciences) in cacodylate buffer. After serial dehydration with ethanol solutions, samples were embedded in Agar 100 (Agar Scientific, Ltd., United Kingdom) and left to polymerize at 60°C for 2 days. Ultrathin sections (50–70 nm thick) were collected on Formvar-carbon-coated nickel grids using a Leica EM UC6 ultra-microtome and stained with uranyl acetate (2%, w/v) (Uranyl Acetate dehydrate, Electron Microscopy Sciences) and lead citrate (80 mM, home made buffer). Observations were made on a Tecnai BioTWIN 120 cryo electron microscope (FEI) and images were captured with a MegaView II camera (Arecont Vision, France) and processed with AnalySIS and Adobe Photoshop CS4 (San Jose, CA).

Scanning electron microscopy

Intact or detergent-extracted trypanosomes from the various strains were fixed and processed for scanning electron microscopy exactly as described (18). For detergent-extracted cells, immunogold was carried out using GT335 (dilution 1:1,000) or the anti-poly E (dilution 1:1,000) and samples were treated as reported previously (19).

Western blot

Cells were washed in PBS and pellets were boiled in Laemmli loading buffer before SDS-PAGE separation. Different concentrations of total protein extracts were used to obtain a calibration curve. Given the high amount of tubulin, the signal was rapidly saturated and it was necessary to work with low protein quantities (0.15 µg or less). Proteins were transferred to polyvinylidene fluoride membranes overnight at 4°C under low voltage (25V). Membranes were blocked with 5% reconstituted skimmed milk in PBS-Tween 0.1% (PBST) and incubated with primary antibodies diluted in 1% reconstituted skim milk and PBST. GT335 (dilution 1/5,000) and the anti-poly E rabbit antiserum (dilution 1/8,000) were used to detect all glutamylated variants of tubulin and long poly-glutamate chains (over 3 residues) respectively whereas the anti-alpha-tubulin TAT-1 (dilution 1/500) (20) served as loading control. Three membrane washes were performed with PBST for 5 min. Species-specific secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (GE Healthcare) were diluted 1:20,000 in PBST containing 1% milk and incubated for 1 hr. Detection was carried out by using an enhanced chemiluminescence assay and the imaging system ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad, France).

Figure S1

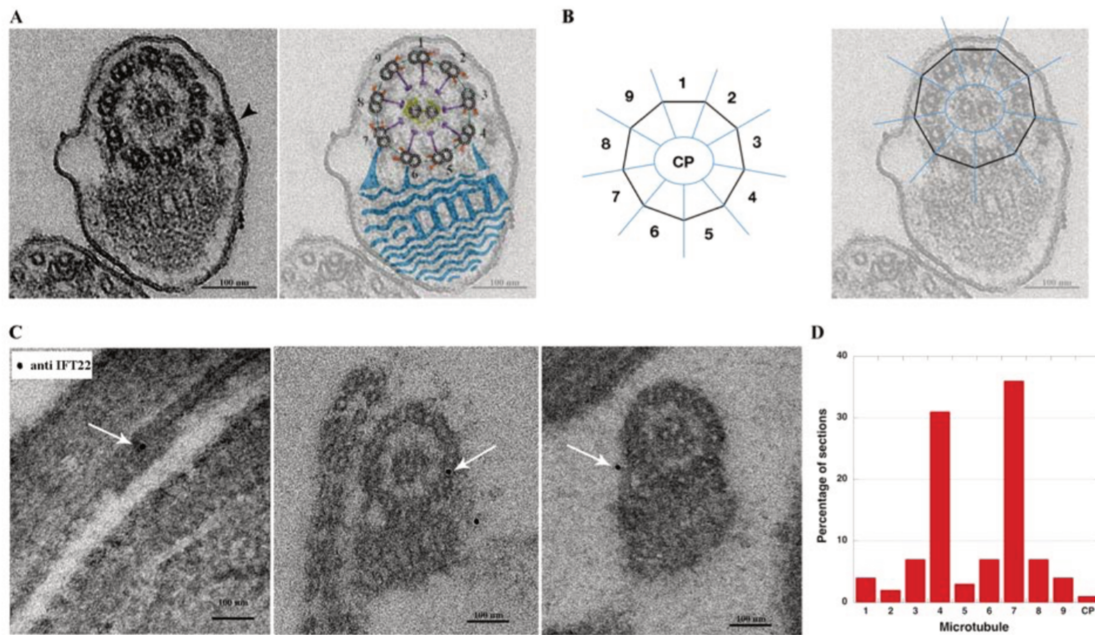


Fig. S1.

Positioning of IFT trains and IFT proteins in the trypanosome flagellum. A. Cross-section of the trypanosome flagellum observed by conventional TEM. The arrowhead indicates an IFT particle positioned at the level of doublet 4. The cartoon shows the main structural components of the axoneme with the numbering of microtubule doublets (21) superposed on the original image. Doublet numbering follows the conventional rules: a line perpendicular to the middle axis of the central pair microtubules is drawn and makes contact with the A-tubule of only one doublet that is defined as number 1. The numbering follows the clockwise orientation defined by the dynein arms. Dynein arms are shown in orange, radial spoke in violet, central pair projections in yellow and the PFR in blue. B. To define the positioning of gold particles relative to the 9 doublets or the central pair, a nonagone was drawn and adapted to each image and gold particles were assigned to one of the 10 domains as described on the cartoon (9 doublets plus the central pair). C. Post-embedding immuno-gold staining of control trypanosome sections incubated with the anti-IFT22 antibody. White arrows indicate gold particles on doublet 4 (left) or 7 (right). The left image shows a longitudinal section of an IFT train and the other two show cross-sections of the axoneme where gold particles are positioned next to doublet 4 (middle image) or 7 (right image). Note that the weak fixation and the harsh treatment inherent to post-embedding immuno-electron microscopy makes it difficult to visualise IFT particles. D. Graph showing the proportion (%) of all gold particles found in the regions of the indicated doublet or of the central pair (CP) that was considered here as a single entity.

Figure S2

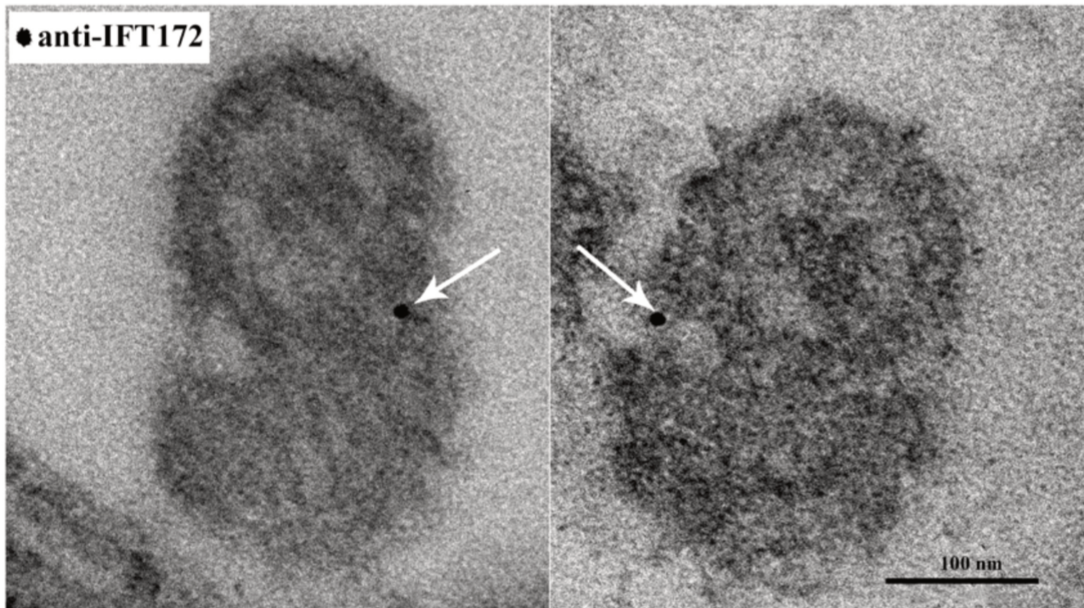


Fig. S2.

IFT172 localises predominantly in vicinity of doublets 4 and 7. Post-embedding immunogold staining of wild-type trypanosome sections incubated with the anti-IFT172 antibody. Arrows indicate gold particles. These are found predominantly in proximity of doublets 4 (left) and 7 (right).

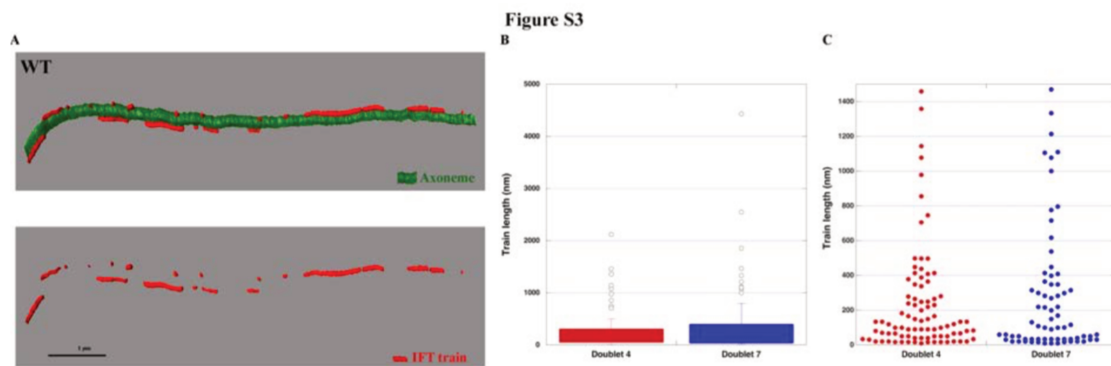


Fig. S3.

IFT trains are found all along doublets 4 and 7. A. FIB-SEM analysis of a flagellum from a wild-type trypanosome (coming from a different series than those presented in Fig. 1B) with the axoneme (green) and several IFT trains (red). B,C. Length of the IFT trains on doublets 4 (red) and 7 (blue) determined from FIB-SEM analysis. Data are coming from 27 portions of flagella representing a total axoneme length of 191 μm . B. Bar graph. C. Plot graph showing only trains whose length is below 1500 nm.

Figure S4

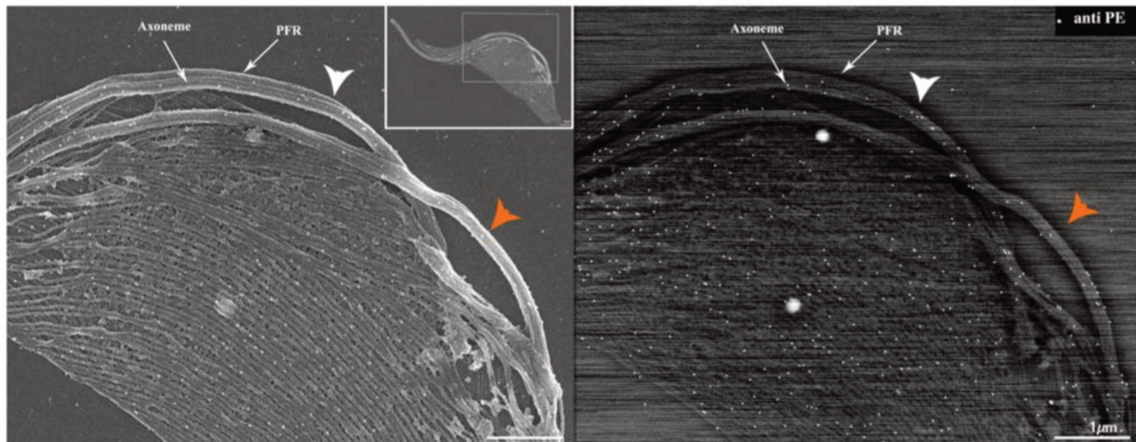


Fig. S4.

Poly-glutamylation is present on cytoplasmic and flagellar microtubules. Immunogold staining using the anti-polyE antibodies of detergent-extracted cytoskeletons from wild-type cells reveals presence of poly-glutamylated tubulin throughout the corset and on both new and old axonemes but not on the PFR. Old and new flagella are indicated with white and orange arrows, respectively.

Figure S5

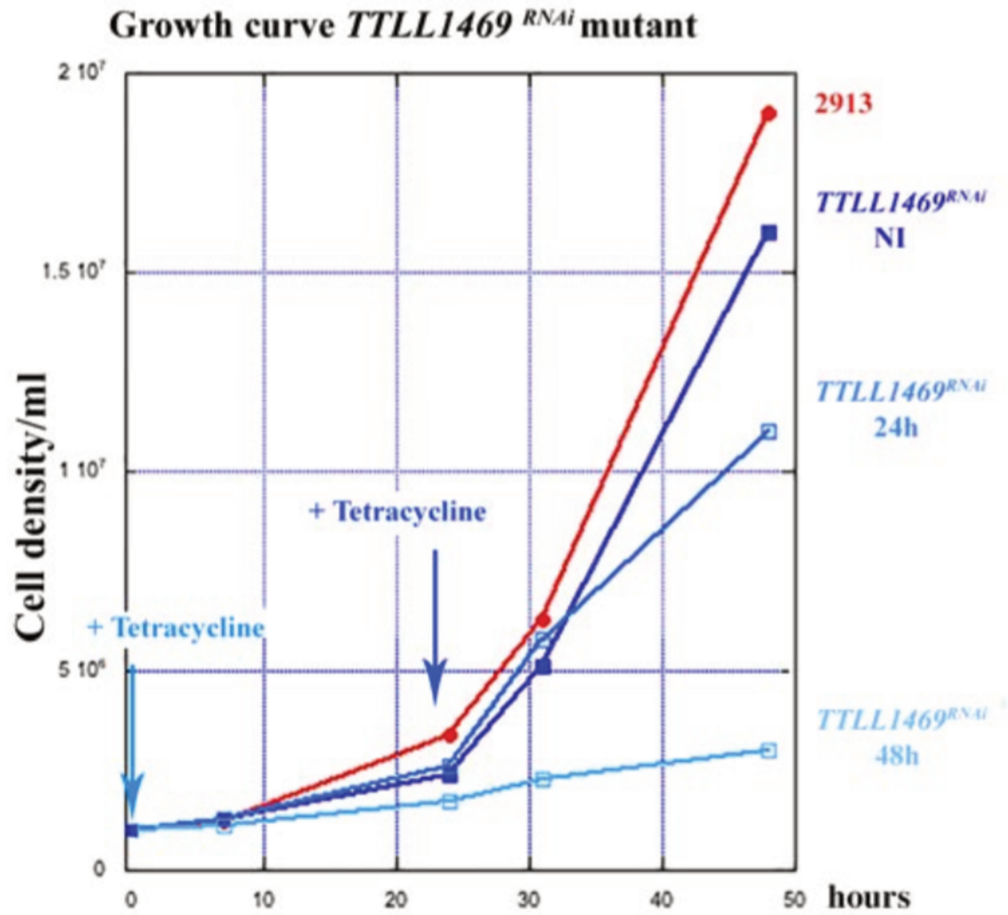


Fig. S5.

Inhibition of glutamylation interferes with cell proliferation. Growth curve of the *TLL1469*^{RNAi} cell line in control and induced conditions compared to the recipient 29-13 cell line. Tetracycline was added at the indicated time points.

Figure S6

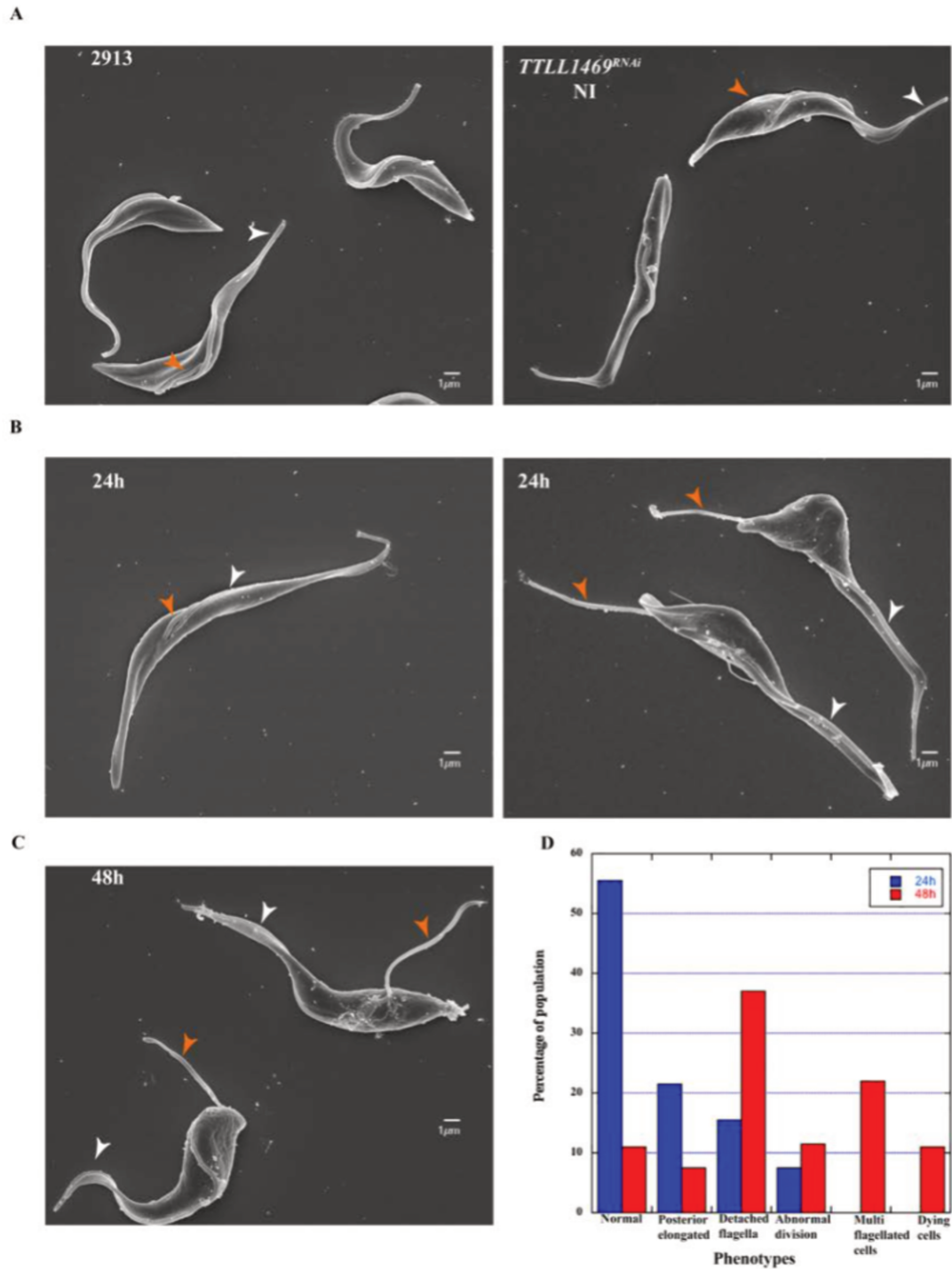


Fig. S6.

Phenotypic analysis of the *TLL1469^{RNAi}* cell line. Scanning electron microscopy of the control 29-13 cell line (A, left) and the *TLL1469^{RNAi}* cell line in non-induced conditions (A, right) or after 24h (B) or 48h (C) of induction. Orange and white arrowheads point at new and old flagella, respectively. (D) The proportion of each cell type is shown in the indicated cell populations.

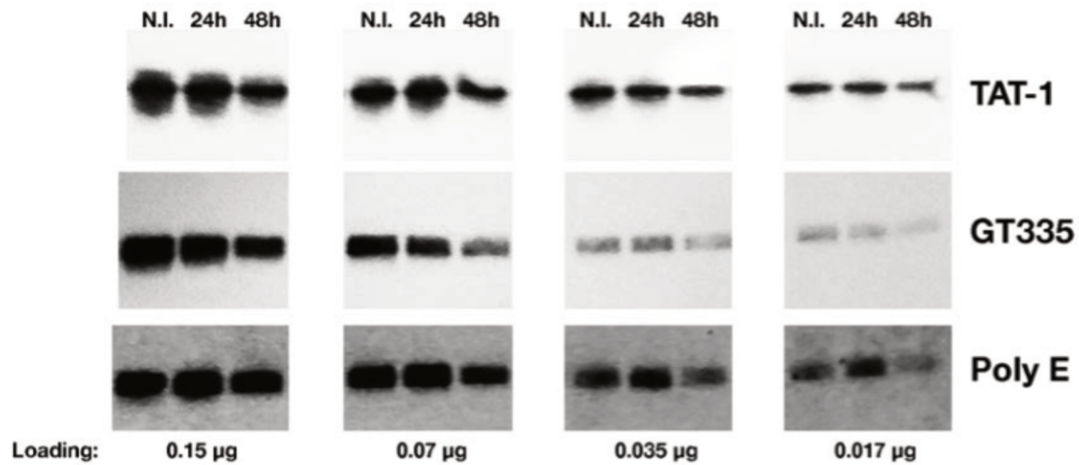


Fig. S7.

Glutamylation on existing tubulin is mildly affected in *TLL1469^{RNAi}* cells. Western blot analysis of the *TLL1469^{RNAi}* cell line was performed in the indicated conditions. Four different protein concentrations were used for loading. TAT-1 detects alpha-tubulin hence picking up only one band whereas GT335 and the anti-poly E detect both tubulins resulting in a doublet. Amount of glutamylated tubulin (GT335 or anti-poly E) was normalised by the amount of total tubulin signal (TAT-1).

Figure S8

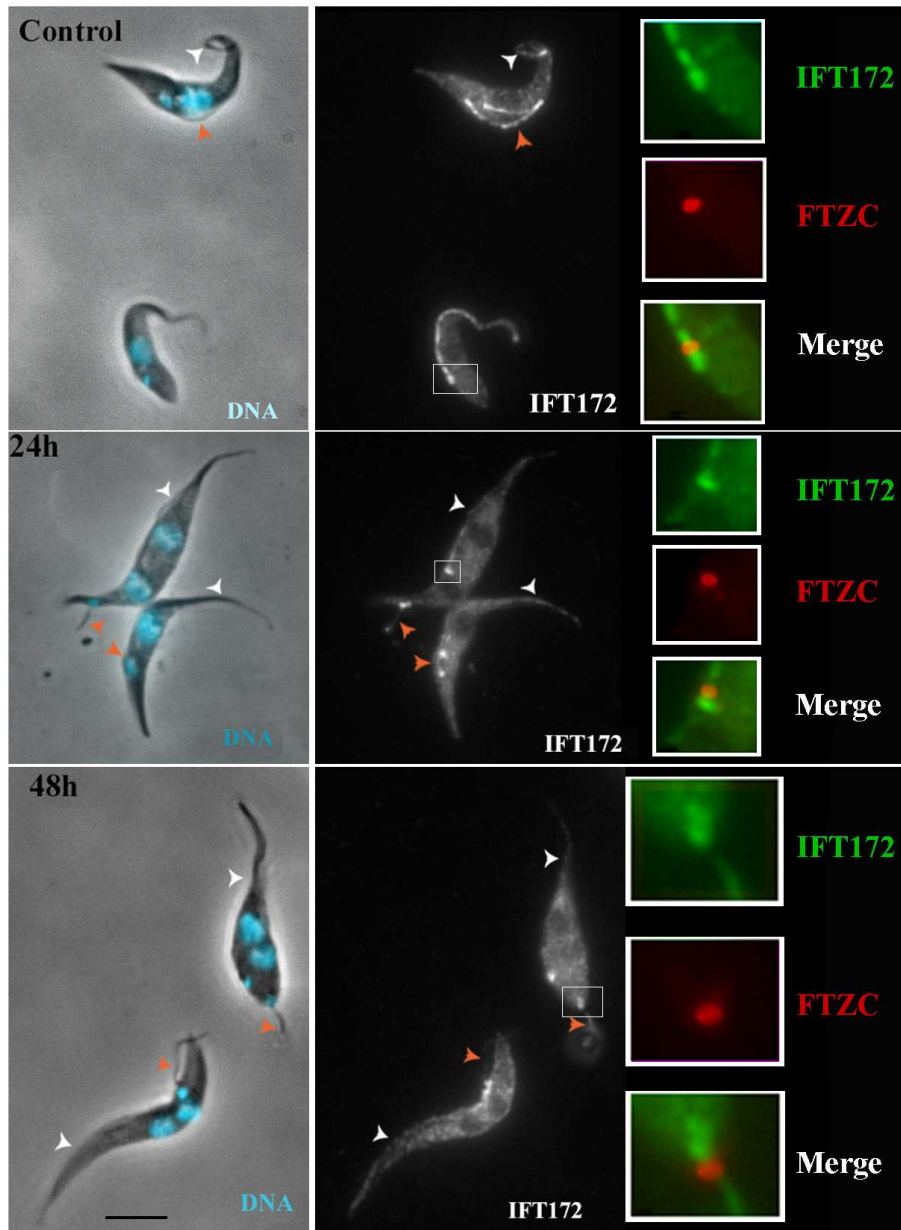


Fig. S8.

IFT protein distribution is affected by reduced tubulin glutamylation. IFA was performed on control or induced *TTL1469^{RNAi}* cells with antibodies recognising the IFT172 (green) and the transition zone marker FTZC (red). The inserts show a magnification of the area indicated on the main panel with the clear presence of IFT material underneath the transition zone.

Movie S1

Three-dimensional view of wild-type trypanosomes analyzed by FIB-SEM. The first part shows the stack of original data and the second one highlights the individual flagella in different colours with the IFT trains shown in red. The volume is then rotated in all dimensions to visualize the positioning of the IFT trains.

Movie S2

Movement of GFP::IFT52 observed by high-resolution microscopy. Two separate tracks with active IFT trafficking in both anterograde and retrograde directions can be detected.

1. M. Casanova *et al.*, Characterisation of polyglutamylases in trypanosomatids. *International journal for parasitology*, (2014).
2. Z. Wang, J. C. Morris, M. E. Drew, P. T. Englund, Inhibition of trypanosoma brucei gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J Biol Chem* **275**, 40174-40179 (2000).
3. S. Redmond, J. Vadivelu, M. C. Field, RNAi: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* **128**, 115-118 (2003).
4. E. Wirtz, C. Clayton, Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science* **268**, 1179-1183 (1995).
5. S. Bhogaraju *et al.*, Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. *Science* **341**, 1009-1012 (2013).
6. G. Burkard, C. M. Fragoso, I. Roditi, Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* **153**, 220-223 (2007).
7. R. Brun, Schonenberger, Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of Trypanosoma brucei in a semi-defined medium. Short communication. *Acta tropica* **36**, 289-292 (1979).
8. E. Wirtz, S. Leal, C. Ochatt, G. A. Cross, A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* **99**, 89-101. (1999).
9. S. Absalon *et al.*, Intraflagellar Transport and Functional Analysis of Genes Required for Flagellum Formation in Trypanosomes. *Mol Biol Cell* **19**, 929-944 (2008).
10. D. Li *et al.*, Advanced Imaging. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science* **349**, aab3500 (2015).
11. J. Schindelin *et al.*, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682 (2012).
12. L. C. Pradel, M. Bonhivers, N. Landrein, D. R. Robinson, NIMA-related kinase TbNRKC is involved in basal body separation in Trypanosoma brucei. *J Cell Sci* **119**, 1852-1863 (2006).
13. D. Dacheux *et al.*, A MAP6-related protein is present in protozoa and is involved in flagellum motility. *PLoS ONE* **7**, e31344 (2012).
14. M. Bonhivers, N. Landrein, M. Decossas, D. R. Robinson, A monoclonal antibody marker for the exclusion-zone filaments of Trypanosoma brucei. *Parasit Vectors* **1**, 21 (2008).
15. T. Blisnick *et al.*, The intraflagellar transport dynein complex of trypanosomes is made of a heterodimer of dynein heavy chains and of light and intermediate chains of distinct functions. *Mol Biol Cell* **25**, 2620-2633 (2014).
16. C. Adhiambo, T. Blisnick, G. Toutirais, E. Delannoy, P. Bastin, A novel function for the atypical small G protein Rab-like 5 in the assembly of the trypanosome flagellum. *J Cell Sci* **122**, 834-841 (2009).
17. F. Bringaud *et al.*, Characterization and disruption of a new Trypanosoma brucei repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition. *Mol Biochem Parasitol* **111**, 283-297 (2000).

18. S. Absalon *et al.*, Basal Body Positioning Is Controlled by Flagellum Formation in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* **2**, e437 (2007).
19. S. Absalon *et al.*, Flagellum elongation is required for correct structure, orientation and function of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **121**, 3704-3716 (2008).
20. A. Woods *et al.*, Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J Cell Sci* **93**, 491-500. (1989).
21. C. Branche *et al.*, Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility. *J Cell Sci* **119**, 3443-3455 (2006).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5 Conclusion et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons étudié différentes étapes de l'IFT chez le trypanosome. Les principales avancées sont la mise en évidence du positionnement des trains IFT sur les doublets 4 et 7 de l'axonème, la visualisation du transport bidirectionnel sur chacun de ces doublets chez les cellules vivantes par SIM et l'importance de la polyglutamylation de la tubuline dans ces processus. Des données préliminaires de photoconversion étayent davantage le phénomène de recyclage des protéines IFT situées à la base du flagelle. Dans cette discussion, nous allons passer en revue les différentes étapes de l'IFT dès la production des protéines IFT jusqu'au transport en tant que tel et finalement la sortie des protéines IFT du compartiment flagellaire. Nos résultats permettent de comprendre certaines données existantes dans la littérature mais soulèvent aussi de nouvelles questions que nous allons aborder. Nous avons également démontré que les protéines IFT étaient renouvelées au cours de la vie d'un même flagelle et que l'IFT intervenait dans la maintenance de certains composants flagellaires mais pas dans la longueur du flagelle mature, ainsi que l'importance du site de liaison à la tubuline sur la protéine IFT81. Ces données étant toutefois largement discutées dans les papiers présentés pages 72 et 111, elles ne seront pas davantage développées ici.

5.1 Production des protéines IFT

Depuis la découverte du transport intraflagellaire il y a une vingtaine d'années, la plupart des molécules appartenant aux complexes IFT-A et IFT-B ont été identifiées. Des analyses métagénomiques ont révélé que ces gènes sont conservés chez la majorité des espèces ciliées et flagellés (Avidor-Reiss, Maer et al. 2004) avec pour exception *Plasmodium* qui assemble ses flagelles dans le cytoplasme ((Sinden and Croll, 1975) ; (Briggs, McKean et al. 2004)). Les gènes *IFT* sont conservés dans tous les génomes des Trypanosomatidés à l'exception de celui encodant la KAP (Morga and Bastin, 2013), ce qui suggère que leur kinésine 2 fonctionnerait sous forme d'homodimère. Il y a deux gènes différents appelés Kin2A et Kin2B. Jusqu'à récemment, la difficulté de synchroniser de manière fiable les trypanosomes en culture a rendu difficile l'étude de l'expression des ARNm codant pour des protéines flagellaires. Archer et ses collègues ont réussi à séparer les cellules par élutriation en exploitant le fait que les trypanosomes grandissent continuellement jusqu'à la cytokinèse.

Ceci permet maintenant d'étudier le profil d'expression des gènes au cours de quatre

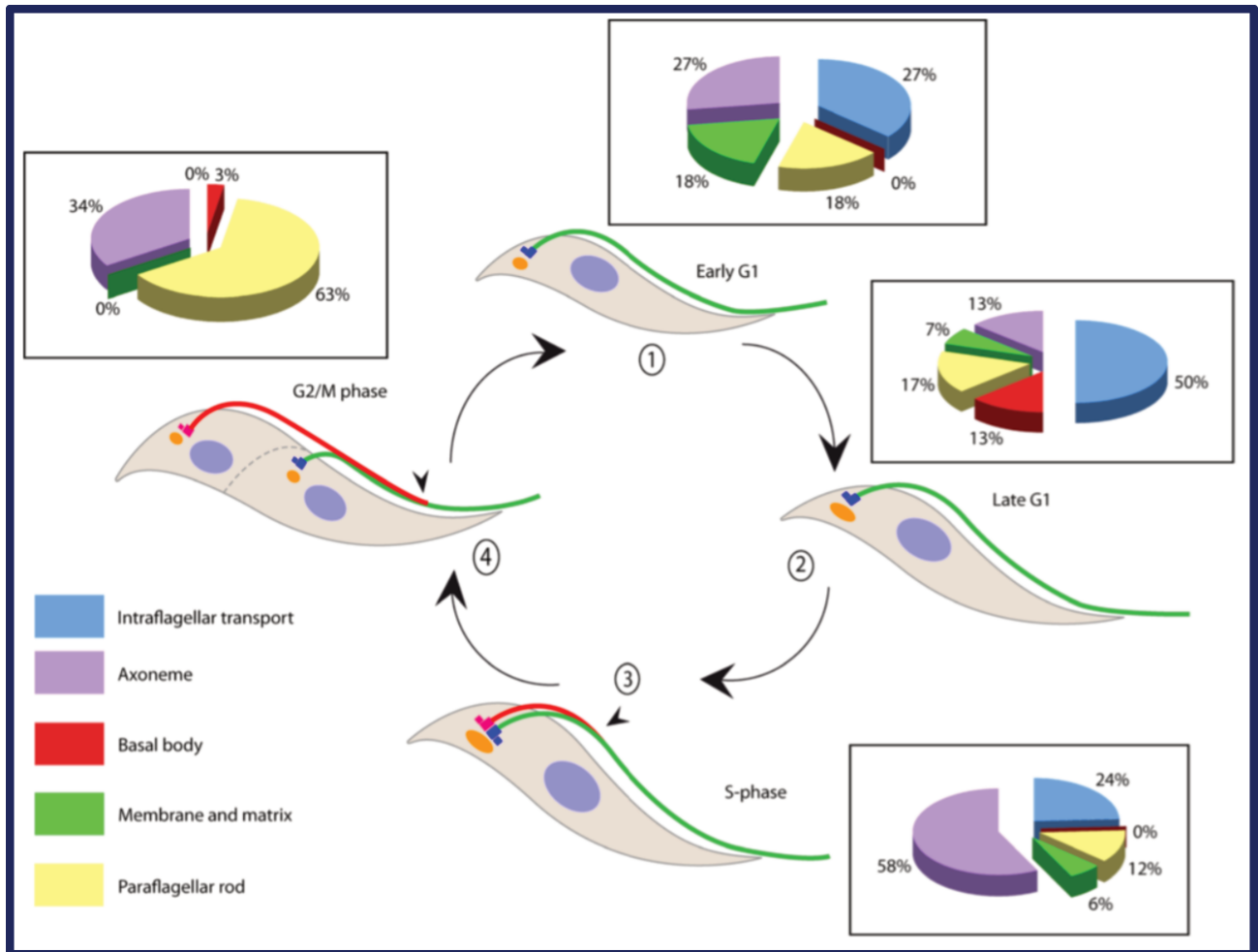


Figure 35 : Expression de l'ARNm codant pour les protéines flagellaires au cours du cycle cellulaire de *T. brucei*

Phase G1 précoce : les cellules avec un seul flagelle (1) ; Fin de la phase G1 : la maturation et la duplication des corps basaux (2) ; Phase S : construction du nouveau flagelle (3) ; Phase G2/M : allongement du nouveau flagelle. Le premier pic des ARNm des protéines IFT, les corps basaux, de la membrane et de la matrice a lieu en phase G1.

Données originales issues de (Archer, Inchaustegui et al. 2011), Figure de (Morga and Bastin 2013)

étapes du cycle cellulaire (Archer, 2011) : la phase G1 précoce (cellule avec un flagelle), fin G1 (maturation et duplication des corps basaux), phase S (première phase de la construction du nouveau flagelle) et phase G2/M (allongement du nouveau flagelle). L'analyse des profils d'expression a révélé que la plupart des ARNm encodant des protéines IFT sont amplifiés lors de la phase G1, juste avant ou pendant la duplication des corps basaux. Cette phase correspond donc à la maturation du pro-corps basal qui va acquérir les protéines IFT. Au contraire, les ARNm des différents composants de l'axonème sont principalement produits lorsque le flagelle s'allonge alors que les ARNm de la PFR augmentent plus tard, en accord avec la croissance décalée de la PFR par rapport à l'axonème (Figure 35) (Morga and Bastin, 2013). Les trypanosomes expriment leurs gènes par transcription polycistronique mais les différents gènes ne sont pas fonctionnellement reliés entre eux. Les facteurs de transcription sont peu abondants et en général le contrôle de l'abondance et de la stabilité d'un ARNm dépend majoritairement de l'information contenue dans la séquence 3' non traduite (3'UTR) (Clayton, 2002). Les facteurs de transcription classiques comme RFX/DAF19 ou FOXJ1 ((Laurencon, Dubruille et al. 2007) ; (Roy et al. 2008)) ne sont donc pas conservés.

Le flagelle ne possédant aucun ribosome, les protéines IFT sont synthétisées dans le cytoplasme. Bien que les protéines IFT soient surtout visibles à la base du flagelle et sous forme de trains, un signal plus ou moins intense est visible dans le corps cellulaire des cellules exprimant des protéines IFT couplées à un marqueur fluorescent. Ceci est également observé dans les analyses par immunofluorescence avec des anticorps contre ces protéines de fusion (anti GFP) comme contre des protéines IFT natives (IFT22, IFT27, IFT172). Pareillement, les expériences d'immunogold au moyen des anticorps dirigés contre IFT22 ou IFT172 montrent la présence de billes d'or dans le cytoplasme. Des études de fractionnement cellulaire réalisées chez *Chlamydomonas* ont montré que le pool cytoplasmique des protéines IFT est 20 à 50 fois plus abondant que le pool flagellaire ((Ahmed et al., 2008) ; (Wang, Krishnamurthy et al. 2009)). La surexpression de la protéine GFP::IFT52 au moyen du promoteur procycline (protéine de surface très abondante chez les trypanosomes) est accompagnée d'un signal cytoplasmique nettement plus marqué par rapport aux expériences réalisées avec les souches exprimant des protéines de fusion par « tagging » endogène. Ceci peut révéler une surcharge du système ou un excédent de protéines IFT qui s'accumulent dans le cytoplasme. La GFP::IFT52 n'a pas accès au noyau ni au kinétoplaste qui apparaissent noirs sur les images, mais en dehors de ces deux sites, la localisation des protéines IFT cytoplasmique apparait homogène par microscopie photonique classique. Par contre, l'observation au moyen de la

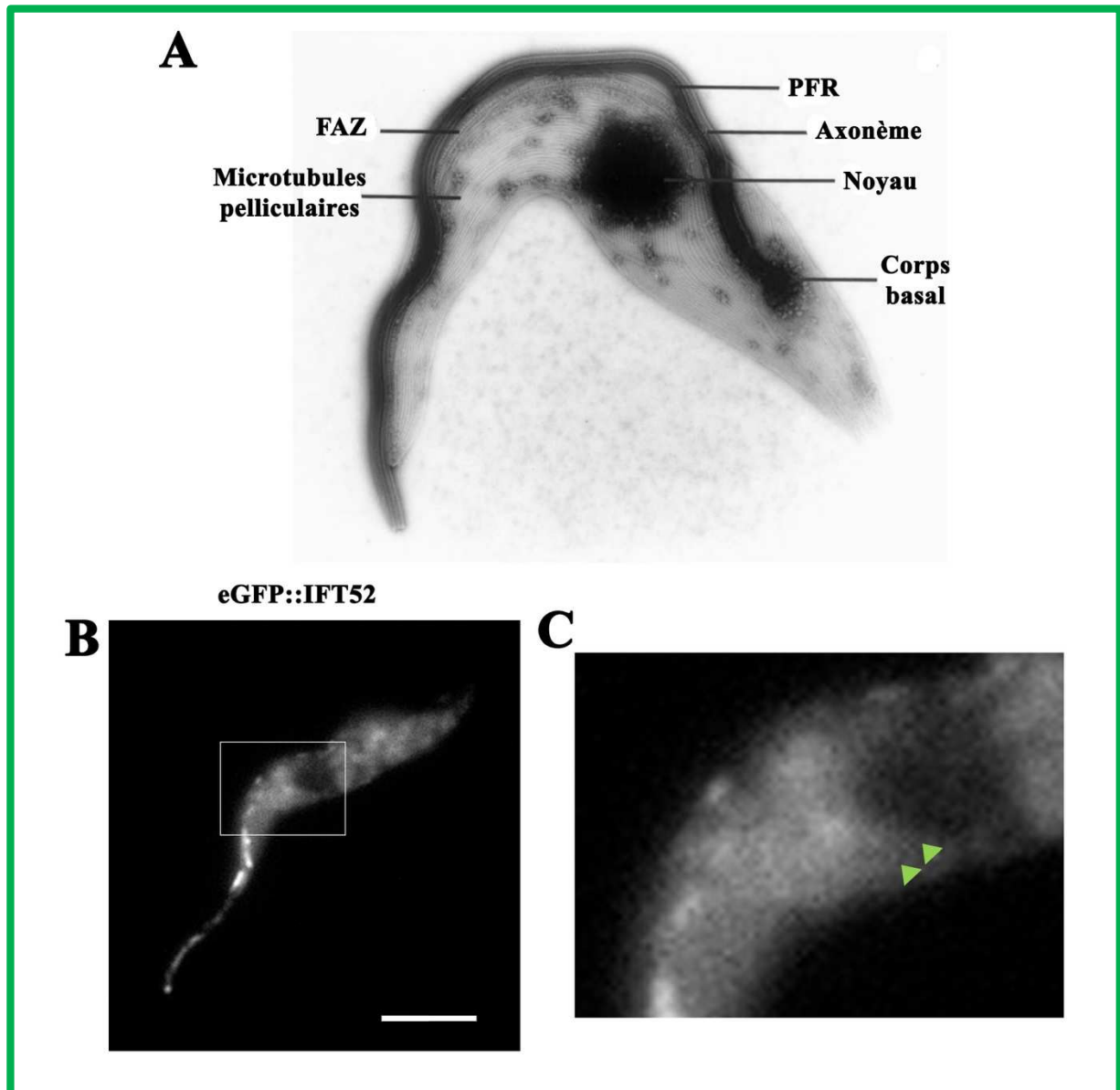


Figure 36 : Observation de la protéine eGFP::IFT52 au niveau des microtubules pelliculaires du corset chez *T. brucei*.

Observation d'un montage entier par coloration négative de cytosquelette de *T. brucei* par coloration négative. Plus d'une centaine de microtubules forment le corset sous-pelliculaire (sherwin 1989)

(A). Observation par microscopie à super résolution SIM d'une cellule exprimant la protéine eGFP::IFT52 dans le cytoplasme et dans le flagelle (B). Un grossissement de la cellule évoque un marquage fluorescent au niveau des microtubules pelliculaires du corset de *T. brucei* (C).

microscopie super résolutive par SIM révèle que le signal présente un profil tout à fait particulier sous forme de stries qui évoquent les microtubules du corset (Figure 36). La microscopie SIM (Structured Illuminated Microscopy) permet d'obtenir un gain de résolution d'un facteur 2 par rapport à la microscopie à fluorescence conventionnelle (Li et al Science, 2015). Les protéines IFT étant déplacées sous forme de train lorsqu'elles sont dans le flagelle, ce résultat préliminaire soulève l'hypothèse qu'elles pourraient être transportées jusqu'à la base du flagelle par l'intermédiaire d'un transport actif qui emprunterait les microtubules du corset dont l'extrémité plus pointe vers la partie postérieure, non loin de la poche flagellaire et de la base du flagelle (Robinson, Sherwin et al. 1995). Nous ne savons pas si les protéines IFT présentes à ce niveau sont sous forme de complexes ou de trains mais des études par FRAP pourraient éclaircir la situation.

5.2 Association et positionnement à la base du flagelle

Chez *Chlamydomonas*, une étude par microscopie électronique à transmission par marquage à l'or montre que les protéines IFT52 sont localisées au niveau des fibres de transition, qui sont considérées comme la première barrière délimitant l'entrée du compartiment flagellaire (Deane, Cole et al. 2001). Des données obtenues au laboratoire chez *T. brucei* indiquent également que les protéines IFT sont localisées au niveau des fibres de transition puisqu'il y a colocalisation entre des protéines IFT et la protéine RP2, un marqueur des fibres de transition (Santi-Rocca et al., non publié). La base du flagelle de cellules exprimant GFP::IFT52 a été observée par microscopie à haute résolution avec l'utilisation d'un microscope super résolusif SIM-TIRF localisé sur le campus de Janelia Farm en Virginie. Selon l'orientation de la cellule, le signal est résolu sous forme d'un anneau à la base du flagelle, avec en son centre, une zone noire (Figure 37). Ce signal pourrait s'expliquer si les protéines IFT étaient concentrées autour des neuf doublets de microtubules à la base du flagelle. La localisation précise sur la longueur (logiquement au niveau des fibres de transition) n'a pas pu être définie mais des études complémentaires seront réalisées en visualisant par la même approche des souches exprimant conjointement la protéine RP2 fusionnée à la mCherry avec une protéine IFT couplée à la GFP. Plusieurs souches de ce type ont déjà été construites au laboratoire (Jung et al. non publié) et permettraient de confirmer la colocalisation entre les IFT et les fibres de transition à ce niveau de résolution.

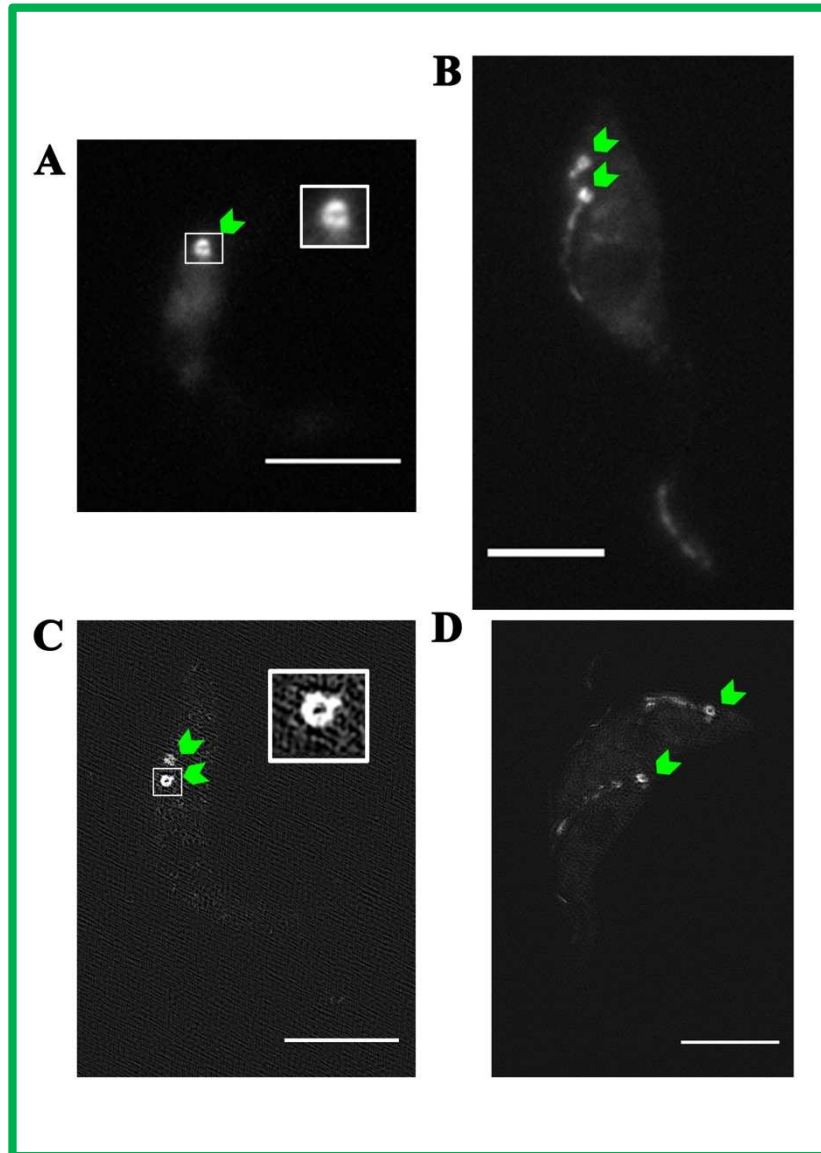


Figure 37 : Les protéines IFT forment un anneau

Les cellules surexprimant la protéine eGFP::IFT52 sont observées par microscopie SIM haute résolution en mode champ large-SIM (A-B) et en mode TIRF-SIM (C-D). Un agrandissement de la région est montré dans le carré blanc.

Comment les protéines IFT rentrent-elles dans ce pool ?

Nous avons produit une souche exprimant de façon inductible la protéine GFP::*IFT52* sous le contrôle de la tétracycline. Cette même souche exprime de façon constitutive la protéine TdTomato::*IFT81* à partir de son site endogène. En absence de tétracycline, les cellules sont négatives sur le canal du vert et l'addition de cet inducteur va permettre de suivre l'émergence de la protéine GFP::*IFT52* sur un fond noir. Lors de l'ajout de la tétracycline dans la culture cellulaire, l'expression de la protéine GFP::*IFT52* est rapidement détectée aussi bien sur cellules vivantes que par western blot (Figure 38). Pendant les deux premières heures de l'induction, on observe la présence de la protéine GFP::*IFT52* à la base du flagelle mais pas sous forme de train en mouvement dans le flagelle (données non montrées). Dans les cellules qui possèdent deux flagelles, les deux bases sont marquées de façon identique et nous n'avons pas observé de biais en faveur du corps basal portant le nouveau. Ces résultats sont très différents de ce qui avait été observé pour la PFR2^{Ty1}, une protéine structurale dont l'induction de l'expression conduit à un ciblage presque exclusif au nouveau flagelle (Bastin, MacRae et al. 1999). A partir de la troisième heure, la GFP::*IFT52* se déplace dans le flagelle indiquant son association aux trains IFT. Après 29 heures d'induction, plus de 95 % des cellules expriment la protéine GFP::*IFT52* et cette dernière voyage normalement aussi bien dans les flagelles en construction et que ceux en maintenance.

Cette étude préliminaire a permis de visualiser le recrutement des protéines IFT au cours du temps et a démontré qu'il y a un échange rapide de protéines IFT entre le pool cytoplasmique et la base du flagelle (en deux heures) et que l'échange est plus lent entre les protéines présentes à la base et celles qui sont impliquées dans le transport au sein même du flagelle. Ces observations sont en accord avec la proposition de l'existence de deux pools distincts à la base du flagelle, ce qui avait été suggéré par des expériences de FRAP (Buisson, Chenouard et al. 2013). Dans la souche exprimant GFP::*IFT52*, le photoblanchiment du signal présent à la base du flagelle a été réalisé par un pulse laser. Les molécules de GFP::*IFT52* présentes dans les trains antérogrades et rétrogrades déjà engagés dans le flagelle conservent leur intensité de fluorescence et le trafic IFT se poursuit normalement dans le flagelle. Le recouvrement de fluorescence au niveau de la base a été observé dans la seconde qui a suivi le FRAP indiquant soit un retour de protéines fluorescentes contenues dans les trains rétrogrades, soit l'entrée de protéine fluorescente fraîche à partir du pool présent dans le corps cellulaire. Pendant les 15 premières secondes suivant le FRAP, les trains antérogrades et rétrogrades fluorescents continuent de voyager dans le flagelle. Une fois que les dernières particules antérogrades

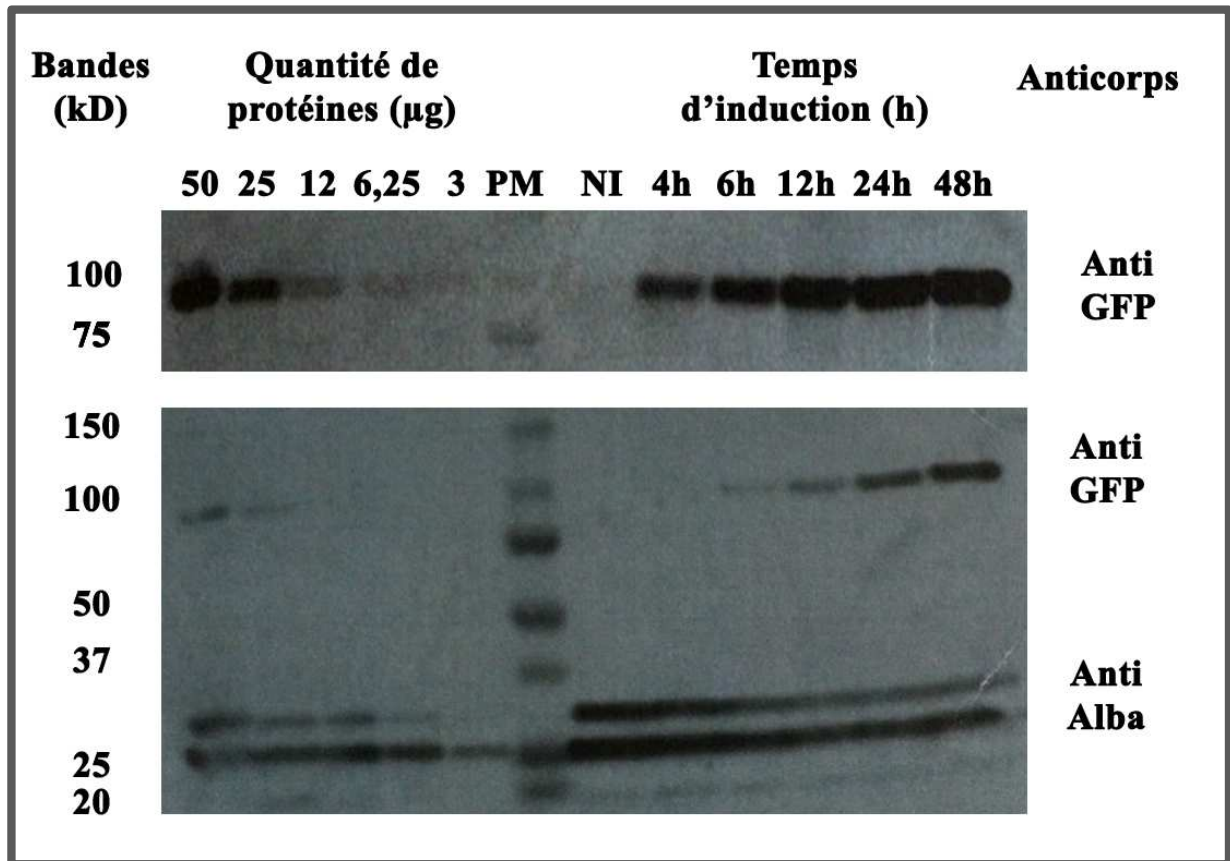


Figure 38 : Visualisation de l'expression de la protéine eGFP::IFT52 au cours du temps dans la souche eGFP::IFT52 +TdTomato::IFT81

Analyse par western blot de l'expression de la protéine eGFP::IFT52 dans les conditions indiquées. Cinq concentrations différentes de protéines ont été utilisées pour le chargement afin de déterminer la quantité de protéines présente dans les cellules au cours de l'induction. Dans le second gel, le temps d'exposition est plus court et permet d'observer un signal avec l'anti-GFP moins saturé. L'utilisation d'un anticorps anti-alba (Subota 2011) sert de contrôle de chargement.

fluorescentes atteignent l'extrémité distale du flagelle à un temps t de 15 secondes, uniquement des trains rétrogrades fluorescents sont détectés dans le flagelle. Le recouvrement de la fluorescence à la base du flagelle est dû au recyclage des protéines et le recouvrement de la fluorescence à la base du flagelle suggèrent que la majorité de la fluorescence présentes dans les trains IFT reviennent du compartiment flagellaire. Le taux de récupération de fluorescence à la base du flagelle est analysé par modélisation mathématique basée sur un concept de recyclage où les protéines fluorescentes issues des trains rétrogrades sont mélangées avec les protéines présentes au niveau du pool basal sans qu'il n'y ait contribution du pool cytoplasmique. Le modèle le plus simple proposait que l'ensemble des protéines IFT présentes à la base du flagelle sont mobilisées pour participer au transport intraflagellaire. Toutefois, la forme de la courbe théorique de récupération de la fluorescence ne correspond pas aux données expérimentales. Par contre, un modèle suggérant que seulement environ 45 % des protéines de la base sont directement impliquées dans l'IFT épouse parfaitement les résultats expérimentaux (Buisson, Chenouard et al. 2013). Ces expériences suggèrent la présence de deux pools de protéines IFT à la base du flagelle définis par leur dynamique. Combinées avec nos données préliminaires sur l'expression inductible de GFP::IFT52, nous pouvons proposer qu'un pool de protéines IFT à la base échange très rapidement (secondes) avec celles qui reviennent du compartiment flagellaires issues des trains rétrogrades et que l'autre échange plus lentement (heures) avec le pool cytoplasmique (Figure 39). Ceci semble se produire de façon équivalente dans le flagellum mature et le flagelle en construction, mais des études plus précises sont requises pour confirmer ce point. Enfin, un échange entre les deux pools doit se produire sur une période plus longue vu qu'il faut environ 3 heures après l'induction de l'expression de la protéine GFP::IFT52 avant de pouvoir la détecter en train de trafiquer sous forme d'IFT.

Qu'est-ce qui assure la séparation entre ces deux pools ? La première hypothèse serait de proposer que toutes les protéines IFT soient mélangées au niveau des fibres de transition, par exemple sous la forme de l'anneau décrit ci-dessus. Toutefois, les protéines déjà associées aux trains rétrogrades seraient plus à même de former un nouveau train antérograde. Ce modèle pourrait être considéré de type « queue leu-leu » comme proposé lors des expériences préliminaires de photoconversion. Les protéines en provenance du pool cytoplasmique seraient présentes à la base, mais leur chance de s'associer à un train antérograde serait plus faible, expliquant la détection tardive d'IFT dans les expériences d'expression inductible de GFP::IFT52. Des études plus précises de l'émergence de l'IFT par quantification de signal sur les kymographes seront développées pour évaluer la cinétique d'incorporation dans les trains.

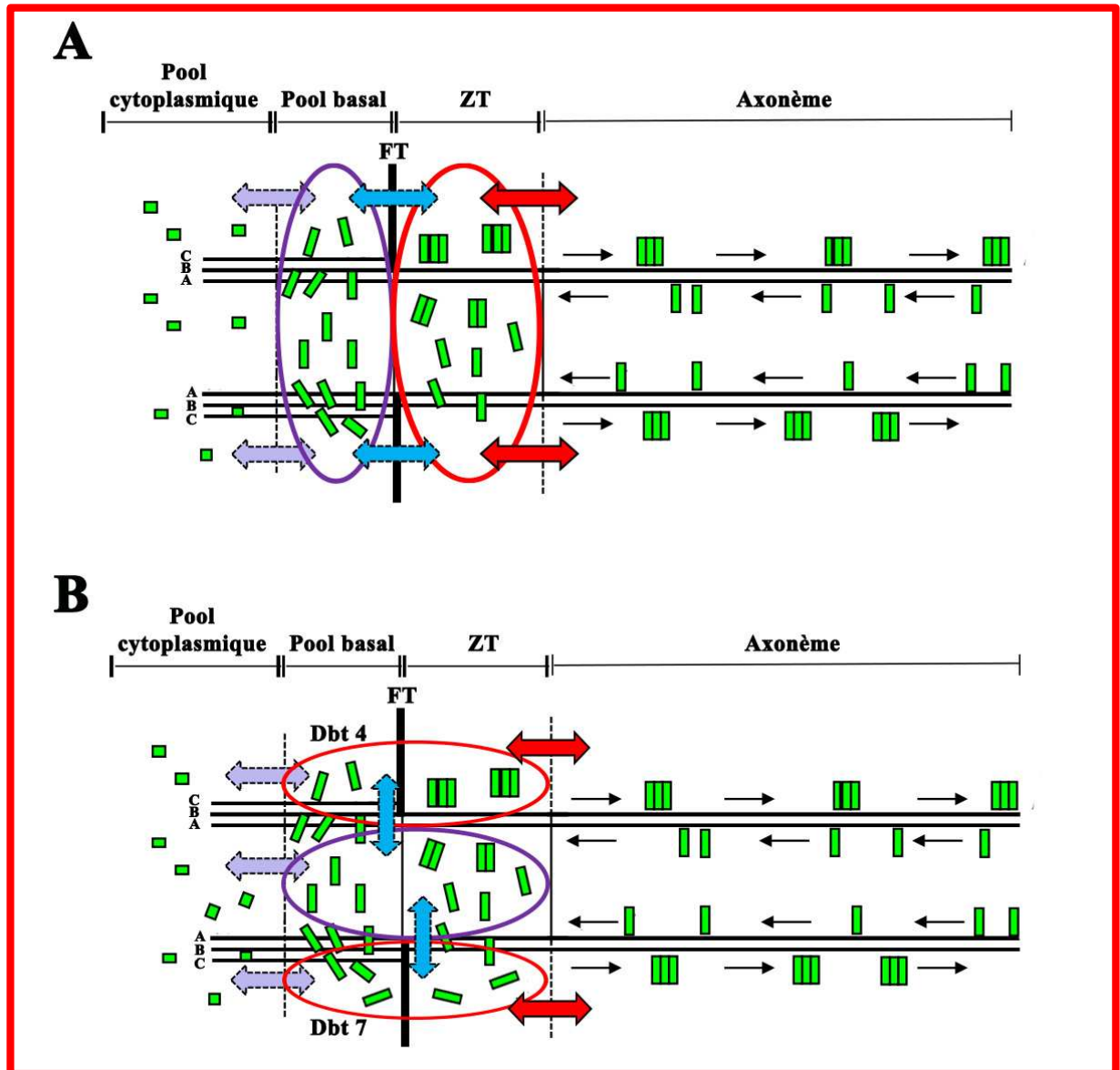


Figure 39 : Hypothèses de recyclage des IFT en fonction de la localisation des pool IFT

A) Dans la première hypothèse, les protéines IFT sont mélangées au niveau des fibres de transition (FT). L'anneau violet délimite le pool basal des protéines IFT peu impliquée dans le transport et l'anneau rouge délimite le pool de protéines actives dans le transport. Le recyclage des trains s'effectuerait par un modèle de « queue leu leu » au niveau du pool de la zone de transition. Pour l'ensemble des deux figures, les flèches violettes indiquent un faible échange entre le pool cytoplasmique et les deux autres pools. Les flèches bleues relatent un faible échange entre les 2 pools IFT et les flèches rouges indique un échange constant entre le pool rouge et l'axonème

B) Dans la deuxième hypothèse, le pool IFT rouge est localisé uniquement au niveau des doublets de microtubules 4 et 7. Le second pool est localisé autours des sept autres doublets de microtubules.

Dans la seconde hypothèse, les deux pools pourraient présenter une localisation distincte. Dans un premier cas de figure, les trains IFT seraient recyclés en passant juste au-dessus des fibres de transition tandis que les protéines IFT non impliquées dans le transport seraient situées en dessous (Figure 39A). La séparation serait assurée par la barrière des fibres de transition. Un échange lent entre les deux pools pourrait être envisagé, peut-être lorsqu'un train rétrograde traverse la barrière. Dans un second cas de figure, les protéines IFT qui cycleraient en priorité seraient localisées au niveau des doublets 4 et 7, avec un dispersement homogène du pool de protéines IFT autour des 7 autres doublets de microtubules (Figure 39B). La chance d'association de ces protéines IFT avec les nouveaux trains IFT antérogrades serait dès lors plus faible. Les expériences relatant l'expression inductible de la protéine GFP::IFT52 au cours du temps indiquent aussi un échange avec le cytoplasme aussi bien dans le nouveau et le vieux flagelle ce qui suggère un turnover des protéines IFT. Le renouvellement des protéines IFT est lent mais a pu aussi être mis en évidence lors des expériences d'extinction des protéines IFT88 ou IFT140 par ARNi (voir article p 114). Si dans ce cas l'absence d'IFT bloque la formation du nouveau flagelle, on observe la perte ou l'arrêt du transport intraflagellaire dans le flagelle mature. On montre ainsi par une approche différente qu'il y a bien renouvellement de protéines IFT dans les flagelles existants. Toutefois, nous avons suivi dans ces expériences le niveau de la protéine YFP::IFT81. Le turnover pourrait être quantifié de façon plus précise en suivant directement la protéine ciblée par ARNi (par exemple en observant la protéine GFP::IFT88 dans la souche *IFT88^{RNAi}* en même temps que l'expression de la TdTomato::IFT81).

5.3 Formation des trains IFT

Malgré la présence abondante de protéines IFT dans le corps cellulaire, du mouvement de protéines IFT n'y a pas été décrit. Certes, certaines protéines IFT pourraient fonctionner dans d'autres processus comme lors de la formation de la synapse immunologique mais les données sont basées sur des extinctions par ARNi et aucun rapport ne met en évidence du mouvement de protéines IFT (Finetti, Paccani et al. 2009). Ceci pose la question des transitions : protéines IFT => complexes IFT => trains IFT => IFT (au sens du transport). Les protéines IFT s'associent pour former deux complexes appelés IFT-A et IFT-B qui ont été initialement isolés à partir de flagelles purifiés de *Chlamydomonas* (Cole, Diener et al. 1998). Ces complexes sont aussi détectés dans le cytoplasme, ce qui laisse à penser qu'ils sont assemblés avant d'aller au flagelle (Wang, Fan et al. 2009). L'équipe de Esben Lorentzen (Max Planck Institut, Munich)

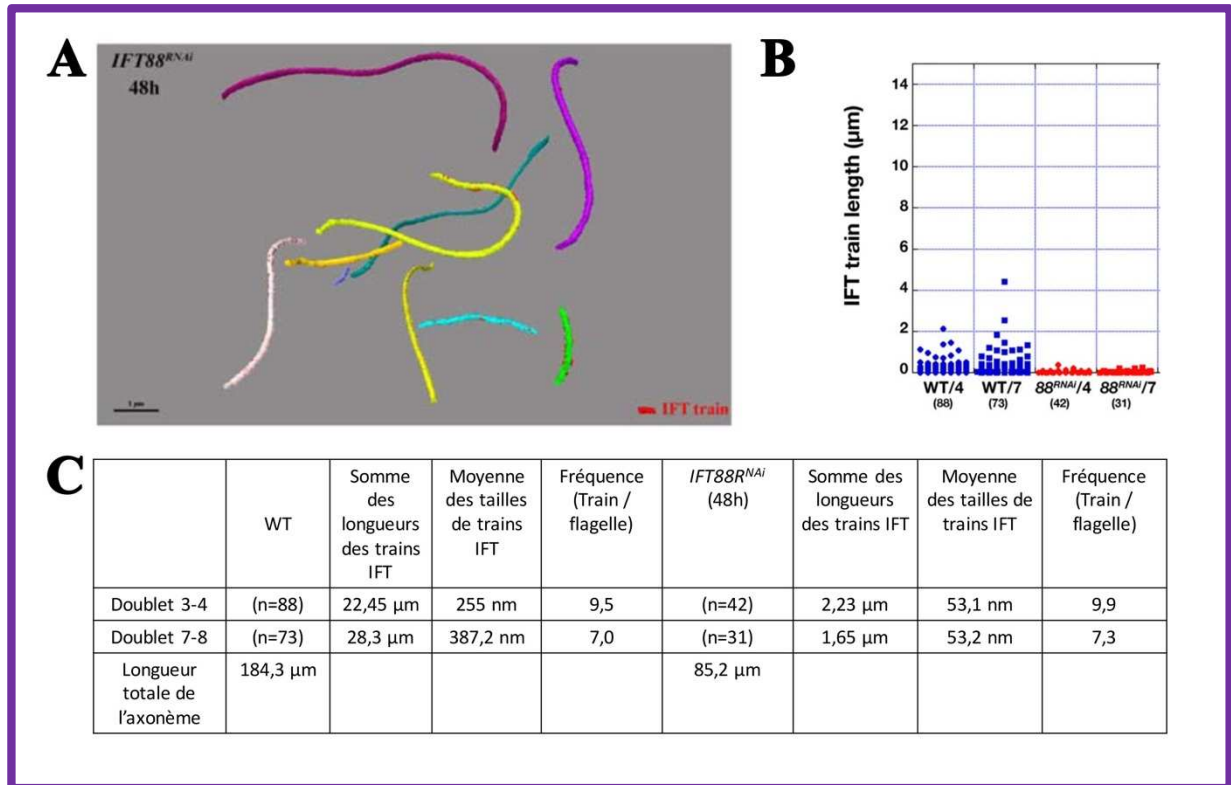


Figure 40 : Distribution des trains IFT dans les cellules sauvages et dans la souche *IFT88^{RNAi}* induite pendant 2 jours

- Plusieurs portions de flagelles sont reconstruites par analyse FIB-SEM sur les cellules *IFT88^{RNAi}* induites pendant 2 jours. Chaque axonème est coloré avec une couleur différente et les trains IFT sont indiqués en rouge.
- Représentation graphique de la longueur des trains IFT en fonction de la souche et des doublets de microtubules étudiés. Le nombre de trains est indiqué entre parenthèse (Trépout et al., non publié).
- Tableau récapitulatif de la somme, moyenne et fréquence des trains IFT obtenus par reconstruction FIB-SEM en fonction des doublets 4 et 7 et des souches étudiées.

a réussi à exprimer *in vitro* la plupart des protéines du complexe IFT-B qui forment deux sous-complexes appelés IFT-B1 (aussi décrit comme « IFT-B core », (Lucker, Behal et al. 2005) qui contient notamment des protéines comme IFT22 ou IFT81 et IFT-B2 qui contient la protéine IFT172 ((Taschner, Kotsis et al. 2014) ; (Taschner, Weber et al. 2016)). L'expression individuelle de protéine s'est avérée impossible pour nombre d'entre elles alors que la co-expression fonctionne bien, ce qui laisse à penser que ces protéines pourraient exister essentiellement sous forme de complexes. Il est communément admis (mais pas vraiment prouvé jusqu'ici) que les complexes IFT-A et IFT-B forment des multimères à la base du flagelle qui sont ensuite injectés le long des microtubules par l'action du moteur kinésine. *In vitro*, il n'a pas été possible de former des multimères à partir de complexes IFT-B (E. Lorentzen et al., non publié). Exprimer les protéines du complexe IFT-A s'est avéré encore plus délicat, probablement à cause de leur grande taille et le complexe IFT-A n'a pas pu être reconstitué. Il peut toutefois être purifié à partir de flagelles de *Chlamydomonas* (Cole, Diener et al. 1998) ou de cellules humaines en culture (Mukhopadhyay, Wen et al. 2010).

La formation des trains pourrait être déclenchée par la haute concentration en protéines IFT (et probablement en complexes IFT-A et IFT-B) présente au niveau des fibres de transition, par la proximité avec la membrane ou encore par l'association au moteur kinésine, voire une combinaison de ces trois facteurs qui n'est rencontrée qu'à la base du flagelle. Le fait qu'il y ait un turn-over des protéines IFT dans les flagelles matures du trypanosome et que les flagelles restent présents (voir papier p 71) ouvre la possibilité d'étudier l'impact de la diminution de certaines protéines IFT sur la formation des complexes lors d'expériences par ARNi. Dans le mutant *IFT88^{RNAi}*, la réduction de la quantité d'IFT88 conduit à une diminution du nombre de complexes IFT-B compétents et s'accompagne initialement d'une réduction de la taille des trains IFT et de leur fréquence. En effet les analyses par FIB-SEM montrent qu'après 48h d'induction, les trains sont 5 à 7 fois plus petits mais que leur fréquence est inchangée (Figure 40). On peut dès lors proposer comme hypothèse que la kinésine envoie à fréquence habituelle les trains IFT mais que la réduction de la quantité d'IFT88 s'accompagnant de la réduction du nombre de complexes IFT-B, les trains qui peuvent se former sont de taille de plus en plus limitée. Ces résultats soutiennent donc l'idée que les trains sont des multimères de complexes IFT injectés par la kinésine. Il faut toutefois se rappeler que ces images sont obtenues sur cellules fixées et qu'une analyse sur cellules vivantes sera nécessaire pour valider cette investigation. Qu'est-ce qui active la kinésine ? Wallace Marshall a proposé un modèle élégant basé sur le principe du tas de sable et de l'avalanche. Le pool de protéines IFT à la base est

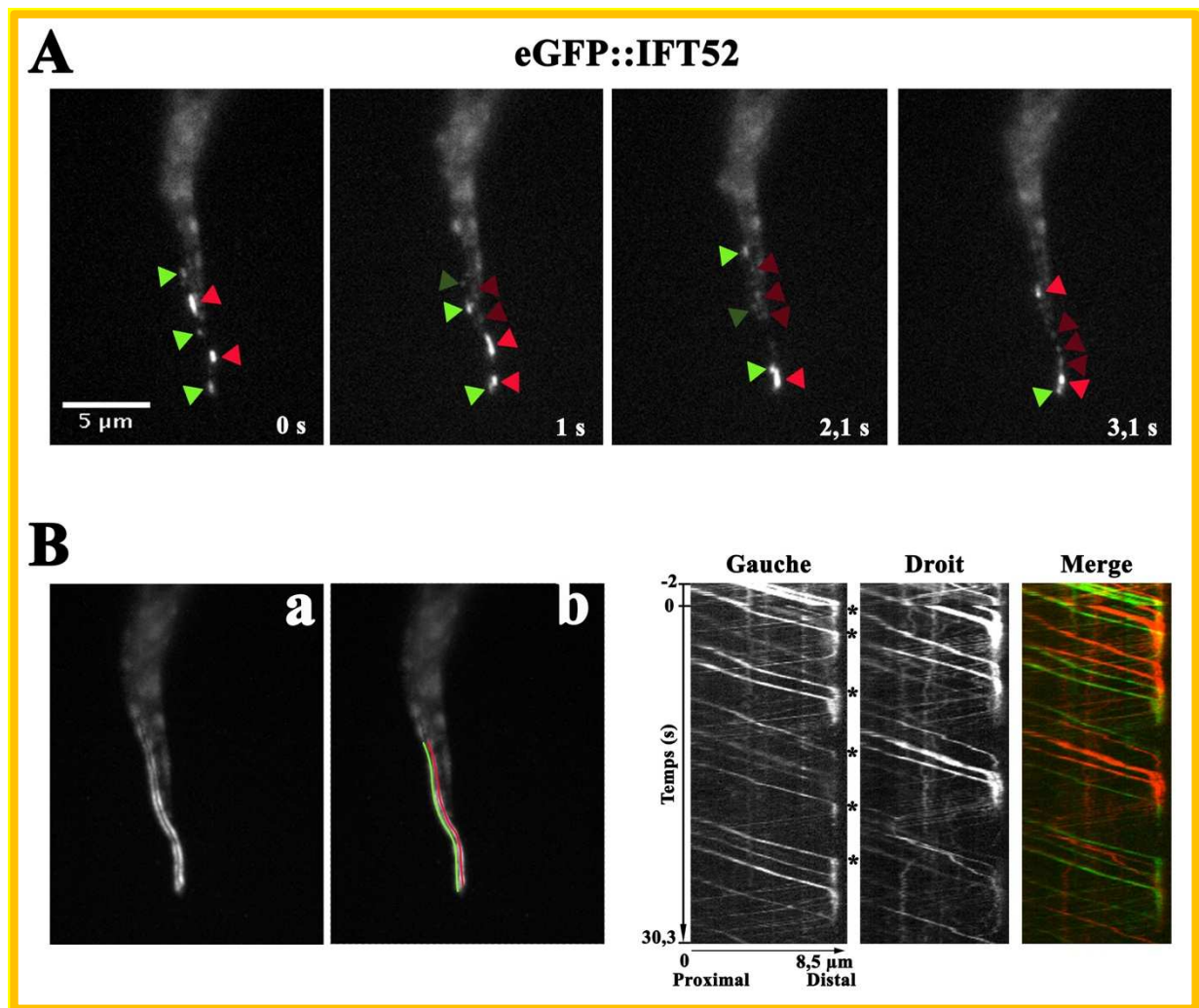


Figure 41 : Suivi de l'IFT après photoblanchiment du bout distal chez la souche GFP::*IFT52*

- A) Visualisation du transport antérograde et rétrograde par microscopie haute résolution SIM. Les flèches vert clair montrent le transport antérograde et les flèches vert foncé pointent les trains rétrogrades dans la voie de gauche. Les flèches rouge clair pointent les trains antérogrades tandis que les flèches rouges foncé désignent les trains rétrogrades dans la voie de droite.
- B) Dans la figure a, la définition des deux voies du transport intraflagellaire est dessinée au niveau de l'extrémité distale du flagelle : la voie de gauche est définie en vert et la voie de droite est définie en rouge. L'extraction de chaque kymographe est réalisée sur chacune des voies et la superposition des deux voies est représentée. L'injection par groupe de trains antérogrades est clairement visible sur chaque voie. Le transit au bout distal est visible sous forme d'une trace verticale (astérisques).

considéré comme un tas de sable sur lequel des grains tombent un par un (correspondent aux trains rétrogrades qui reviennent de façon continue). L'accumulation des grains sur le tas conduit à une situation instable entraînant une avalanche à la base qui correspondrait à l'injection rapide de plusieurs trains antérogrades. Comme ceux-ci sont plus grands, le tas redevient stable mais le retour permanent des trains rétrogrades conduit à la répétition du cycle (Ludington, Wemmer et al. 2013). Ceci devrait donc conduire à des injections irrégulières de trains IFT antérogrades, ce qui était difficile à observer par microscopie conventionnelle vu que la résolution n'est pas suffisante pour distinguer les deux doublets 4 et 7. En examinant par SIM le rythme des injections antérogrades sur des films de cellules exprimant la GFP::IFT52, l'observation des kymographes démontre que c'est effectivement le cas: les entrées sont indépendantes sur les deux doublets et les trains antérogrades sont bien injectés par groupe (Figure 41).

L'inactivation simultanée par ARNi des deux gènes encodant des kinésines 2 de type IFT dans la souche *KIN2A2B^{RNAi}* s'accompagne d'une diminution d'au moins 8 fois de la quantité de kinésine en western blot mais la quantité des protéines IFT n'est pas affectée. Dans ce cas, on observe une forte concentration de protéines IFT à la base du flagelle et une chute de la fréquence des trains IFT dans le flagelle (l'IFT est détecté par l'expression endogène de YFP::IFT81, comme dans les mutants *IFT88^{RNAi}* et *IFT140^{RNAi}*). L'analyse des kymographes extraits de ces vidéos confirme une diminution de trois fois de la fréquence d'injection mais les trains semblent avoir une longueur normale (Morga et al, données non publiées). L'analyse en FIB-SEM devrait permettre de révéler la taille des trains et sera réalisée prochainement au laboratoire. L'observation des kymographes révèle ici aussi une entrée par paquets, compatible avec le modèle avalanche.

Ces résultats indiquent que l'IFT est initié par la polymérisation de complexes IFT-B et leur prise en charge par le moteur kinésine. Il faut souligner que le rôle de la kinésine reste ouvert. En effet, chez *C. elegans* la kinésine hétérotrimérique est responsable de l'injection des trains dans le cil alors que la kinésine homodimérique OSM3 assume le transport jusqu'au bout du cil (Prevo, Mangeol et al. 2015). Chez le trypanosome, il n'y a pas de kinésine hétérotrimérique mais deux homodimériques différentes qui apparaissent redondantes (Morga et al. données non publiées).

5.4 Voyage des trains antérogrades sur les doublets 4 et 7

Les données par microscopie électronique à transmission classique, par immunogold et par FIB-SEM, en association avec les films de SIM sur cellules vivantes démontrent qu'une fois assemblés, les trains voyagent sur les doublets 4 et 7. Ces deux doublets sont davantage polyglutamylés que les 7 autres et l'inhibition des TLL interfère fortement avec la construction du flagelle. Comment la polyglutamylation pourrait-elle expliquer cette restriction des trains IFT sur les doublets 4 et 7 ? Les travaux *in vitro* de l'équipe de Ron Vale ont révélé que la kinésine homodimérique humaine KIF17 (équivalente de OSM3 de *C. elegans* ou de KIN2A et KIN2B chez *T. brucei*) reconnaît des microtubules assemblés chez la levure mais contenant la queue C-terminale humaine (Sirajuddin, Rice et al. 2014). Lorsque celle-ci est polyglutamylée (des conditions avec 3 ou 10 glutamates ont été testées), la vélocité et la processivité de la kinésine est fortement améliorée. Par contre, la tyrosination de l'extrémité C-terminale de la tubuline entraîne une diminution à la fois de la vélocité et de la processivité de la kinésine. Lors de la biogenèse des flagelles chez *T. brucei*, l'utilisation de l'anticorps YL1/2 (marqueur de la tyrosination sur l'alpha-tubuline) détecte un marquage intense au niveau du nouveau flagelle au début de sa construction. Lors de l'allongement, seule l'extrémité distale est positive et l'observation par immunogold sur cytosquelettes démontre l'existence d'un gradient du plus marqué au bout distal vers le moins marqué à mi-chemin du flagelle (Sherwin and Gull 1989). Le signal baisse fortement à la fin de la croissance lorsque la cellule est sur le point de se diviser. A l'inverse, aucun marquage n'est détecté le long du flagelle mature (Sherwin, Schneider et al. 1987). Sur base de tous ces éléments, nous proposons l'hypothèse suivante : la maturation du corps basal a lieu, les complexes IFT se concentrent sur les fibres de transition et les trains sont assemblés. Toutefois, on peut imaginer que la kinésine interagit difficilement avec les microtubules naissants vu qu'ils sont tyrosinés. A partir du moment où les doublets 4 et 7 sont polyglutamylés, la kinésine peut accéder efficacement à ces doublets et initier l'IFT, le transport de tubuline et de protéines associées et assurer l'élongation du flagelle. Si les autres doublets sont peu ou pas polyglutamylés, la kinésine y accèdera difficilement vu que sa liaison et sa vitesse seront fortement ralenties par la tyrosination.

Les protéines IFT sont concentrées aux fibres de transition alors que les trains IFT sont visibles au niveau de l'axonème. Que se passe-t-il entre les deux ? Les images de TEM de la zone de transition montrent du matériel dense aux électrons qui peut parfois évoquer des trains IFT mais la présence des fibres en Y obscurcit la vue et complique l'interprétation. Les quelques

coupes dans la portion de l'axonème où la PFR n'est pas encore présente sont perturbantes vu qu'on voit ce qui ressemble à des trains sur plus de deux doublets (Absalon, Blisnick et al. 2008). A ce stade, nous ne disposons pas d'assez d'informations pour savoir si les trains IFT démarrent sur les doublets 4 et 7 dès le niveau des fibres de transition ou s'ils peuvent rentrer sur n'importe lequel des doublets et puis être aiguillés sur le 4 et le 7 avant la PFR ? Le débat est ouvert.

5.5 Contrôle de la glutamylation sur les doublets 4 et 7

Qu'est-ce qui contrôle la polyglutamylation majoritairement sur les doublets 4 et 7 ? Le génome de *T. brucei* contient une douzaine d'enzymes avec un domaine de type TTLL (Casanova, de Monbrison et al. 2015). Toutefois, aucune de ces enzymes n'a été trouvée dans les protéomes de flagelles intacts ((Subota, Julkowska et al. 2014) ; (Oberholzer, Langousis et al. 2011)) ou démembrés (Broadhead, Dawe et al. 2006). Ceci pourrait s'expliquer si la polyglutamylation du dimère de tubuline avait lieu dans le cytoplasme avant son import dans le flagelle vu que le ou les enzyme(s) responsable(s) pourraient être localisée(s) dans le cytoplasme corps cellulaire. Dans ce cas, la question du ciblage de la tubuline polyglutamylée devrait se poser. Toutefois, il semblerait que la polyglutamylation prenne place essentiellement sur les microtubules, d'où l'absence étonnante d'une polyglutamylase dans le flagelle. Ceci pourrait s'expliquer si l'enzyme était peu abondante mais très active. La polyglutamylation doit être très active au moment de la formation du flagelle mais son turnover est probablement lent vu que l'ARNi ciblant les TTLL ralentit fortement la formation du nouveau flagelle qui est nettement moins positif pour GT335 ou l'anti-polyE mais que le signal diminue très lentement dans le vieux. Il est donc plausible que les TTLL impliquées dans la polyglutamylation soient seulement présentes dans les nouveaux flagelles et comme les cultures ne sont pas synchronisées, elles seront sous-représentées en protéomique. Un tel exemple a été rencontré récemment au laboratoire pour la protéine ODA8 qui est détectée seulement au bout distal des nouveaux flagelles à un stade avancé de l'assemblage et qu'on ne détecte pas non plus en protéomique (Bonney et al., en préparation). Pour déterminer quelle(s) enzyme(s) est impliquée dans la glutamylation des doublets 4 et 7, on peut envisager de les coupler à une GFP par tagging endogène, une procédure très efficace chez le trypanosome que nous avons largement exploitée au laboratoire (voir par exemple l'étude des FLAM, (Subota, Julkowska et al. 2014).

Comme il est possible de définir la numérotation des doublets jusqu'au corps basal et pas seulement au niveau de l'axonème et de la PFR (Vaughan and Gull, 2015), on peut donc proposer que 4 et 7 possèdent leur propre identité déjà au niveau de la partie proximale du corps basal. On sait que d'un point de vue structural, chaque triplet est associé à des structures différentes (fibres, racines striées, autres microtubules, (Vaughan and Gull, 2015). On peut donc imaginer que cette architecture est héritée à chaque réplication du corps basal (« templated replication ») et que l'identité de 4 et 7 est reconnue par l'enzyme qui vient polyglutamyler. La reconnaissance pourrait se faire via des molécules présentes sur les microtubules de ce triplet ou aux éléments structuraux associés. Une variante de ce modèle consisterait à imaginer le même principe d'identité moléculaire pour 4 et 7 mais au niveau des fibres de transition qui ont toutes l'air un peu différentes au niveau structural ((Vaughan and Gull 2015) ; (Trépout et al, non publié)). Une troisième possibilité serait que la polyglutamylation différentielle se met en place à partir de la région où la PFR est présente et que la ou les glutamylases impliquées seraient localisées à la périphérie de la PFR, par exemple sur les projections qui la connecte aux doublets 4 et le 7. Dans ces conditions, seulement ces deux doublets seraient accessibles à l'enzyme et fortement polyglutamylés. Une quatrième option serait si, lors de l'assemblage, l'enzyme était associée à la membrane au bout distal du flagelle en croissance. L'extrémité des doublets 4 et 7 (mais aussi 6) fait contact avec la membrane du flagelle seulement lors de la construction (Hoog, Lacomble et al. 2014), la glutamylase pourrait y être concentrée et fonctionner à cet endroit-là. On pourrait aussi imaginer que c'est l'IFT lui-même qui transporte l'enzyme et assurerait ainsi la glutamylation sur les doublets où les trains se déplacent mais ce modèle se heurte au problème du commencement : comment se ferait la sélection des doublets 4 et 7. Une sorte de problème de premier œuf et première poule...

Toutes ces hypothèses sont basées sur le principe que la polyglutamylation aurait lieu de manière spécifique au cours de la construction du flagelle. Par exemple, l'ensemble des doublets de microtubules seraient glutamylés mais seulement les doublets 4 et 7 seraient enrichis d'une longue chaîne de résidus glutamylés (> à 3 résidus de glutamates), dans un système avec deux enzymes, une pour initier l'addition d'un glutamate et une régulée sur 4 et 7 pour assurer l'extension de chaînes longues. Un modèle plus sophistiqué encore pourrait se baser sur la déglutamylation : lors de la croissance du flagelle, les neuf doublets de microtubules sont polyglutamylés de façon indistincte mais c'est une déglutamylase qui supprimerait au fur et à mesure de l'élongation du flagelle l'excès de glutamates sur l'ensemble des doublets de microtubules à l'exception des doublets 4 et 7. Chez *T. brucei*, on ne trouve que 3

déglutamylases (carboxypeptidases, CCP1, CCP5A et CCP5B) mais tout comme les TTLL, elles sont absentes des flagelles purifiés et leur fonction reste énigmatique. Aucune d'entre elle ne paraît essentielle d'après le crible global effectué par ARNi par l'équipe de David Horn (Alsford, Turner et al. 2011). Nous souhaitons sur-exprimer ces enzymes dans le flagelle du trypanosome afin d'éliminer la polyglutamylation au sein d'un flagelle existant, ce qui nous permettrait de tester directement si la polyglutamylation sélective des doublets 4 et 7 est bien responsable de la présence des trains IFT sur ces deux doublets. Nous avons cloné les 3 gènes dans un vecteur de surexpression pour *T. brucei*, ainsi que deux gènes de souris dont l'activité de déglutamylase a déjà été démontrée (Jung et al, non publié). Des versions dont le site actif a été muté serviront de contrôle et l'addition de la séquence de ciblage au flagelle de l'AK3 (arginine kinase 3, (Ooi, Rotureau et al. 2015)) permettra de contrôler la localisation des enzymes.

Le rôle des glutamylases dans la formation des cils et flagelles a été étudié chez d'autres espèces. Par exemple, chez l'homme une mutation dans CEP41 (une protéine présente au corps basal et le long du cil primaire) provoque le syndrome de Joubert et empêche la rentrée de TTLL6 dans les cils primaires, conduisant à une baisse de glutamylation et la formation de cils trop courts. Ces résultats sont en fait compatibles avec une perturbation de l'IFT. Le génome du cilié *Tetrahymena* possède 6 gènes encodant pour les enzymes TTLL et l'enzyme TTLL6 génère principalement la glutamylation du tubule B des doublets de microtubules. La suppression des deux copies du gène *TTLL6* entraîne un défaut dans la mobilité ciliaire et dans le fonctionnement des bras de dynéine interne. Une autre étude toujours chez *Tetrahymena* montre que la suppression des enzymes TTLL3 entraîne un raccourcissement de l'axonème. Les mêmes résultats ont été obtenus chez le poisson zèbre, avec également l'absence de cils dans plusieurs organes (Wloga, Dave et al. 2010). Dans tous ces cas, la distribution des trains ou des protéines IFT n'a pas été décrite.

5.6 Intérêt d'individualiser des doublets pour l'IFT

En dehors de *T. brucei* et de *Chlamydomonas*, le positionnement des trains IFT n'a pas été étudié. La question reste donc ouverte quant à l'organisation de l'IFT dans les cils et flagelles chez d'autres espèces. On peut donc se demander l'utilité de la polyglutamylation au cas où tous les doublets seraient utilisés par les trains IFT. On notera ici que chez *Chlamydomonas*, la polyglutamylation précède toujours la détyrosination (Lechtreck and

Geimer, 2000), ce qui est en accord avec le modèle proposé plus haut. Certains flagelles sont construits directement dans le cytoplasme et n'ont pas besoin d'IFT pour leur assemblage, comme le flagelle du gamète mâle de *Plasmodium* ou des spermatozoïdes de nombreux insectes. Dans ces derniers cas, il est frappant de constater que le niveau de glutamylation de tubuline de ces axonèmes est très bas, voire même absent vu que l'anticorps GT335 ne détecte aucun signal (Mencarelli, Caroti et al. 2005). Dans le cas de *Plasmodium*, le génome ne contient que deux gènes encodant des TTL potentiels (une seule ressemble quelque peu à TTL6B de *Trypanosoma brucei* avec 40% d'identité dans le domaine central). L'anticorps GT335 détecte du signal au niveau centre organisateur des microtubules du fuseau mitotique mais le niveau de glutamylation dans le flagelle des gamètes n'a toutefois pas été étudié (Fennell IJP2008).

Quel pourrait être l'intérêt pour le trypanosome de limiter l'IFT à seulement deux doublets ? Ceci pourrait être interprété comme une conséquence de la présence de la PFR qui limite effectivement l'accès aux doublets 5 et 6 qui ne sont pas à proximité de la membrane flagellaire mais dans ce cas il est difficile d'expliquer pourquoi on ne voit quasiment pas de trains IFT sur les doublets 1, 2 et 9. Par ailleurs, les doublets 4 et 7 sont aussi en contact direct avec la PFR via des connexions solides et relativement volumineuses. Nous proposons que la restriction des IFT sur certains doublets aurait « libéré » les autres doublets qui auraient alors été accessibles pour des modifications supplémentaires, comme la PFR. On notera que le connecteur des flagelles est aussi présent sur certains doublets de microtubules (Hoog, Lacombe et al. 2016) et que des structures denses aux électrons certes plus discrètes que l'IFT ont été observées sur des coupes transversales de flagelle (données non montrées).

L'assemblage de la PFR s'effectue par incorporation au bout distal (Bastin, MacRae et al. 1999) comme pour l'axonème et les protéines PFR pourraient donc être des cargos de l'IFT, bien que ça n'ait pas été formellement démontré. L'étude du mutant *KIF9B^{RNAi}* (*KIF9B* est une kinésine de la famille 9 seulement présente chez les espèces flagellées) a montré des défauts d'assemblage de la PFR avec un marquage discontinu lors de l'utilisation de marqueurs des protéines PFR1 et PFR2. En microscopie électronique à balayage et à transmission, le flagelle présente des domaines successifs avec seulement l'axonème et d'autre avec l'axonème encerclé d'une grande quantité de matériel PFR (Demonchy, Blisnick et al. 2009). Il a dès lors été proposé que *KIF9B*, qui est localisée au niveau de l'axonème du flagelle puisse transporter des protéines PFR vers le bout distal en vue de leur assemblage. Néanmoins, aucun trafic n'a été observé dans les cellules exprimant le moteur GFP::*KIF9B* (Demonchy, Blisnick et al. 2009).

Au contraire des IFT, KIF9B est résistante au traitement au détergent, ce qui suggère une association forte avec les microtubules. On pourrait dès lors imaginer que KIF9B se lie au microtubule et plutôt que de se déplacer elle-même, elle aurait le potentiel de « pousser » les protéines PFR, un peu à l'image au niveau cellulaire des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire qui ne se déplacent mais poussent le mucus. Malheureusement, l'anticorps n'a pas fonctionné en microscopie électronique et la localisation précise au niveau de l'axonème n'a pas pu être établie (Blisnick et al, non publié). On pourrait émettre l'hypothèse que KIF9B est localisée sur certains doublets pour remplir cette fonction.

Dans le génome de *T. brucei*, plus d'une quarantaine de gènes encodant des kinésines sont présents et seulement quelques-unes d'entre elles ont été étudiées. Seules KIN2A et KIN2B appartiennent à la famille de la kinésine 2 impliquée dans l'IFT (Wickstead and Gull, 2006). L'extinction par ARNi de KIN2A ou KIN2B seule ne produit pas de phénotype visible mais l'extinction conjointe fait chuter la fréquence de l'IFT et ralentit fortement la vitesse de croissance du flagelle (Morga et al. données non publiées). Il n'est pas à exclure qu'une autre kinésine soit utilisée pour le transport antérograde. En effet, les cellules exprimant la kinésine 2A tagguée à la YFP ou la TdTomato montrent uniquement un trafic sur quelques micromètres au début du flagelle, suggérant qu'elle pourrait servir à la rentrée des trains mais pas à leur déplacement sur une longue distance. Chez *C. elegans*, cette fonction est remplie par la kinésine II hétérotrimérique puis les trains seraient pris en charge par la kinésine homodimérique OSM-3 (Prevo, Mangeol et al. 2015). Les versions de KIN2B couplées à des marqueurs fluorescents sont toutes présentes dans le cytoplasme (Morga et al. données non publiées) et il est difficile de dire s'il s'agit de leur véritable localisation ou d'un artefact dû à la présence du tag.

T. brucei adopte différentes morphologies lors de son cycle parasitaire et bien que le flagelle adopte toujours la configuration 9+2 avec la PFR, sa composition moléculaire est sujette à plusieurs changements ((Oberholzer, Langousis et al. 2011) ; (Rotureau, Subota et al. 2012)). Nous avons examiné le positionnement des trains IFT dans les flagelles des stades sanguins de *T. brucei* par microscopie électronique à transmission conventionnelle et par SBF-SEM (en collaboration avec l'équipe de Sue Vaughan, Oxford Brooks University, Royaume-Uni). Comme chez le stade procyclique, la présence des trains est restreinte à certains doublets : le 4 mais aussi le 8 (données non montrées). Ces résultats montrent une flexibilité inattendue dans l'architecture flagellaire et soulèvent la possibilité de moduler le flagelle en fonction du stade de développement. Le flagelle est davantage « tordu » chez les stades sanguins, ce qui impose peut-être des contraintes structurales différentes sur les doublets par rapport au stade

procyclique.

5.7 Transport intraflagellaire, remaniement à la pointe distale du flagelle et utilisation des microtubules A et B des doublets 4 et 7

Une fois les trains IFT assemblés, ils entament leur voyage dans le flagelle dans le sens antérograde et reviennent par la suite à la base du flagelle par le transport rétrograde. Les analyses des kymographes réalisés à partir de films en SIM du mouvement de la GFP::IFT52 suggèrent que chacune des deux voies est autonome et que les trains rétrogrades repartent probablement sur le même doublet que les trains antérogrades dont ils sont dérivés. Les analyses par FIB-SEM n'offrent pas une résolution suffisante pour essayer de discriminer deux types de trains sur base de leur morphologie. Par contre, l'analyse statistique démontre que la répartition de la taille des trains sur chaque doublet n'est pas une gaussienne. Ceci suggère qu'il pourrait y avoir plusieurs populations de trains. D'un point de vue évolutif, il est plausible que la kinésine qui transporte les trains antérogrades marche sur le MT-B et que la dynéine emprunte le MT-A pour le transport rétrograde, comme observé chez *Chlamydomonas*. Mais ceci reste à démontrer formellement chez *T. brucei*, soit par l'utilisation de techniques de CLEM (Stepanek and Pigino, 2016), soit en marquant directement la kinésine et la dynéine, par exemple au moyen de la méthode APEX2 (Lam, Martell et al. 2015). On peut se poser la question de comment se fait la discrimination entre B et A au moment de la transition entre trafic antérograde et rétrograde. Une hypothèse simple serait que l'arrivée continue de trains antérogrades empêche la dynéine d'emprunter le MT-B et qu'elle marche dès lors par défaut sur le MT-A. Une autre hypothèse dans la lignée de nos observations serait une polyglutamylation différentielle entre A et B. Les travaux de Schneider (Schneider, Plessmann et al. 1997) ont montré la présence majeure de tubuline polyglutamylée avec 1-4 résidus et la présence modérée de 5 à 15 résidus. On pourrait imaginer que cette dernière partie corresponde aux doublets 4 et 7 et que la partie majeure correspond aux 7 autres doublets. Dans le groupe 5-15 résidus, une différence dans la longueur de la chaîne polyglutamate pourrait discriminer A et B. Pour le prouver, il faudrait pouvoir isoler chaque doublet séparément, puis séparer le B du A et analyser la composition en tubuline par spectrométrie de masse. Ce genre d'approche n'a pas encore été développé chez les trypanosomes et se heurte à la difficulté de séparer la PFR qui est fermement ancrée à l'axonème. Ceci pourrait toutefois être contourné en utilisant des mutants où l'assemblage de la PFR est inhibé ((Maga and LeBowitz, 1999) ; (Ginger, Collingridge et al. 2013)).

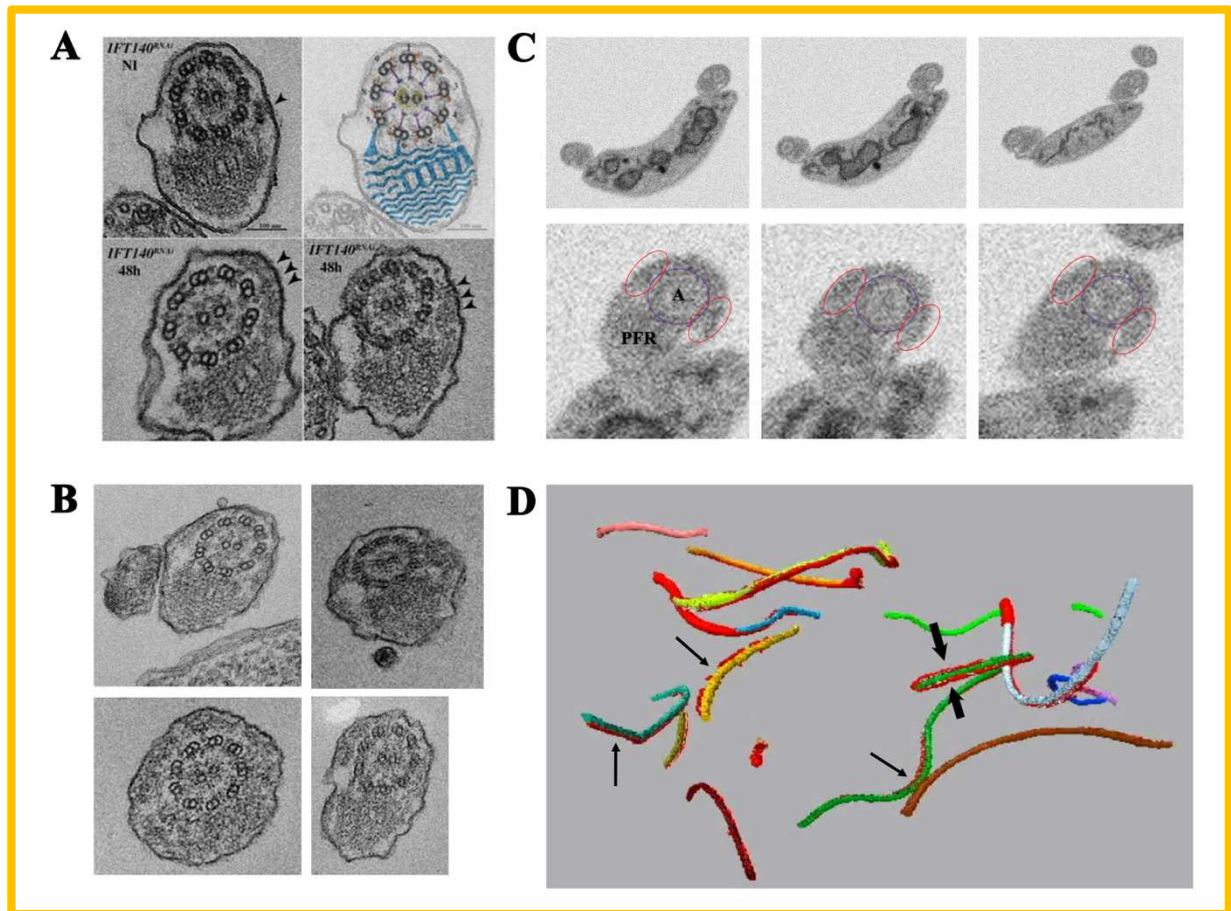


Figure 42 : Visualisation de l'accumulation des trains IFT chez le mutant $IFT140^{RNAi}$

- A) Coupes transversales de flagelle dans la souche $IFT140^{RNAi}$ induites pendant 2 jours. Les têtes de flèches montrent l'accumulation des trains IFT au niveau des doublets 4 des microtubules.
- B) Coupes transversales de l'extrémité distale de plusieurs flagelles dans la souche $IFT140^{RNAi}$ induite pendant deux jours. L'accumulation des trains IFT est visible sur les doublets 4 et 7, plus rarement autour de l'axonème.
- C) Chaque figure provient d'une pile d'images de trypanosomes obtenue par FIB-SEM sur la souche $IFT140^{RNAi}$ induite pendant 2 jours. La rangée du haut est à faible grossissement et la rangée du bas montre les images du flagelle à plus fort grossissement. L'axonème (A) est entouré d'un anneau violet. Les anneaux rouges pointent l'accumulation des trains IFT au niveau des doublets 4 et 7 des microtubules.
- D) Plusieurs portions de flagelle sont reconstruites par analyse FIB-SEM sur les cellules $IFT140^{RNAi}$ induites pendant 2 jours. Chaque axonème est coloré avec une couleur différente et les trains IFT sont indiqués en rouge. Les grosses flèches noires représentent l'accumulation des trains IFT de chaque côté de l'axonème et les petites flèches noires représentent le doublet 4.

La protéine IFT140 appartenant au complexe IFT-A est requise pour l'entrée du moteur dynéine dans le flagelle (Blisnick, Buisson et al. 2014). Dans ces conditions, les trains antérogrades atteignent l'extrémité distale mais l'absence de dynéine ne leur permet pas de revenir sous forme de trains rétrogrades. Comme nous avons démontré que les flagelles assemblés avant ARNi restent présents dans le mutant *IFT140^{RNAi}*, nous avons donc examiné la distribution des trains IFT par microscopie électronique à transmission et par FIB-SEM (Figure 42) Bien qu'il y ait « embouteillage » avec beaucoup de matériel dense aux électrons sur le 4 et le 7 (30% des coupes transversales (Figure 42C), ceci est beaucoup plus flagrant sur le doublet 4 (Figure 42A). Les images obtenues par FIB-SEM sont sans ambiguïté (Figure 42B), les embouteillages de trains sont bien plus longs sur le doublet 4 que sur le doublet 7. Ceci nous avait induits en erreur au départ et nous avons d'abord pensé que ce résultat signifiait que le transport antérograde prenait place sur le doublet 4 et que par déduction le transport rétrograde avait lieu sur le doublet 7 ! Toutefois, l'analyse par microscopie SIM du mouvement de la GFP::IFT52 démontre clairement que les trains font l'aller-retour sur le même rail. Ceci a aussi été confirmé en suivant la GFP::DHC2.1 (chaîne lourde de la dynéine IFT, (Blisnick, Buisson et al. 2014)) dans ces mêmes conditions. Comment expliquer dès lors cette différence d'accumulation de trains entre le doublet 4 et le 7 ? L'hypothèse la plus simple serait que la fréquence des trains soit plus élevée sur le doublet 4 que sur le 7, conduisant donc à des embouteillages plus prononcés. Effectivement, l'analyse par FIB-SEM détecte 1,2 fois plus de trains sur le 4 que sur le 7 mais leur longueur moyenne est plus courte (255 nm au lieu de 387 nm), ce qui ne permet pas d'expliquer le résultat. Une autre possibilité est que IFT140 serait perdue plus rapidement au niveau du doublet 4 plutôt qu'au doublet 7, conduisant à un déséquilibre plus rapide entre trains antérogrades et rétrogrades. Ceci signifierait que le turnover des protéines IFT n'est pas le même entre les deux doublets. La meilleure façon pour essayer de comprendre la différence entre 4 et 7 serait de réaliser une analyse par SIM de cellules vivantes du mutant *IFT140^{RNAi}* à différents temps d'induction vu qu'on peut maintenant discriminer les deux rails. Une comparaison avec les mutants ciblant les sous-unités du moteur dynéine serait aussi intéressante (Blisnick, Buisson et al. 2014).

L'accumulation différentielle de trains sur le doublet 4 chez le mutant *IFT140^{RNAi}* suggère que le trafic sur 4 et 7 pourrait être différent et donc avoir des fonctions différentes. On mentionnera ici l'observation en SIM où le fait de faire adhérer les trypanosomes sur une lame couverte de poly-lysine entraîne l'arrêt quasi-total du trafic sur un des deux rails alors que l'autre fonctionne semble fonctionner normalement (Figure 43). Ceci pourrait s'expliquer si un

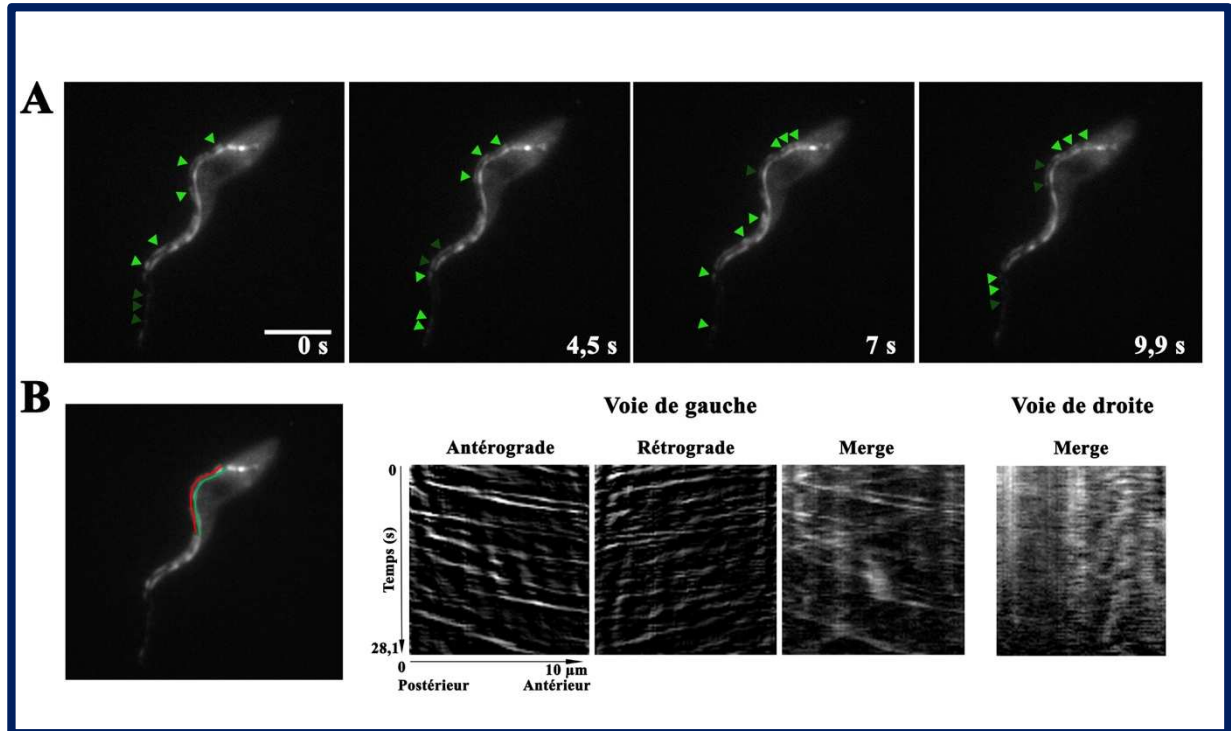


Figure 43 : Visualisation du transport intraflagellaire eGFP::IFT52 chez des cellules adhérentes à la poly-lysine par microscopie SIM

- A) Les trypanosomes exprimant la protéine eGFP::IFT52 sont placés sur une lame coatée avec la poly-lysine et observés par microscopie SIM. Le suivi des trains IFT antérogrades (vert clairs) et rétrograde (vert foncé) sur la voie de gauche est représenté par des flèches de couleurs. Sur la voie de droite, le transport intraflagellaire semble bloqué. Le temps d'acquisition est de 28,15s. Barre d'échelle 5 μm .
- B) Les traits rouge (voie de gauche) et vert (voie de droite) montrent la zone d'analyse des kymographes. La génération de kymographe de chacune des deux voies permet de séparer le transport antérograde et rétrograde et de déterminer la vitesse et la fréquence des trains dans les deux directions. Dans la seconde voie, les trains IFT paraissent arrêtés.

côté du flagelle était « collé » à la lame de poly-lysine peut-être par l'intermédiaire de protéines transmembranaires. Est-ce que ce rail transporterait des protéines transmembranaires qui colleraient à la poly-lysine ? Ou serait-ce purement celui qui est le plus proche de la lame ? Pour aller plus loin, on pourrait imaginer d'incuber des trypanosomes avec des billes de polystyrène recouvertes de poly-lysine et de vérifier si celles-ci sont déplacées par IFT. Il y a une quarantaine d'années, Bob Bloodgood avait observé que de telles billes pouvaient être déplacées à la surface des flagelles de *Chlamydomonas* (Bloodgood 1977), bien que le lien avec l'IFT ou la signification biologique n'ait pas été établi à ce jour (Kozminski, 2012). En cas de résultat positif, des expériences de quantification ou de cross-linking pourraient être envisagées.

Que se passe-t-il à l'extrémité distale du flagelle ? Des expériences de photoblanchiment ont démontré qu'il faut environ 3 à 4 secondes aux protéines composant les trains antérogrades pour être détectées dans environ trois fois plus de trains rétrogrades et repartir à une vitesse plus élevée qu'à l'aller (Buisson, Chenouard et al. 2013). Ces résultats ont été confirmés par microscopie SIM en photo-blanchissant seulement le bout distal (Figure 41). On aperçoit nettement la trace fluorescente laissée par l'arrivée de chaque train antérograde et une durée de X secondes avant de voir l'émergence de plusieurs trains rétrogrades, et ce sur les deux rails. Par ailleurs, l'observation du bout distal en TEM révèle la présence d'une quantité abondante de matériel dense aux électrons (données non montrée), qui pourrait correspondre à des trains en cours de remaniement.

Comment se fragmente le train ? On pourrait imaginer que des protéines « réceptrices » prendraient en charge le train antérograde pour le fragmenter en trains rétrogrades, désactiveraient la kinésine pour ensuite activer la dynéine. Toutefois, de nombreux criblages sur la fonction des cils sensoriels ont été réalisés chez *C. elegans* et en dehors des gènes encodant les protéines ou moteurs de l'IFT, aucun gène capable de remplir une telle fonction n'a été identifié. Pareillement, plusieurs mutants « chauves » ont été obtenus chez *Chlamydomonas* et les gènes identifiés jusqu'ici encodent soit des protéines IFT, soit des protéines impliquées dans la duplication ou la maturation du corps basal. L'hypothèse la plus simple serait que lorsque le train antérograde arrive en fin de course, la kinésine décroche du microtubule et se dissocie du train et la dynéine qui est transportée comme cargo à l'aller se raccroche au tubule voisin par son site de liaison et démarre sa marche vers la base. Ce modèle explique plus difficilement la fragmentation du train antérograde en trains rétrogrades plus petits. Une troisième hypothèse suppose que tous les éléments nécessaires à la fragmentation sont compris dans les trains IFT. On aurait pu suspecter que le complexe A rempli le rôle de la

conversion des trains antérogrades en rétrogrades vu que l'inactivation de n'importe quel de ses composants conduit à l'accumulation d'un excès de matériel IFT au bout distal (Absalon, Blisnick et al. 2008). Toutefois, il semblerait que le rôle du complexe A consiste en l'importation de la dynéine (Blisnick, 2014). On aurait pu songer aux petites protéines G à activité GTPase (IFT22/IFT25/IFT27) où la transition entre forme active ou inactive contribuerait au remaniement des trains au bout distal. En effet, leur extinction par ARNi chez *T. brucei* provoque aussi un défaut de recyclage des trains au bout distal ((Adhiambo, Blisnick et al. 2009) ; (Huet, Blisnick et al. 2014)). L'analyse structurale du sous-complexe IFT25/27 a révélé un patch de surface qui pourrait être sensible aux interactions protéine-protéines (Bhogaraju, Taschner et al. 2011). Ce patch de surface pourrait être responsable de l'interaction entre le sous complexe IFT25/27 et le complexe IFT-B et pourrait contrôler les interactions entre le sous-complexe et les partenaires de liaison potentiels trouvés à la pointe du flagelle. Toutefois, IFT27 est aussi essentiel au chargement de la dynéine (Huet, Blisnick et al. 2014), ce qui complique aussi l'interprétation.

5.8 Retour à la base et recyclage du matériel IFT

Lorsque les trains IFT antérogrades sont segmentés en plusieurs trains rétrogrades, ces derniers regagnent rapidement la base du flagelle. Les trains rétrogrades arrivent-ils directement à la base du flagelle ou sont-ils freinés par la barrière physique que pourrait constituer la zone de transition ? Cet endroit n'est pas facile d'accès car le flagelle se plie en sortant de la poche flagellaire et la zone de transition est donc souvent inclinée, ce qui complique l'observation. Les études par FRAP et par photoconversion suggèrent que les protéines IFT composant les trains rétrogrades sont recyclées puisqu'on les retrouve dans des trains antérogrades. Nous avons démontré qu'il y avait un turnover des protéines IFT et on peut donc se demander le nombre de cycles que peut faire une protéine IFT ? Par exemple, on pourrait imaginer que chaque passage au bout distal (ou à la base au retour de trains rétrogrades) entraîne l'addition d'une marque spécifique au niveau des protéines IFT comme l'ajout de phosphate ou l'ajout de molécule d'ubiquitine. A ce sujet, on rappellera que plusieurs ubiquitine ligases ont été détectées dans le protéome de flagelles intacts de *T. brucei* (Subota, Julkowska et al. 2014). De plus, des données récentes indiquent que le BBSome des trypanosomes interagit avec l'ubiquitine (Langousis, Shimogawa et al. 2016). Lorsque les protéines IFT sont suffisamment marquées, elles seraient soit éliminées sélectivement du flagelle, soit incapables de s'associer aux trains et dès lors diluées par les molécules IFT fraîchement synthétisées.

5.9 Rôle de l'ATP ?

A l'intérieur du flagelle, les moteurs kinésine/dynéine ont besoin de molécules d'ATP pour se déplacer. Toutefois, la quantification du taux d'ATP présent dans le flagelle des cellules vivantes n'est pas aisée à réaliser. La vitesse de déplacement de la kinésine est variable en fonction de son chargement mais la vitesse moyenne décrite chez *T. brucei* est de l'ordre de 2,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$. La kinésine 1 peut se déplacer à une vitesse maximale de 0,8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ ce qui correspondrait à 100 pas (Schnitzer and Block, 1997). Dans la littérature, chaque pas effectuée par la kinésine consommerait une molécule d'ATP. En supposant une valeur équivalente pour la kinésine 2 et en prenant en compte la longueur du flagelle de *T. brucei* de 20 μm , un aller simple de la base à l'extrémité distale du flagelle nécessiterait l'utilisation de 2 500 molécules d'ATP pour parcourir (1 molécule d'ATP est utilisée tous les 8 nm ; $20\,000/8 = 2\,500$ molécules d'ATP). Ceci peut paraître important mais c'est finalement minime par rapport à la quantité d'ATP consommé par les moteurs dynéines de l'axonème qui sont responsables du battement. Une étude a permis d'estimer qu'un seul battement de flagelle d'un spermatozoïde d'oursin consommerait environ 23 000 molécules d'ATP (Chen, 2005). Le battement flagellaire de *T. brucei* est de 15 Hz, soit 300 battements pour une durée de 20 secondes qui correspond à un cycle IFT. La quantité de molécules d'ATP doit donc être en excès par rapport à ce que l'IFT consomme. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer sa disponibilité dans le flagelle : (1) l'ATP est synthétisée dans le cytoplasme, passe par la base du flagelle et diffuse librement dans l'organite, permettant aux moteurs moléculaires de l'hydrolyser pour se déplacer le long des microtubules. Dans le cas du trypanosome, le fait que le flagelle soit attaché au corps cellulaire pourrait peut-être permettre le passage de molécules d'ATP cytoplasmique par des transporteurs transmembranaires. (2) L'ATP pourrait aussi être produit directement dans le flagelle par l'intermédiaire de différentes voies métaboliques comme la glycolyse (Mitchell, Pedersen et al. 2005). (3) L'ATP pourrait aussi être transporté sous forme de cargo par les IFT et libéré au cours du transport pour être hydrolysé dans le compartiment flagellaire. Cette hypothèse est séduisante vu qu'elle pourrait expliquer pourquoi l'IFT reste actif dans les flagelles matures. On rappellera que nous avons montré que les anciens flagelles des mutants *IFT140^{RNAi}* et *IFT88^{RNAi}* ne battent plus après l'arrêt de l'IFT (Article p 114). Ceci pourrait bien sûr être dû à un défaut de turnover d'une protéine impliquée dans le battement mais est aussi compatible avec l'hypothèse du transport de l'ATP par l'IFT. Malheureusement, cette proposition n'est vraiment pas facile à démontrer vu qu'elle demanderait de pouvoir visualiser l'ATP en temps réel ! On notera que dans le flagelle du spermatozoïde de souris, l'IFT n'est

plus présent après construction du flagelle (San Agustin, Pazour et al. 2015) mais des rubans de mitochondries encerclent la première partie du flagelle (Fawcett, 1975) et pourraient donc fournir de l'énergie directement.

Pour conclure, ces quatre années de thèse nous ont permis de mettre en évidence le rôle de l'IFT dans les flagelles matures et de visualiser pour la première fois dans les cellules vivantes les deux voies du transport intraflagellaire. C'est par la mise en évidence de ces deux voies que de nombreuses expérimentations complémentaires pourront être envisagées comme par exemple l'étude du transport des protéines IFT dans le cytoplasme ou la localisation des différents pools IFT dans le flagelle chez *T. brucei*. La découverte de la mise en place d'une modification post-traductionnelle au niveau des deux rails du transport intraflagellaire va permettre d'étudier le rôle individuel ou synergique des différentes enzymes de la famille des TTLL qui catalysent le mécanisme de polyglutamylation.

BIBLIOGRAPHIE

Absalon, S., T. Blisnick, M. Bonhivers, L. Kohl, N. Cayet, G. Toutirais, J. Buisson, D. Robinson and P. Bastin (2008). "Flagellum elongation is required for correct structure, orientation and function of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*." J Cell Sci **121**(Pt 22): 3704-3716.

Absalon, S., T. Blisnick, L. Kohl, G. Toutirais, G. Dore, D. Julkowska, A. Tavenet and P. Bastin (2008). "Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes." Mol Biol Cell **19**(3): 929-944.

Absalon, S., L. Kohl, C. Branche, T. Blisnick, G. Toutirais, F. Rusconi, J. Cosson, M. Bonhivers, D. Robinson and P. Bastin (2007). "Basal body positioning is controlled by flagellum formation in *Trypanosoma brucei*." PLoS One **2**(5): e437.

Adhiambo, C., T. Blisnick, G. Toutirais, E. Delannoy and P. Bastin (2009). "A novel function for the atypical small G protein Rab-like 5 in the assembly of the trypanosome flagellum." J Cell Sci **122**(Pt 6): 834-841.

Adhiambo, C., J. D. Forney, D. J. Asai and J. H. LeBowitz (2005). "The two cytoplasmic dynein-2 isoforms in *Leishmania mexicana* perform separate functions." Mol Biochem Parasitol **143**(2): 216-225.

Afzelius, B. A. (1976). "A human syndrome caused by immotile cilia." Science **193**(4250): 317-319.

Afzelius, B. A. (1998). "Genetics and pulmonary medicine. 6. Immotile cilia syndrome: past, present, and prospects for the future." Thorax **53**(10): 894-897.

Afzelius, B. A. (2004). "Cilia-related diseases." J Pathol **204**(4): 470-477.

Ahmed, N. T., C. Gao, B. F. Lucker, D. G. Cole and D. R. Mitchell (2008). "ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery." J Cell Biol **183**(2): 313-322.

Alexander, J. and R. S. Phillips (1978). "*Leishmania mexicana* and *L. tropica*: inhibition of growth in mice by concurrent infections of *Trypanosoma brucei*." Exp Parasitol **44**(1): 136-142.

Alsford, S., D. J. Turner, S. O. Obado, A. Sanchez-Flores, L. Glover, M. Berriman, C. Hertz-Fowler and D. Horn (2011). "High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome." Genome Res **21**(6): 915-924.

Ando, R., H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno and A. Miyawaki (2002). "An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12651-12656.

Ansley, S. J., J. L. Badano, O. E. Blacque, J. Hill, B. E. Hoskins, C. C. Leitch, J. C. Kim, A. J. Ross, E. R. Eichers, T. M. Teslovich, A. K. Mah, R. C. Johnsen, J. C. Cavender, R. A. Lewis, M. R. Leroux, P. L. Beales and N. Katsanis (2003). "Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome." Nature **425**(6958): 628-633.

Archer, S. K., D. Inchaustegui, R. Queiroz and C. Clayton (2011). "The cell cycle regulated transcriptome of *Trypanosoma brucei*." PLoS One **6**(3): e18425.

Avidor-Reiss, T., A. M. Maer, E. Koundakjian, A. Polyanovsky, T. Keil, S. Subramaniam and C. S. Zuker (2004). "Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis." Cell **117**(4): 527-539.

Baccetti, B., R. Dallai and B. Fratello (1973). "The spermatozoon of arthropoda. XXII. The 12+0', 14+0' or aflagellate sperm of protura." J Cell Sci **13**(2): 321-335.

Badano, J. L., J. C. Kim, B. E. Hoskins, R. A. Lewis, S. J. Ansley, D. J. Cutler, C. Castellán, P. L. Beales, M. R. Leroux and N. Katsanis (2003). "Heterozygous mutations in BBS1, BBS2 and BBS6 have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus." Hum Mol Genet **12**(14): 1651-1659.

Bargul, J. L., J. Jung, F. A. McOdimba, C. O. Omogo, V. O. Adung'a, T. Kruger, D. K. Masiga and M. Engstler (2016). "Species-Specific Adaptations of Trypanosome Morphology and Motility to the Mammalian Host." PLoS Pathog **12**(2): e1005448.

Barnes, B. G. (1961). "Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis." J Ultrastruct Res **5**: 453-467.

Bastin, P., T. H. MacRae, S. B. Francis, K. R. Matthews and K. Gull (1999). "Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes." Mol Cell Biol **19**(12): 8191-8200.

Bastin, P., T. J. Pullen, F. F. Moreira-Leite and K. Gull (2000). "Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle." Microbes Infect **2**(15): 1865-1874.

Bastin, P., T. Sherwin and K. Gull (1998). "Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility." Nature **391**(6667): 548.

Benmerah, A. (2014). "[The ciliary pocket: a rendezvous between the centrosome and vesicular trafficking]." Med Sci (Paris) **30**(11): 962-967.

Berriman, M., E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, G. Blandin, H. Renault, D. C. Bartholomeu, N. J. Lennard, E. Caler, N. E. Hamlin, B. Haas, U. Bohme, L. Hannick, M. A. Aslett, J. Shallom, L. Marcello, L. Hou, B. Wickstead, U. C. Alsmark, C. Arrowsmith, R. J. Atkin, A. J. Barron, F. Bringaud, K. Brooks, M. Carrington, I. Cherevach, T. J. Chillingworth, C. Churcher, L. N. Clark, C. H. Corton, A. Cronin, R. M. Davies, J. Doggett, A. Djikeng, T. Feldblyum, M. C. Field, A. Fraser, I. Goodhead, Z. Hance, D. Harper, B. R. Harris, H. Hauser, J. Hostetler, A. Ivens, K. Jagels, D. Johnson, J. Johnson, K. Jones, A. X. Kerhornou, H. Koo, N. Larke, S. Landfear, C. Larkin, V. Leech, A. Line, A. Lord, A. Macleod, P. J. Mooney, S. Moule, D. M. Martin, G. W. Morgan, K. Mungall, H. Norbertczak, D. Ormond, G. Pai, C. S. Peacock, J. Peterson, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, C. Reitter, S. L. Salzberg, M. Sanders, S. Schobel, S. Sharp, M. Simmonds, A. J. Simpson, L. Tallon, C. M. Turner, A. Tait, A. R. Tivey, S. Van Aken, D. Walker, D. Wanless, S. Wang, B. White, O. White, S. Whitehead, J. Woodward, J. Wortman, M. D. Adams, T. M. Embley, K. Gull, E. Ullu, J. D. Barry, A. H. Fairlamb, F. Opperdoes, B. G. Barrell, J. E. Donelson, N. Hall, C. M. Fraser, S. E. Melville and N. M. El-Sayed (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." Science **309**(5733): 416-422.

Bhogaraju, S., L. Cajanek, C. Fort, T. Blisnick, K. Weber, M. Taschner, N. Mizuno, S. Lamla, P. Bastin, E. A. Nigg and E. Lorentzen (2013). "Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81." Science **341**(6149): 1009-1012.

Bhogaraju, S., M. Taschner, M. Morawetz, C. Basquin and E. Lorentzen (2011). "Crystal structure of the intraflagellar transport complex 25/27." EMBO J **30**(10): 1907-1918.

Bisgrove, B. W. and H. J. Yost (2006). "The roles of cilia in developmental disorders and disease." Development **133**(21): 4131-4143.

Blacque, O. E. and M. R. Leroux (2006). "Bardet-Biedl syndrome: an emerging pathomechanism of intracellular transport." Cell Mol Life Sci **63**(18): 2145-2161.

Blacque, O. E., M. J. Reardon, C. Li, J. McCarthy, M. R. Mahjoub, S. J. Ansley, J. L. Badano, A. K. Mah, P. L. Beales, W. S. Davidson, R. C. Johnsen, M. Audeh, R. H. Plasterk, D. L. Baillie, N. Katsanis, L. M. Quarby, S. R. Wicks and M. R. Leroux (2004). "Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport." Genes Dev **18**(13): 1630-1642.

Blisnick, T., J. Buisson, S. Absalon, A. Marie, N. Cayet and P. Bastin (2014). "The intraflagellar transport dynein complex of trypanosomes is made of a heterodimer of dynein heavy chains and of light and intermediate chains of distinct functions." Mol Biol Cell **25**(17): 2620-2633.

Bloodgood, R. A. (1977). "Motility occurring in association with the surface of the *Chlamydomonas* flagellum." J Cell Biol **75**(3): 983-989.

Bonhivers, M., S. Nowacki, N. Landrein and D. R. Robinson (2008). "Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated." PLoS Biol **6**(5): e105.

Brain, J. D. (1977). "Anesthesia and respiratory defense mechanisms." Int Anesthesiol Clin **15**(2): 169-198.

Branche, C., L. Kohl, G. Toutirais, J. Buisson, J. Cosson and P. Bastin (2006). "Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility." J Cell Sci **119**(Pt 16): 3443-3455.

Brazelton, W. J., C. D. Amundsen, C. D. Silflow and P. A. Lefebvre (2001). "The *bld1* mutation identifies the *Chlamydomonas* *osm-6* homolog as a gene required for flagellar assembly." Curr Biol **11**(20): 1591-1594.

Briggs, L. J., P. G. McKean, A. Baines, F. Moreira-Leite, J. Davidge, S. Vaughan and K. Gull (2004). "The flagella connector of *Trypanosoma brucei*: an unusual mobile transmembrane junction." J Cell Sci **117**(Pt 9): 1641-1651.

Broadhead, R., H. R. Dawe, H. Farr, S. Griffiths, S. R. Hart, N. Portman, M. K. Shaw, M. L. Ginger, S. J. Gaskell, P. G. McKean and K. Gull (2006). "Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome." Nature **440**(7081): 224-227.

Brown, J. M., C. Marsala, R. Kosoy and J. Gaertig (1999). "Kinesin-II is preferentially targeted to assembling cilia and is required for ciliogenesis and normal cytokinesis in *Tetrahymena*." Mol Biol Cell **10**(10): 3081-3096.

Bruce, D. (1895). "Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand. ." D.B.a. Davis, Editor.

Brugerolle, G. (1992). "Flagellar apparatus duplication and partition, flagellar transformation during division in *Entosiphon sulcatum*." Biosystems **28**(1-3): 203-209.

Brun, R., J. Blum, F. Chappuis and C. Burri (2010). "Human African trypanosomiasis." Lancet **375**(9709): 148-159.

Brun, R. and Schonenberger (1979). "Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication." Acta Trop **36**(3): 289-292.

Buisson, J., N. Chenouard, T. Lagache, T. Blisnick, J. C. Olivo-Marin and P. Bastin (2013). "Intraflagellar transport proteins cycle between the flagellum and its base." J Cell Sci **126**(Pt 1): 327-338.

Callaini, G., R. Dallai and M. G. Riparbelli (1997). "Wolbachia-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*." J Cell Sci **110** (Pt 2): 271-280.

Calvert, P. D., K. J. Strissel, W. E. Schiesser, E. N. Pugh, Jr. and V. Y. Arshavsky (2006). "Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors." Trends Cell Biol **16**(11): 560-568.

Capdevila, J., K. J. Vogan, C. J. Tabin and J. C. Izpisua Belmonte (2000). "Mechanisms of left-right determination in vertebrates." Cell **101**(1): 9-21.

Casanova, M., F. de Monbrison, J. van Dijk, C. Janke, M. Pages and P. Bastien (2015). "Characterisation of polyglutamylases in trypanosomatids." Int J Parasitol **45**(2-3): 121-132.

Cavalier-Smith, T. (1974). "Basal body and flagellar development during the vegetative cell cycle and the sexual cycle of *Chlamydomonas reinhardii*." J Cell Sci **16**(3): 529-556.

Cevik, S., A. A. Sanders, E. Van Wijk, K. Boldt, L. Clarke, J. van Reeuwijk, Y. Hori, N. Horn, L. Hetterschijt, A. Wdowicz, A. Mullins, K. Kida, O. I. Kaplan, S. E. van Beersum, K. Man Wu, S. J. Letteboer, D. A. Mans, T. Katada, K. Kontani, M. Ueffing, R. Roepman, H. Kremer and O. E. Blacque (2013). "Active transport and diffusion barriers restrict Joubert Syndrome-associated ARL13B/ARL-13 to an Inv-like ciliary membrane subdomain." PLoS Genet **9**(12): e1003977.

Chang, B., H. Khanna, N. Hawes, D. Jimeno, S. He, C. Lillo, S. K. Parapuram, H. Cheng, A. Scott, R. E. Hurd, J. A. Sayer, E. A. Otto, M. Attanasio, J. F. O'Toole, G. Jin, C. Shou, F. Hildebrandt, D. S. Williams, J. R. Heckenlively and A. Swaroop (2006). "In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse." Hum Mol Genet **15**(11): 1847-1857.

Chappuis, F., M. A. Lima, L. Flevaud and K. Ritmeijer (2010). "Human African trypanosomiasis in areas without surveillance." Emerg Infect Dis **16**(2): 354-356.

Chretien, D., B. Buendia, S. D. Fuller and E. Karsenti (1997). "Reconstruction of the centrosome cycle from cryoelectron micrographs." J Struct Biol **120**(2): 117-133.

Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." EMBO J **21**: 1881-1888.

Cole, D. G., S. W. Chinn, K. P. Wedaman, K. Hall, T. Vuong and J. M. Scholey (1993). "Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs." Nature **366**(6452): 268-270.

Cole, D. G., D. R. Diener, A. L. Himelblau, P. L. Beech, J. C. Fuster and J. L. Rosenbaum (1998). "Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons." J Cell Biol **141**(4): 993-1008.

Cooper, R., A. R. de Jesus and G. A. Cross (1993). "Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion." J Cell Biol **122**(1): 149-156.

Craft, J. M., J. A. Harris, S. Hyman, P. Kner and K. F. Lehtreck (2015). "Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism." J Cell Biol **208**(2): 223-237.

Craige, B., C. C. Tsao, D. R. Diener, Y. Hou, K. F. Lehtreck, J. L. Rosenbaum and G. B. Witman (2010). "CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content." J Cell Biol **190**(5): 927-940.

Cross, G. A. (1978). "Antigenic variation in trypanosomes." Proc R Soc Lond B Biol Sci **202**(1146): 55-72.

Dallai, R., P. Lupetti and C. Mencarelli (2006). "Unusual axonemes of hexapod spermatozoa." Int Rev Cytol **254**: 45-99.

Dawe, H. R., U. M. Smith, A. R. Cullinane, D. Gerrelli, P. Cox, J. L. Badano, S. Blair-Reid, N. Sriram, N. Katsanis, T. Attie-Bitach, S. C. Afford, A. J. Copp, D. A. Kelly, K. Gull and C. A. Johnson (2007). "The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation." Hum Mol Genet **16**(2): 173-186.

Deane, J. A., D. G. Cole, E. S. Seeley, D. R. Diener and J. L. Rosenbaum (2001). "Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles." Curr Biol **11**(20): 1586-1590.

Demonchy, R., T. Blisnick, C. Deprez, G. Toutirais, C. Loussert, W. Marande, P. Grellier, P. Bastin and L. Kohl (2009). "Kinesin 9 family members perform separate functions in the trypanosome flagellum." J Cell Biol **187**(5): 615-622.

Dentler, W. (2005). "Intraflagellar transport (IFT) during assembly and disassembly of *Chlamydomonas* flagella." J Cell Biol **170**(4): 649-659.

Dujardin, F. (1841). "Histoire naturelle des zoophytes infusoires, comprenant la physiologie et la classification de ces animaux. Roret, Paris." **2 vol. pp.**

Emmer, B. T., M. D. Daniels, J. M. Taylor, C. L. Epting and D. M. Engman (2010). "Calflagin inhibition prolongs host survival and suppresses parasitemia in *Trypanosoma brucei* infection." Eukaryot Cell **9**(6): 934-942.

Engel, B. D., K. F. Lehtreck, T. Sakai, M. Ikebe, G. B. Witman and W. F. Marshall (2009). "Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy of *Chlamydomonas* flagella." Methods Cell Biol **93**: 157-177.

Engstler, M., T. Pfohl, S. Herminghaus, M. Boshart, G. Wiegertjes, N. Heddergott and P. Overath (2007). "Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes." Cell **131**(3): 505-515.

Fan, Z. C., R. H. Behal, S. Geimer, Z. Wang, S. M. Williamson, H. Zhang, D. G. Cole and H. Qin (2010). "Chlamydomonas IFT70/CrDYF-1 is a core component of IFT particle complex B and is required for flagellar assembly." Mol Biol Cell **21**(15): 2696-2706.

Fawcett, D. W. (1975). "The mammalian spermatozoon." Dev Biol **44**(2): 394-436.

Field, M. C., S. K. Natesan, C. Gabernet-Castello and V. L. Koumandou (2007). "Intracellular trafficking in the trypanosomatids." Traffic **8**(6): 629-639.

Finetti, F., S. R. Paccani, M. G. Riparbelli, E. Giacomello, G. Perinetti, G. J. Pazour, J. L. Rosenbaum and C. T. Baldari (2009). "Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse." Nat Cell Biol **11**(11): 1332-1339.

Fliegauf, M., T. Benzing and H. Omran (2007). "When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 880-893.

Follit, J. A., J. T. San Agustin, F. Xu, J. A. Jonassen, R. Samtani, C. W. Lo and G. J. Pazour (2008). "The Golgin GMAP210/TRIP11 anchors IFT20 to the Golgi complex." PLoS Genet **4**(12): e1000315.

Follit, J. A., F. Xu, B. T. Keady and G. J. Pazour (2009). "Characterization of mouse IFT complex B." Cell Motil Cytoskeleton **66**(8): 457-468.

Franco, J. R., P. P. Simarro, A. Diarra and J. G. Jannin (2014). "Epidemiology of human African trypanosomiasis." Clin Epidemiol **6**: 257-275.

Franklin, J. B. and E. Ullu (2010). "Biochemical analysis of PIFTC3, the *Trypanosoma brucei* orthologue of nematode DYF-13, reveals interactions with established and putative intraflagellar transport components." Mol Microbiol **78**(1): 173-186.

Frevert, U., A. Movila, O. V. Nikolskaia, J. Raper, Z. B. Mackey, M. Abdulla, J. McKerrow and D. J. Grab (2012). "Early invasion of brain parenchyma by African trypanosomes." PLoS One **7**(8): e43913.

Gallo, J. M., E. Precigout and J. Schrevel (1988). "Subcellular sequestration of an antigenically unique beta-tubulin." Cell Motil Cytoskeleton **9**(2): 175-183.

Gibbons, B. H., D. J. Asai, W. J. Tang, T. S. Hays and I. R. Gibbons (1994). "Phylogeny and expression of axonemal and cytoplasmic dynein genes in sea urchins." Mol Biol Cell **5**(1): 57-70.

Gibbons, I. R. (1961). "Structural asymmetry in cilia and flagella." Nature **190**: 1128-1129.

Gibbons, I. R. and A. V. Grimstone (1960). "On flagellar structure in certain flagellates." J Biophys Biochem Cytol **7**: 697-716.

Gilula, N. B. and P. Satir (1972). "The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization." J Cell Biol **53**(2): 494-509.

Ginger, M. L., P. W. Collingridge, R. W. Brown, R. Sproat, M. K. Shaw and K. Gull (2013). "Calmodulin is required for paraflagellar rod assembly and flagellum-cell body attachment in trypanosomes." Protist **164**(4): 528-540.

Ginger, M. L., N. Portman and P. G. McKean (2008). "Swimming with protists: perception, motility and flagellum assembly." Nat Rev Microbiol **6**(11): 838-850.

Godsel, L. M. and D. M. Engman (1999). "Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism." EMBO J **18**(8): 2057-2065.

Graser, S., Y. D. Stierhof, S. B. Lavoie, O. S. Gassner, S. Lamla, M. Le Clech and E. A. Nigg (2007). "Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation." J Cell Biol **179**(2): 321-330.

Grillo, M. A. and S. L. Palay (1963). "Ciliated Schwann cells in the autonomic nervous system of the adult rat." J Cell Biol **16**: 430-436.

Han, Y. G., B. H. Kwok and M. J. Kernan (2003). "Intraflagellar transport is required in *Drosophila* to differentiate sensory cilia but not sperm." Curr Biol **13**(19): 1679-1686.

Haycraft, C. J., P. Swoboda, P. D. Taulman, J. H. Thomas and B. K. Yoder (2001). "The *C. elegans* homolog of the murine cystic kidney disease gene Tg737 functions in a ciliogenic pathway and is disrupted in *osm-5* mutant worms." Development **128**(9): 1493-1505.

Heddergott, N., T. Kruger, S. B. Babu, A. Wei, E. Stellamanns, S. Uppaluri, T. Pfohl, H. Stark and M. Engstler (2012). "Trypanosome motion represents an adaptation to the crowded environment of the vertebrate bloodstream." PLoS Pathog **8**(11): e1003023.

Heuser, T., M. Raytchev, J. Krell, M. E. Porter and D. Nicastro (2009). "The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella." J Cell Biol **187**(6): 921-933.

Hoog, J. L., S. Lacomble, C. Bouchet-Marquis, L. Briggs, K. Park, A. Hoenger and K. Gull (2016). "3D Architecture of the *Trypanosoma brucei* Flagella Connector, a Mobile Transmembrane Junction." PLoS Negl Trop Dis **10**(1): e0004312.

Hoog, J. L., S. Lacomble, E. T. O'Toole, A. Hoenger, J. R. McIntosh and K. Gull (2014). "Modes of flagellar assembly in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Trypanosoma brucei*." Elife **3**: e01479.

Hoops, H. J. and G. L. Floyd (1983). "Ultrastructure and development of the flagellar apparatus and flagellar motion in the colonial green alga *Astrephomene gubernaculifera*." J Cell Sci **63**: 21-41.

Horn, D. (2014). "Antigenic variation in African trypanosomes." Mol Biochem Parasitol **195**(2): 123-129.

Hou, Y., G. J. Pazour and G. B. Witman (2004). "A dynein light intermediate chain, D1bLIC, is required for retrograde intraflagellar transport." Mol Biol Cell **15**(10): 4382-4394.

Hou, Y., H. Qin, J. A. Follit, G. J. Pazour, J. L. Rosenbaum and G. B. Witman (2007). "Functional analysis of an individual IFT protein: IFT46 is required for transport of outer dynein arms into flagella." J Cell Biol **176**(5): 653-665.

Hu, Q., L. Milenkovic, H. Jin, M. P. Scott, M. V. Nachury, E. T. Spiliotis and W. J. Nelson (2010). "A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution." Science **329**(5990): 436-439.

Huangfu, D., A. Liu, A. S. Rakeman, N. S. Murcia, L. Niswander and K. V. Anderson (2003). "Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins." Nature **426**(6962): 83-87.

Huet, D., T. Blisnick, S. Perrot and P. Bastin (2014). "The GTPase IFT27 is involved in both anterograde and retrograde intraflagellar transport." Elife **3**: e02419.

Huet, G., C. Richet, D. Demeyer, H. Bisiau, B. Soudan, D. Tetaert, K. K. Han and P. Degand (1992). "Characterization of different proteolytic activities in *Trypanosoma brucei* brucei." Biochim Biophys Acta **1138**(3): 213-221.

Hutchings, N. R., J. E. Donelson and K. L. Hill (2002). "Trypanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in African trypanosomes." J Cell Biol **156**(5): 867-877.

Ishikawa, H., A. Kubo, S. Tsukita and S. Tsukita (2005). "Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia." Nat Cell Biol **7**(5): 517-524.

Janke, C., K. Rogowski, D. Wloga, C. Regnard, A. V. Kajava, J. M. Strub, N. Temurak, J. van Dijk, D. Boucher, A. van Dorsselaer, S. Suryavanshi, J. Gaertig and B. Edde (2005). "Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family." Science **308**(5729): 1758-1762.

Jauregui, A. R., K. C. Nguyen, D. H. Hall and M. M. Barr (2008). "The *Caenorhabditis elegans* nephrocystins act as global modifiers of cilium structure." J Cell Biol **180**(5): 973-988.

Jiang, S. T., Y. Y. Chiou, E. Wang, Y. L. Chien, H. H. Ho, F. J. Tsai, C. Y. Lin, S. P. Tsai and H. Li (2009). "Essential role of nephrocystin in photoreceptor intraflagellar transport in mouse." Hum Mol Genet **18**(9): 1566-1577.

Kelly, S., J. Reed, S. Kramer, L. Ellis, H. Webb, J. Sunter, J. Salje, N. Marinsek, K. Gull, B. Wickstead and M. Carrington (2007). "Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci." Mol Biochem Parasitol **154**(1): 103-109.

Kennedy, P. G. (2008). "The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness)." Ann Neurol **64**(2): 116-126.

Kim, J. C., Y. Y. Ou, J. L. Badano, M. A. Esmail, C. C. Leitch, E. Fiedrich, P. L. Beales, J. M. Archibald, N. Katsanis, J. B. Rattner and M. R. Leroux (2005). "MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis." J Cell Sci **118**(Pt 5): 1007-1020.

Kisalu, N. K., G. Langousis, L. A. Bentolila, K. S. Ralston and K. L. Hill (2014). "Mouse infection and pathogenesis by *Trypanosoma brucei* motility mutants." Cell Microbiol **16**(6): 912-924.

Kobets, T., I. Grekov and M. Lipoldova (2012). "Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment." Curr Med Chem **19**(10): 1443-1474.

Kohl, L. and P. Bastin (2005). "The flagellum of trypanosomes." Int Rev Cytol **244**: 227-285.

Kohl, L. and K. Gull (1998). "Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton." Mol Biochem Parasitol **93**(1): 1-9.

Kohl, L., D. Robinson and P. Bastin (2003). "[The flagellum: from cell motility to morphogenesis]." J Soc Biol **197**(4): 379-387.

Kohl, L., D. Robinson and P. Bastin (2003). "Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes." EMBO J **22**(20): 5336-5346.

Kohl, L., T. Sherwin and K. Gull (1999). "Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle." J Eukaryot Microbiol **46**(2): 105-109.

Kondo, S., R. Sato-Yoshitake, Y. Noda, H. Aizawa, T. Nakata, Y. Matsuura and N. Hirokawa (1994). "KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon." J Cell Biol **125**(5): 1095-1107.

Kovacs, J. J., E. J. Whalen, R. Liu, K. Xiao, J. Kim, M. Chen, J. Wang, W. Chen and R. J. Lefkowitz (2008). "Beta-arrestin-mediated localization of smoothed to the primary cilium." Science **320**(5884): 1777-1781.

Kozminski, K. G. (1995). "High-resolution imaging of flagella." Methods Cell Biol **47**: 263-271.

Kozminski, K. G. (2012). "Intraflagellar transport--the "new motility" 20 years later." Mol Biol Cell **23**(5): 751-753.

Kozminski, K. G., P. L. Beech and J. L. Rosenbaum (1995). "The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane." J Cell Biol **131**(6 Pt 1): 1517-1527.

Kozminski, K. G., D. R. Diener and J. L. Rosenbaum (1993). "High level expression of nonacetylatable alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*." Cell Motil Cytoskeleton **25**(2): 158-170.

Kozminski, K. G., K. A. Johnson, P. Forscher and J. L. Rosenbaum (1993). "A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5519-5523.

Lacomble, S., S. Vaughan, C. Gadelha, M. K. Morphew, M. K. Shaw, J. R. McIntosh and K. Gull (2009). "Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography." J Cell Sci **122**(Pt 8): 1081-1090.

LaCount, D. J., B. Barrett and J. E. Donelson (2002). "Trypanosoma brucei FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis." J Biol Chem **277**(20): 17580-17588.

Lam, S. S., J. D. Martell, K. J. Kamer, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, V. K. Mootha and A. Y. Ting (2015). "Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling." Nat Methods **12**(1): 51-54.

Langerhans, P. (1876). "Zur Anatomie des Amphioxus." Archiv fur Mikroskopische Anatomie. **12**:290-348.

Langousis, G., M. M. Shimogawa, E. A. Saada, A. A. Vashisht, R. Spreafico, A. R. Nager, W. D. Barshop, M. V. Nachury, J. A. Wohlschlegel and K. L. Hill (2016). "Loss of the BBSome perturbs endocytic trafficking and disrupts virulence of Trypanosoma brucei." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(3): 632-637.

Laurencon, A., R. Dubruille, E. Efimenko, G. Grenier, R. Bissett, E. Cortier, V. Rolland, P. Swoboda and B. Durand (2007). "Identification of novel regulatory factor X (RFX) target genes by comparative genomics in Drosophila species." Genome Biol **8**(9): R195.

Lechtreck, K. F. and S. Geimer (2000). "Distribution of polyglutamylated tubulin in the flagellar apparatus of green flagellates." Cell Motil Cytoskeleton **47**(3): 219-235.

Lechtreck, K. F., E. C. Johnson, T. Sakai, D. Cochran, B. A. Ballif, J. Rush, G. J. Pazour, M. Ikebe and G. B. Witman (2009). "The Chlamydomonas reinhardtii BBSome is an IFT cargo required for export of specific signaling proteins from flagella." J Cell Biol **187**(7): 1117-1132.

Lee, E., E. Sivan-Loukianova, D. F. Eberl and M. J. Kernan (2008). "An IFT-A protein is required to delimit functionally distinct zones in mechanosensory cilia." Curr Biol **18**(24): 1899-1906.

Li, J. Y., D. J. Lees-Murdock, G. L. Xu and C. P. Walsh (2004). "Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse." Genomics **84**(6): 952-960.

Linck, R. W. and R. E. Stephens (2007). "Functional protofilament numbering of ciliary, flagellar, and centriolar microtubules." Cell Motil Cytoskeleton **64**(7): 489-495.

Livingston, G. (1857). "Missionary travels and researches in South Africa, including a sketch of sixteen year's residence in the interior of Africa... by David Livingstone. J. Murray, London." **In-8°, X-712, portrait, pl. et carte pp.**

Lucker, B. F., R. H. Behal, H. Qin, L. C. Siron, W. D. Taggart, J. L. Rosenbaum and D. G. Cole (2005). "Characterization of the intraflagellar transport complex B core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits." J Biol Chem **280**(30): 27688-27696.

Lucker, B. F., M. S. Miller, S. A. Dziedzic, P. T. Blackmarr and D. G. Cole (2010). "Direct interactions of intraflagellar transport complex B proteins IFT88, IFT52, and IFT46." J Biol Chem **285**(28): 21508-21518.

Ludington, W. B., K. A. Wemmer, K. F. Lechtreck, G. B. Witman and W. F. Marshall (2013). "Avalanche-like behavior in ciliary import." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(10): 3925-3930.

Maga, J. A. and J. H. LeBowitz (1999). "Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod." Trends Cell Biol **9**(10): 409-413.

Magnus, E., T. Vervoort and N. Van Meirvenne (1978). "A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of T. B. gambiense trypanosomiasis." Ann Soc Belg Med Trop **58**(3): 169-176.

Marshall, W. F. and J. L. Rosenbaum (2001). "Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control." J Cell Biol **155**(3): 405-414.

Marszalek, J. R., X. Liu, E. A. Roberts, D. Chui, J. D. Marth, D. S. Williams and L. S. Goldstein (2000). "Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors." Cell **102**(2): 175-187.

Matthews, K. R. (2005). "The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*." J Cell Sci **118**(Pt 2): 283-290.

McGrath, J. and M. Brueckner (2003). "Cilia are at the heart of vertebrate left-right asymmetry." Curr Opin Genet Dev **13**(4): 385-392.

McKean, P. G., A. Baines, S. Vaughan and K. Gull (2003). "Gamma-tubulin functions in the nucleation of a discrete subset of microtubules in the eukaryotic flagellum." Curr Biol **13**(7): 598-602.

Mencarelli, C., D. Caroti, M. H. Bre, N. Levilliers and R. Dallai (2005). "Tubulin glycylation and glutamylation deficiencies in unconventional insect axonemes." Cell Motil Cytoskeleton **61**(4): 226-236.

Mitchell, B. F., L. B. Pedersen, M. Feely, J. L. Rosenbaum and D. R. Mitchell (2005). "ATP production in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella by glycolytic enzymes." Mol Biol Cell **16**(10): 4509-4518.

Moore, S. J., J. S. Green, Y. Fan, A. K. Bhogal, E. Dicks, B. A. Fernandez, M. Stefanelli, C. Murphy, B. C. Cramer, J. C. Dean, P. L. Beales, N. Katsanis, A. S. Bassett, W. S. Davidson and P. S. Parfrey (2005). "Clinical and genetic epidemiology of Bardet-Biedl syndrome in Newfoundland: a 22-year prospective, population-based, cohort study." Am J Med Genet A **132A**(4): 352-360.

Moreira-Leite, F. F., T. Sherwin, L. Kohl and K. Gull (2001). "A trypanosome structure involved in transmitting cytoplasmic information during cell division." Science **294**(5542): 610-612.

Morga, B. and P. Bastin (2013). "Getting to the heart of intraflagellar transport using Trypanosoma and Chlamydomonas models: the strength is in their differences." Cilia **2**(1): 16.

Morgan, G. W., C. L. Allen, T. R. Jeffries, M. Hollinshead and M. C. Field (2001). "Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in Trypanosoma brucei." J Cell Sci **114**(Pt 14): 2605-2615.

Moyer, J. H., M. J. Lee-Tischler, H. Y. Kwon, J. J. Schrick, E. D. Avner, W. E. Sweeney, V. L. Godfrey, N. L. Cacheiro, J. E. Wilkinson and R. P. Woychik (1994). "Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice." Science **264**(5163): 1329-1333.

Mukhopadhyay, S., X. Wen, B. Chih, C. D. Nelson, W. S. Lane, S. J. Scales and P. K. Jackson (2010). "TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia." Genes Dev **24**(19): 2180-2193.

Mulenga, C., J. D. Mhlanga, K. Kristensson and B. Robertson (2001). "Trypanosoma brucei brucei crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model." Neuropathol Appl Neurobiol **27**(1): 77-85.

Müller, O. F., and O. Fabricius. (1786). Animalcula infusoria fluviatilia et marina quae detexit, systematice descripsit... Otho Fridericus Müller... Sistit opus hoc posthumum quod cum tabuleis aeneis in lucem tradit... vidua ejus nobilissima, cura Othonis Fabricii. typis N. Molleri, Hauniaae.

Murcia, N. S., W. G. Richards, B. K. Yoder, M. L. Mucenski, J. R. Dunlap and R. P. Woychik (2000). "The Oak Ridge Polycystic Kidney (orp) disease gene is required for left-right axis determination." Development **127**(11): 2347-2355.

Nonaka, S., Y. Tanaka, Y. Okada, S. Takeda, A. Harada, Y. Kanai, M. Kido and N. Hirokawa (1998). "Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein." Cell **95**(6): 829-837.

Nozawa, Y. I., C. Lin and P. T. Chuang (2013). "Hedgehog signaling from the primary cilium to the nucleus: an emerging picture of ciliary localization, trafficking and transduction." Curr Opin Genet Dev **23**(4): 429-437.

O'Connell, K. F. (2000). "The centrosome of the early C. elegans embryo: inheritance, assembly, replication, and developmental roles." Curr Top Dev Biol **49**: 365-384.

O'Toole, E. T., T. H. Giddings, J. R. McIntosh and S. K. Dutcher (2003). "Three-dimensional organization of basal bodies from wild-type and delta-tubulin deletion strains of Chlamydomonas reinhardtii." Mol Biol Cell **14**(7): 2999-3012.

Oberholzer, M., G. Langousis, H. T. Nguyen, E. A. Saada, M. M. Shimogawa, Z. O. Jonsson, S. M. Nguyen, J. A. Wohlschlegel and K. L. Hill (2011). "Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious Trypanosoma brucei." Mol Cell Proteomics **10**(10): M111 010538.

Ogbadoyi, E. O., D. R. Robinson and K. Gull (2003). "A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes." Mol Biol Cell **14**(5): 1769-1779.

Ooi, C. P. and P. Bastin (2013). "More than meets the eye: understanding *Trypanosoma brucei* morphology in the tsetse." Front Cell Infect Microbiol **3**: 71.

Ooi, C. P., B. Rotureau, S. Gribaldo, C. Georgikou, D. Julkowska, T. Blisnick, S. Perrot, I. Subota and P. Bastin (2015). "The Flagellar Arginine Kinase in *Trypanosoma brucei* Is Important for Infection in Tsetse Flies." PLoS One **10**(7): e0133676.

Orozco, J. T., K. P. Wedaman, D. Signor, H. Brown, L. Rose and J. M. Scholey (1999). "Movement of motor and cargo along cilia." Nature **398**(6729): 674.

Ostrowski, L. E., K. Blackburn, K. M. Radde, M. B. Moyer, D. M. Schlatzer, A. Moseley and R. C. Boucher (2002). "A proteomic analysis of human cilia: identification of novel components." Mol Cell Proteomics **1**(6): 451-465.

Ou, G., O. E. Blacque, J. J. Snow, M. R. Leroux and J. M. Scholey (2005). "Functional coordination of intraflagellar transport motors." Nature **436**(7050): 583-587.

Ounjai, P., K. D. Kim, H. Liu, M. Dong, A. N. Tauscher, H. E. Witkowska and K. H. Downing (2013). "Architectural insights into a ciliary partition." Curr Biol **23**(4): 339-344.

Overath, P. and M. Engstler (2004). "Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system." Mol Microbiol **53**(3): 735-744.

Paindavoine, P., S. Rolin, S. Van Assel, M. Geuskens, J. C. Jauniaux, C. Dinsart, G. Huet and E. Pays (1992). "A gene from the variant surface glycoprotein expression site encodes one of several transmembrane adenylate cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*." Mol Cell Biol **12**(3): 1218-1225.

Pan, J., Q. Wang and W. J. Snell (2005). "Cilium-generated signaling and cilia-related disorders." Lab Invest **85**(4): 452-463.

Patel-King, R. S., O. Gorbatyuk, S. Takebe and S. M. King (2004). "Flagellar radial spokes contain a Ca²⁺-stimulated nucleoside diphosphate kinase." Mol Biol Cell **15**(8): 3891-3902.

Pazour, G. J., N. Agrin, J. Leszyk and G. B. Witman (2005). "Proteomic analysis of a eukaryotic cilium." J Cell Biol **170**(1): 103-113.

Pazour, G. J., S. A. Baker, J. A. Deane, D. G. Cole, B. L. Dickert, J. L. Rosenbaum, G. B. Witman and J. C. Besharse (2002). "The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance." J Cell Biol **157**(1): 103-113.

Pazour, G. J., B. L. Dickert, Y. Vucica, E. S. Seeley, J. L. Rosenbaum, G. B. Witman and D. G. Cole (2000). "Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella." J Cell Biol **151**(3): 709-718.

Pazour, G. J., B. L. Dickert and G. B. Witman (1999). "The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly." J Cell Biol **144**(3): 473-481.

Pazour, G. J., J. T. San Agustin, J. A. Follit, J. L. Rosenbaum and G. B. Witman (2002). "Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease." Curr Biol **12**(11): R378-380.

Pazour, G. J., C. G. Wilkerson and G. B. Witman (1998). "A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT)." J Cell Biol **141**(4): 979-992.

Pedersen, L. B., S. Geimer, R. D. Sloboda and J. L. Rosenbaum (2003). "The Microtubule plus end-tracking protein EB1 is localized to the flagellar tip and basal bodies in *Chlamydomonas reinhardtii*." Curr Biol **13**(22): 1969-1974.

Pedersen, L. B., M. S. Miller, S. Geimer, J. M. Leitch, J. L. Rosenbaum and D. G. Cole (2005). "Chlamydomonas IFT172 is encoded by FLA11, interacts with CrEB1, and regulates IFT at the flagellar tip." Curr Biol **15**(3): 262-266.

Pedersen, L. B. and J. L. Rosenbaum (2008). "Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling." Curr Top Dev Biol **85**: 23-61.

Perrone, C. A., D. Tritschler, P. Taulman, R. Bower, B. K. Yoder and M. E. Porter (2003). "A novel dynein light intermediate chain colocalizes with the retrograde motor for intraflagellar transport at sites of axoneme assembly in *Chlamydomonas* and Mammalian cells." Mol Biol Cell **14**(5): 2041-2056.

Phillips, D. M. (1966). "Fine structure of *Sciara coprophila* sperm." J Cell Biol **30**(3): 499-517.

Pigino, G., S. Geimer, S. Lanzavecchia, E. Paccagnini, F. Cantele, D. R. Diener, J. L. Rosenbaum and P. Lupetti (2009). "Electron-tomographic analysis of intraflagellar transport particle trains in situ." J Cell Biol **187**(1): 135-148.

Piperno, G. and K. Mead (1997). "Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamydomonas* flagella." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4457-4462.

Porter, M. E., R. Bower, J. A. Knott, P. Byrd and W. Dentler (1999). "Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*." Mol Biol Cell **10**(3): 693-712.

Portman, N., S. Lacomble, B. Thomas, P. G. McKean and K. Gull (2009). "Combining RNA interference mutants and comparative proteomics to identify protein components and dependences in a eukaryotic flagellum." J Biol Chem **284**(9): 5610-5619.

Prensier, G., E. Vivier, S. Goldstein and J. Schrevel (1980). "Motile flagellum with a "3 + 0" ultrastructure." Science **207**(4438): 1493-1494.

Prevo, B., P. Mangeol, F. Oswald, J. M. Scholey and E. J. Peterman (2015). "Functional differentiation of cooperating kinesin-2 motors orchestrates cargo import and transport in *C. elegans* cilia." Nat Cell Biol **17**(12): 1536-1545.

Pullen, T. J., M. L. Ginger, S. J. Gaskell and K. Gull (2004). "Protein targeting of an unusual, evolutionarily conserved adenylate kinase to a eukaryotic flagellum." Mol Biol Cell **15**(7): 3257-3265.

Qin, H., D. T. Burnette, Y. K. Bae, P. Forscher, M. M. Barr and J. L. Rosenbaum (2005). "Intraflagellar transport is required for the vectorial movement of TRPV channels in the ciliary membrane." Curr Biol **15**(18): 1695-1699.

Qin, H., Z. Wang, D. Diener and J. Rosenbaum (2007). "Intraflagellar transport protein 27 is a small G protein involved in cell-cycle control." Curr Biol **17**(3): 193-202.

Ralston, K. S., Z. P. Kabututu, J. H. Melehani, M. Oberholzer and K. L. Hill (2009). "The Trypanosoma brucei flagellum: moving parasites in new directions." Annu Rev Microbiol **63**: 335-362.

Ralston, K. S., A. G. Lerner, D. R. Diener and K. L. Hill (2006). "Flagellar motility contributes to cytokinesis in Trypanosoma brucei and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system." Eukaryot Cell **5**(4): 696-711.

Rassi, A., Jr., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." Lancet **375**(9723): 1388-1402.

Regnard, C., D. Fesquet, C. Janke, D. Boucher, E. Desbruyeres, A. Koulakoff, C. Insina, P. Travo and B. Edde (2003). "Characterisation of PGs1, a subunit of a protein complex co-purifying with tubulin polyglutamylase." J Cell Sci **116**(Pt 20): 4181-4190.

Reiter, J. F., O. E. Blacque and M. R. Leroux (2012). "The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization." EMBO Rep **13**(7): 608-618.

Ringo, D. L. (1967). "Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in Chlamydomonas." J Cell Biol **33**(3): 543-571.

Robinson, D. R. and K. Gull (1991). "Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle." Nature **352**(6337): 731-733.

Robinson, D. R., T. Sherwin, A. Ploubidou, E. H. Byard and K. Gull (1995). "Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle." J Cell Biol **128**(6): 1163-1172.

Roditi, I. and M. Liniger (2002). "Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites." Trends Microbiol **10**(3): 128-134.

Rodriguez, J. A., M. A. Lopez, M. C. Thayer, Y. Zhao, M. Oberholzer, D. D. Chang, N. K. Kisalu, M. L. Penichet, G. Helguera, R. Bruinsma, K. L. Hill and J. Miao (2009). "Propulsion of African trypanosomes is driven by bihelical waves with alternating chirality separated by kinks." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(46): 19322-19327.

Rooryck, C. and D. Lacombe (2008). "[Bardet-Biedl syndrome]." Ann Endocrinol (Paris) **69**(6): 463-471.

Rosenbaum, J. L. and K. Carlson (1969). "Cilia regeneration in Tetrahymena and its inhibition by colchicine." J Cell Biol **40**(2): 415-425.

Rosenbaum, J. L. and F. M. Child (1967). "Flagellar regeneration in protozoan flagellates." J Cell Biol **34**(1): 345-364.

Rosenbaum, J. L., J. E. Moulder and D. L. Ringo (1969). "Flagellar elongation and shortening in Chlamydomonas. The use of cycloheximide and colchicine to study the synthesis and assembly of flagellar proteins." J Cell Biol **41**(2): 600-619.

Rosenbaum, J. L. and G. B. Witman (2002). "Intraflagellar transport." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(11): 813-825.

Rotureau, B., T. Blisnick, I. Subota, D. Julkowska, N. Cayet, S. Perrot and P. Bastin (2014). "Flagellar adhesion in Trypanosoma brucei relies on interactions between different skeletal structures in the flagellum and cell body." J Cell Sci **127**(Pt 1): 204-215.

Rotureau, B., C. P. Ooi, D. Huet, S. Perrot and P. Bastin (2014). "Forward motility is essential for trypanosome infection in the tsetse fly." Cell Microbiol **16**(3): 425-433.

Rotureau, B., I. Subota and P. Bastin (2011). "Molecular bases of cytoskeleton plasticity during the Trypanosoma brucei parasite cycle." Cell Microbiol **13**(5): 705-716.

Rotureau, B., I. Subota, J. Buisson and P. Bastin (2012). "A new asymmetric division contributes to the continuous production of infective trypanosomes in the tsetse fly." Development **139**(10): 1842-1850.

Ruben, L. (1987). "Identification of a developmentally regulated calcium-binding protein in Trypanosoma brucei." J Protozool **34**(4): 367-370.

Russell, D. G., R. J. Newsam, G. C. Palmer and K. Gull (1983). "Structural and biochemical characterisation of the paraflagellar rod of Crithidia fasciculata." Eur J Cell Biol **30**(1): 137-143.

Salmon, D., G. Vanwalleghem, Y. Morias, J. Denoëud, C. Krumbholz, F. Lhomme, S. Bachmaier, M. Kador, J. Gossmann, F. B. Dias, G. De Muylder, P. Uzureau, S. Magez, M. Moser, P. De Baetselier, J. Van Den Abbeele, A. Beschin, M. Boshart and E. Pays (2012). "Adenylate cyclases of Trypanosoma brucei inhibit the innate immune response of the host." Science **337**(6093): 463-466.

San Agustin, J. T., G. J. Pazour and G. B. Witman (2015). "Intraflagellar transport is essential for mammalian spermiogenesis but is absent in mature sperm." Mol Biol Cell **26**(24): 4358-4372.

Santrich, C., L. Moore, T. Sherwin, P. Bastin, C. Brokaw, K. Gull and J. H. LeBowitz (1997). "A motility function for the paraflagellar rod of Leishmania parasites revealed by PFR-2 gene knockouts." Mol Biochem Parasitol **90**(1): 95-109.

Sarpal, R., S. V. Todi, E. Sivan-Loukianova, S. Shirolikar, N. Subramanian, E. C. Raff, J. W. Erickson, K. Ray and D. F. Eberl (2003). "Drosophila KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails." Curr Biol **13**(19): 1687-1696.

Satir, P. and S. T. Christensen (2007). "Overview of structure and function of mammalian cilia." Annu Rev Physiol **69**: 377-400.

Schafer, J. C., C. J. Haycraft, J. H. Thomas, B. K. Yoder and P. Swoboda (2003). "XBX-1 encodes a dynein light intermediate chain required for retrograde intraflagellar transport and cilia assembly in *Caenorhabditis elegans*." Mol Biol Cell **14**(5): 2057-2070.

Schafer, J. C., M. E. Winkelbauer, C. L. Williams, C. J. Haycraft, R. A. Desmond and B. K. Yoder (2006). "IFTA-2 is a conserved cilia protein involved in pathways regulating longevity and dauer formation in *Caenorhabditis elegans*." J Cell Sci **119**(Pt 19): 4088-4100.

Schlaeppli, K., J. Deflorin and T. Seebeck (1989). "The major component of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* is a helical protein that is encoded by two identical, tandemly linked genes." J Cell Biol **109**(4 Pt 1): 1695-1709.

Schneider, A., U. Plessmann and K. Weber (1997). "Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei* are extensively glutamylated." J Cell Sci **110** (Pt 4): 431-437.

Schneider, A., T. Sherwin, R. Sasse, D. G. Russell, K. Gull and T. Seebeck (1987). "Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei brucei* contain the same alpha-tubulin isoforms." J Cell Biol **104**(3): 431-438.

Schnitzer, M. J. and S. M. Block (1997). "Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step." Nature **388**(6640): 386-390.

Schrevel, J. and C. Besse (1975). "[A functional flagella with a 6 + 0 pattern]." J Cell Biol **66**(3): 492-507.

Scott, V., T. Sherwin and K. Gull (1997). "gamma-tubulin in trypanosomes: molecular characterisation and localisation to multiple and diverse microtubule organising centres." J Cell Sci **110** (Pt 2): 157-168.

Serricchio, M., A. W. Schmid, M. E. Steinmann, E. Sigel, M. Rauch, D. Julkowska, S. Bonnefoy, C. Fort, P. Bastin and P. Butikofer (2015). "Flagellar membranes are rich in raft-forming phospholipids." Biol Open **4**(9): 1143-1153.

Shah, A. S., Y. Ben-Shahar, T. O. Moninger, J. N. Kline and M. J. Welsh (2009). "Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory." Science **325**(5944): 1131-1134.

Sherwin, T. and K. Gull (1989). "The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **323**(1218): 573-588.

Sherwin, T., A. Schneider, R. Sasse, T. Seebeck and K. Gull (1987). "Distinct localization and cell cycle dependence of COOH terminally tyrosinolated alpha-tubulin in the microtubules of *Trypanosoma brucei brucei*." J Cell Biol **104**(3): 439-446.

Signor, D., K. P. Wedaman, J. T. Orozco, N. D. Dwyer, C. I. Bargmann, L. S. Rose and J. M. Scholey (1999). "Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport of IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*." J Cell Biol **147**(3): 519-530.

Sinden, R. E. and N. A. Croll (1975). "Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*." Parasitology **70**(1): 53-65.

Singla, V. and J. F. Reiter (2006). "The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle." Science **313**(5787): 629-633.

Sirajuddin, M., L. M. Rice and R. D. Vale (2014). "Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications." Nat Cell Biol **16**(4): 335-344.

Sluder, G. and C. L. Rieder (1985). "Experimental separation of pronuclei in fertilized sea urchin eggs: chromosomes do not organize a spindle in the absence of centrosomes." J Cell Biol **100**(3): 897-903.

Smith, E. F. and P. Yang (2004). "The radial spokes and central apparatus: mechanochemical transducers that regulate flagellar motility." Cell Motil Cytoskeleton **57**(1): 8-17.

Smith, J. C., J. G. Northey, J. Garg, R. E. Pearlman and K. W. Siu (2005). "Robust method for proteome analysis by MS/MS using an entire translated genome: demonstration on the ciliome of *Tetrahymena thermophila*." J Proteome Res **4**(3): 909-919.

Snow, J. J., G. Ou, A. L. Gunnarson, M. R. Walker, H. M. Zhou, I. Brust-Mascher and J. M. Scholey (2004). "Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on *C. elegans* neurons." Nat Cell Biol **6**(11): 1109-1113.

Sorokin, S. (1962). "Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells." J Cell Biol **15**: 363-377.

Stepanek, L. and G. Pigino (2016). "Microtubule doublets are double-track railways for intraflagellar transport trains." Science **352**(6286): 721-724.

Stephan, A., S. Vaughan, M. K. Shaw, K. Gull and P. G. McKean (2007). "An essential quality control mechanism at the eukaryotic basal body prior to intraflagellar transport." Traffic **8**(10): 1323-1330.

Stoetzel, C., V. Laurier, L. Faivre, A. Megarbane, F. Perrin-Schmitt, A. Verloes, D. Bonneau, J. L. Mandel, M. Cossee and H. Dollfus (2006). "BBS8 is rarely mutated in a cohort of 128 Bardet-Biedl syndrome families." J Hum Genet **51**(1): 81-84.

Stoetzel, C., J. Muller, V. Laurier, E. E. Davis, N. A. Zaghoul, S. Vicaire, C. Jacquelin, F. Plewniak, C. C. Leitch, P. Sarda, C. Hamel, T. J. de Ravel, R. A. Lewis, E. Friederich, C. Thibault, J. M. Danse, A. Verloes, D. Bonneau, N. Katsanis, O. Poch, J. L. Mandel and H. Dollfus (2007). "Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome." Am J Hum Genet **80**(1): 1-11.

Storm van's Gravesande, K. and H. Omran (2005). "Primary ciliary dyskinesia: clinical presentation, diagnosis and genetics." Ann Med **37**(6): 439-449.

Subota, I., D. Julkowska, L. Vincensini, N. Reeg, J. Buisson, T. Blisnick, D. Huet, S. Perrot, J. Santi-Rocca, M. Duchateau, V. Hourdel, J. C. Rousselle, N. Cayet, A. Namane, J. Chamot-Rooke and P. Bastin (2014). "Proteomic analysis of intact flagella of procyclic

Trypanosoma brucei cells identifies novel flagellar proteins with unique sub-localization and dynamics." Mol Cell Proteomics **13**(7): 1769-1786.

Sui, H. and K. H. Downing (2006). "Molecular architecture of axonemal microtubule doublets revealed by cryo-electron tomography." Nature **442**(7101): 475-478.

Sun, S. Y., C. Wang, Y. A. Yuan and C. Y. He (2013). "An intracellular membrane junction consisting of flagellum adhesion glycoproteins links flagellum biogenesis to cell morphogenesis in Trypanosoma brucei." J Cell Sci **126**(Pt 2): 520-531.

Sun, Z., A. Amsterdam, G. J. Pazour, D. G. Cole, M. S. Miller and N. Hopkins (2004). "A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney." Development **131**(16): 4085-4093.

Sunter, J. D. and K. Gull (2016). "The Flagellum Attachment Zone: 'The Cellular Ruler' of Trypanosome Morphology." Trends Parasitol **32**(4): 309-324.

Sunter, J. D., V. Varga, S. Dean and K. Gull (2015). "A dynamic coordination of flagellum and cytoplasmic cytoskeleton assembly specifies cell morphogenesis in trypanosomes." J Cell Sci **128**(8): 1580-1594.

Takada, S. and R. Kamiya (1997). "Beat frequency difference between the two flagella of Chlamydomonas depends on the attachment site of outer dynein arms on the outer-doublet microtubules." Cell Motil Cytoskeleton **36**(1): 68-75.

Tamalet, A., A. Clement, F. Roudot-Thoraval, P. Desmarquest, G. Roger, M. Boule, M. C. Millepied, T. A. Baculard and E. Escudier (2001). "Abnormal central complex is a marker of severity in the presence of partial ciliary defect." Pediatrics **108**(5): E86.

Taschner, M., S. Bhogaraju and E. Lorentzen (2012). "Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis." Differentiation **83**(2): S12-22.

Taschner, M., S. Bhogaraju, M. Vetter, M. Morawetz and E. Lorentzen (2011). "Biochemical mapping of interactions within the intraflagellar transport (IFT) B core complex: IFT52 binds directly to four other IFT-B subunits." J Biol Chem **286**(30): 26344-26352.

Taschner, M., F. Kotsis, P. Braeuer, E. W. Kuehn and E. Lorentzen (2014). "Crystal structures of IFT70/52 and IFT52/46 provide insight into intraflagellar transport B core complex assembly." J Cell Biol **207**(2): 269-282.

Taschner, M., K. Weber, A. Mourao, M. Vetter, M. Awasthi, M. Stiegler, S. Bhogaraju and E. Lorentzen (2016). "Intraflagellar transport proteins 172, 80, 57, 54, 38, and 20 form a stable tubulin-binding IFT-B2 complex." EMBO J **35**(7): 773-790.

Taschner, M., K. Weber, A. Mourao, M. Vetter, M. Awasthi, M. Stiegler, S. Bhogaraju and E. Lorentzen (2016). "Intraflagellar transport proteins 172, 80, 57, 54, 38, and 20 form a stable tubulin-binding IFT-B2 complex." EMBO J.

Tyler, K. M., A. Fridberg, K. M. Toriello, C. L. Olson, J. A. Cieslak, T. L. Hazlett and D. M. Engman (2009). "Flagellar membrane localization via association with lipid rafts." J Cell Sci **122**(Pt 6): 859-866.

Van Den Abbeele, J., G. Caljon, K. De Ridder, P. De Baetselier and M. Coosemans (2010). "Trypanosoma brucei modifies the tsetse salivary composition, altering the fly feeding behavior that favors parasite transmission." PLoS Pathog **6**(6): e1000926.

Vassella, E., J. V. Den Abbeele, P. Butikofer, C. K. Renggli, A. Furger, R. Brun and I. Roditi (2000). "A major surface glycoprotein of trypanosoma brucei is expressed transiently during development and can be regulated post-transcriptionally by glycerol or hypoxia." Genes Dev **14**(5): 615-626.

Vaughan, S., T. Attwood, M. Navarro, V. Scott, P. McKean and K. Gull (2000). "New tubulins in protozoal parasites." Curr Biol **10**(7): R258-259.

Vaughan, S. and K. Gull (2015). "Basal body structure and cell cycle-dependent biogenesis in Trypanosoma brucei." Cilia **5**: 5.

Vaughan, S., L. Kohl, I. Ngai, R. J. Wheeler and K. Gull (2008). "A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in Trypanosoma brucei." Protist **159**(1): 127-136.

Vickerman, K. (1973). "The mode of attachment of Trypanosoma vivax in the proboscis of the tsetse fly Glossina fuscipes: an ultrastructural study of the epimastigote stage of the trypanosome." J Protozool **20**(3): 394-404.

Vickerman, K. (1985). "Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes." Br Med Bull **41**(2): 105-114.

Vickerman, K., L. Tetley, K. A. Hendry and C. M. Turner (1988). "Biology of African trypanosomes in the tsetse fly." Biol Cell **64**(2): 109-119.

Vincensini, L., T. Blisnick and P. Bastin (2011). "1001 model organisms to study cilia and flagella." Biol Cell **103**(3): 109-130.

Vincensini, L., T. Blisnick and P. Bastin (2011). "[The importance of model organisms to study cilia and flagella biology]." Biol Aujourdhui **205**(1): 5-28.

Walker, P. J. (1961). "Organization of function in trypanosome flagella." Nature **189**: 1017-1018.

Wallingford, J. B. and B. Mitchell (2011). "Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia." Genes Dev **25**(3): 201-213.

Wang, G., K. Krishnamurthy and E. Bieberich (2009). "Regulation of primary cilia formation by ceramide." J Lipid Res **50**(10): 2103-2110.

Wang, Q., I. M. Melzer, M. Kruse, C. Sander-Juelch and M. Wiese (2005). "LmxMPK4, a mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue essential for promastigotes and amastigotes of Leishmania mexicana." Kinetoplastid Biol Dis **4**: 6.

Wang, Z., Z. C. Fan, S. M. Williamson and H. Qin (2009). "Intraflagellar transport (IFT) protein IFT25 is a phosphoprotein component of IFT complex B and physically interacts with IFT27 in Chlamydomonas." PLoS One **4**(5): e5384.

Waters, A. M. and P. L. Beales (2011). "Ciliopathies: an expanding disease spectrum." *Pediatr Nephrol* **26**(7): 1039-1056.

Weber, K., A. Schneider, S. Westermann, N. Muller and U. Plessmann (1997). "Posttranslational modifications of alpha- and beta-tubulin in *Giardia lamblia*, an ancient eukaryote." *FEBS Lett* **419**(1): 87-91.

Wedaman, K. P., D. W. Meyer, D. J. Rashid, D. G. Cole and J. M. Scholey (1996). "Sequence and submolecular localization of the 115-kD accessory subunit of the heterotrimeric kinesin-II (KRP85/95) complex." *J Cell Biol* **132**(3): 371-380.

Wei, Q., Q. Xu, Y. Zhang, Y. Li, Q. Zhang, Z. Hu, P. C. Harris, V. E. Torres, K. Ling and J. Hu (2013). "Transition fibre protein FBF1 is required for the ciliary entry of assembled intraflagellar transport complexes." *Nat Commun* **4**: 2750.

Wei, Q., Y. Zhang, Y. Li, Q. Zhang, K. Ling and J. Hu (2012). "The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia." *Nat Cell Biol* **14**(9): 950-957.

Weise, F., Y. D. Stierhof, C. Kuhn, M. Wiese and P. Overath (2000). "Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells." *J Cell Sci* **113 Pt 24**: 4587-4603.

Wickstead, B. and K. Gull (2006). "A "holistic" kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions." *Mol Biol Cell* **17**(4): 1734-1743.

Williams, B. D., M. A. Velleca, A. M. Curry and J. L. Rosenbaum (1989). "Molecular cloning and sequence analysis of the *Chlamydomonas* gene coding for radial spoke protein 3: flagellar mutation pf-14 is an ochre allele." *J Cell Biol* **109**(1): 235-245.

Williams, C. L., C. Li, K. Kida, P. N. Inglis, S. Mohan, L. Semene, N. J. Bialas, R. M. Stupay, N. Chen, O. E. Blacque, B. K. Yoder and M. R. Leroux (2011). "MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis." *J Cell Biol* **192**(6): 1023-1041.

Witman, G. B. (1975). "The site of in vivo assembly of flagellar microtubules." *Ann N Y Acad Sci* **253**: 178-191.

Wloga, D., D. Dave, J. Meagley, K. Rogowski, M. Jerka-Dziadosz and J. Gaertig (2010). "Hyperglutamylation of tubulin can either stabilize or destabilize microtubules in the same cell." *Eukaryot Cell* **9**(1): 184-193.

Wolburg, H., S. Mogk, S. Acker, C. Frey, M. Meinert, C. Schonfeld, M. Lazarus, Y. Urade, B. K. Kubata and M. Duszenko (2012). "Late stage infection in sleeping sickness." *PLoS One* **7**(3): e34304.

Woodward, R. and K. Gull (1990). "Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*." *J Cell Sci* **95 (Pt 1)**: 49-57.

Wren, K. N., J. M. Craft, D. Tritschler, A. Schauer, D. K. Patel, E. F. Smith, M. E. Porter, P. Kner and K. F. Lehtreck (2013). "A differential cargo-loading model of ciliary length regulation by IFT." *Curr Biol* **23**(24): 2463-2471.

Wu, Y., N. G. Haghghat and L. Ruben (1992). "The predominant calcimedins from *Trypanosoma brucei* comprise a family of flagellar EF-hand calcium-binding proteins." Biochem J **287** (Pt 1): 187-193.

Yamazaki, M. (1996). "[The influence of intrathecal NMDA receptor antagonist on the isoflurane MAC and on the motor function]." Masui **45**(1): 70-76.

Yang, C., M. M. Compton and P. Yang (2005). "Dimeric novel HSP40 is incorporated into the radial spoke complex during the assembly process in flagella." Mol Biol Cell **16**(2): 637-648.

Zhang, Z., R. Sapiro, D. Kapfhamer, M. Bucan, J. Bray, V. Chennathukuzhi, P. McNamara, A. Curtis, M. Zhang, E. J. Blanchette-Mackie and J. F. Strauss, 3rd (2002). "A sperm-associated WD repeat protein orthologous to *Chlamydomonas* PF20 associates with Spag6, the mammalian orthologue of *Chlamydomonas* PF16." Mol Cell Biol **22**(22): 7993-8004.

Zimmermann, K. W. (1898). "Beitrage zur Kenntniss einiger Drusen und Epithelien. ." **Archiv fur Mikroskopische Anatomie. 52:552-706.**

Résumé

Les cils et les flagelles sont des organites essentiels chez la plupart des eucaryotes y compris chez l'homme. Ils sont construits par un mécanisme actif appelé transport intraflagellaire (IFT). Lors de cette thèse, nous avons étudié le rôle et le mode de fonctionnement de l'IFT chez le protiste *Trypanosoma brucei*. Par une combinaison d'approches en vidéo-microscopie et en microscopie électronique, nous avons révélé que l'IFT est absent ou s'arrête après ciblage par RNAi de gènes requis pour le transport aller ou le transport retour. Dans ces conditions, nous avons démontré que l'IFT n'est pas nécessaire au maintien de la longueur du flagelle mature mais contrôle la distribution de plusieurs protéines non structurales, au contraire du dogme établi. Les trains IFT transportent la tubuline, le constituant majeur de l'axonème. En collaboration avec l'équipe d'Esben Lorentzen (MPI, Munich), nous avons mis en évidence l'existence d'un module de liaison à la tubuline sur les protéines IFT74/IFT81. Par FIB-SEM, nous avons démontré que les trains IFT sont présents presque exclusivement sur seulement deux (4 et 7) des 9 doublets de microtubules du flagelle. L'utilisation de méthodes d'imagerie super résolutive par SIM (travaux réalisés au Janelia Research Institute, USA), a permis de montrer pour la première fois sur cellules vivantes, l'existence de deux voies spécifiques pour le trafic IFT aller et retour. Cette restriction s'explique par la présence d'une polyglutamylation plus marquée de la tubuline au niveau de ces doublets. L'inhibition des enzymes responsables de la polyglutamylation freine l'accès des protéines IFT aux flagelles et interfère sévèrement avec la construction de l'organite. Ces travaux démontrent donc un rôle essentiel de la polyglutamylation, qui agit comme une forme de « code de la tubuline » qui serait lu par les moteurs du transport intraflagellaire.

Mots clés : Trypanosomes, IFT, flagelles, RNAi, polyglutamylation

Abstract

Cilia and flagella are essential organelles in most eukaryotes including humans. They are built by an active mechanism termed Intraflagellar Transport or IFT. During this thesis, we have investigated the role and functioning of IFT in the protist *Trypanosoma brucei*. Using a combination of video-microscopy and electron microscopy, we have revealed that IFT is absent or arrested upon RNAi knockdown of genes required for anterograde and retrograde transport, respectively. In these conditions, we have demonstrated that IFT is not required for maintenance of flagellum length but that IFT controls the distribution of several non-structural proteins, to the contrary of the established dogma. IFT trains transport tubulin, the main component of the axoneme. In collaboration with the team of Esben Lorentzen (MPI Munich), we have revealed the existence of a tubulin-binding domain on proteins IFT74/IFT81. Using FIB-SEM, we have demonstrated that IFT trains are present almost exclusively on only two (4 and 7) out of 9 microtubule doublets. The use of super-resolution imaging methods (work performed at the Janelia Research Institute, USA) allowed us to show for the first time in live cells the existence of two specific bidirectional paths for IFT trafficking. This restriction is explained by differential polyglutamylation on these two doublets. The inhibition of the enzymes responsible for polyglutamylation restricts the access of IFT proteins to flagella, resulting in severe impairment of flagellum elongation. This work demonstrates an essential role for polyglutamylation that could act as a “tubulin code” that would be decrypted by the motors of intraflagellar transport.

Keywords : Trypanosomes, IFT, flagella, RNAi, polyglutamylation

**Unité de Biologie Cellulaire des trypanosomes
Institut Pasteur
25-28 rue du Dr Roux, 75015 Paris**