



HAL
open science

Le transport intraflagellaire : construction et déplacement des trains dans le flagelle du trypanosome

Adeline Antunes

► **To cite this version:**

Adeline Antunes. Le transport intraflagellaire : construction et déplacement des trains dans le flagelle du trypanosome. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS080 . tel-03191671

HAL Id: tel-03191671

<https://theses.hal.science/tel-03191671>

Submitted on 7 Apr 2021

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.



LE TRANSPORT INTRAFLAGELLAIRE :
CONSTRUCTION ET DEPLACEMENT
DES TRAINS DANS LE FLAGELLE DU
TRYPANOSOME





Thèse de doctorat
De Sorbonne Université
École doctorale Complexité du Vivant

Présentée par
Mme Adeline MALLET

Pour obtenir le diplôme de
Docteur de Sorbonne Université

**LE TRANSPORT INTRAFLAGELLAIRE :
DEPLACEMENT ET CONSTRUCTION
DES TRAINS DANS LE FLAGELLE DU
TRYPANOSOME**

Soutenance le 2 décembre 2020

Devant le jury composé de :

Mélanie BONHIVERS, Rapporteuse
Julien VERMOT, Rapporteur
Emmanuèle MOUCHEL-VIELH, Examinatrice
Paul GUICHARD, Examineur
Bénédicte DURAND, Examinatrice
Philippe BASTIN, Directeur de thèse
Sylvain TREPOUT, Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, **Dr Philippe Bastin**, pour avoir accepté une étudiante en thèse atypique. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir accueillie dans ton équipe avec autant d'enthousiasme et de bienveillance. Au-delà d'être un excellent directeur, tu as su m'apprendre à me surpasser, à me faire évoluer dans la science tout en respectant mes convictions, mes doutes et mes engagements professionnels et personnels. Merci pour ta disponibilité, tes précieux conseils, pour m'avoir écoutée et soutenue. Cette belle aventure fut un réel plaisir.

Je remercie, **Dr Sylvain Trépout**, pour avoir accepté de m'encadrer en tant que co-directeur. Sylvain, merci pour ta bonne humeur constante qui m'a permis d'avoir une attitude toujours positive et d'aller de l'avant. Tu as été un pilier pendant ma thèse avec qui j'ai pu me confier en toute franchise sur mes différentes vies : d'étudiante en thèse, d'ingénieur de plate-forme et de maman. Merci de m'avoir écoutée et aidée depuis les premières manips.

Je remercie **Dr Jacomina Krijnse-Locker**, responsable de l'Unité de Bio-Imagerie Ultrastructurale (UBI) pour avoir accepté que je partage mon temps entre la plate-forme et l'unité de recherche pour réaliser mon projet de thèse. Jacomina, merci de m'avoir accompagnée dans mes différents défis professionnels. Tu m'as poussée à me challenger sur des terrains sur lesquels je n'aurais sûrement pas osé m'aventurer.

Merci **Dr Guillaume Dumenil**, en tant que nouveau responsable de l'unité UBI, d'avoir poursuivi l'engagement de Jacomina et me permettre de finaliser ma thèse. Merci pour ton enthousiasme et ton soutien de tous les jours. Merci pour ta confiance, c'est un plaisir de travailler et d'évoluer à tes côtés.

Je tiens à remercier **Dr Jean-Christophe Olivo-Marin**, en tant que Directeur des Technologies de l'Institut Pasteur, de m'avoir autorisée à m'inscrire en thèse tout en restant pasteurienne et je remercie les Directeurs qui lui ont succédé : **Dr Christophe d'Enfert** et **Dr Michael Nilges**, pour leur soutien dans mes démarches.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à **Dr Luc Nicolas** qui m'aide régulièrement dans mes choix et me conseille dans ma carrière, toujours avec bienveillance.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, le **Dr Julien Vermot** et le **Dr Mélanie Bonhivers** qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que les examinateurs : **Dr Paul Guichard**, **Dr Bénédicte Durand** et le **Dr Emmanuèle Mouchel-Vielh**. Enfin, je tiens à remercier l'École Doctorale Complexité Du Vivant (CDV) pour m'avoir acceptée comme nouvel entrant.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, **Dr Javier Pizarro-Cerda**, **Dr Alice Meunier** et **Dr Agnès Audibert** pour leurs écoutes, leurs précieux conseils et le suivi de mes travaux. Merci pour le temps que vous avez consacré pour le bon déroulement de ces 4 années de thèse.

Je remercie chaleureusement, **Thierry Blisnick** qui a été un confident, un conseiller et un formateur tout au long de ces 4 années de thèse et qui le restera je n'en doute pas. Merci d'avoir partagé ton expérience et ta sagesse. Je te remercie également pour tout ton travail sur la construction des trains IFT qui ont permis de faire avancer et d'enrichir le projet et ma thèse. Merci pour tes qualités scientifiques et humaines. Merci d'avoir toujours été là, toujours au bon moment pour m'écouter et m'épauler.

Dr Eloïse Bertiaux, merci pour ton ambition qui a permis de faire avancer d'un bon en avant la publication de l'article dans JCB ainsi que les travaux réalisés sur les parasites de la mouche. Merci pour tes conseils en biologie moléculaire, ta sympathie et tes encouragements quotidiens.

Dr Cécile Fort, nous avons commencé à travailler ensemble pendant tes années de thèse et sans le savoir tu m'as donné l'envie de m'intéresser au transport intraflagellaire et de tenter de parler de mon envie de thèse à Philippe. Une belle rencontre qui a été le début de mon aventure de thésarde.

Dr Serge Bonnefoy, tu as su trouver les mots justes pour me redonner confiance en moi dans un moment difficile et je t'en remercie particulièrement. Merci pour tes questions toujours pertinentes lors des réunions et pour ta disponibilité.

Merci **Estefania, Aline, Sebastian, Jamin, Moara, Christelle et Brice** pour m'avoir accueillie dans l'équipe TRYPA. La bonne humeur et l'envie d'avancer sont communicatives. Je vous remercie tous pour votre gentillesse et pour les discussions scientifiques toujours enrichissantes. Merci aussi pour tous les moments conviviaux passés ensemble qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse. Merci à **Ramiro Tomasina** pour ses résultats sur IFT122 et IFT139 qui ont ajouté un plus au projet.

Je tiens à remercier **Dr Linda Kohl**, grâce à qui j'ai pu présenter pour la première fois en anglais mes résultats lors du GDR qu'elle organisait au Muséum d'Histoire Naturelle.

Je tiens à remercier **Cidalia Da Agra** et **Anne Cozanet**, pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur aide précieuse.

Je tiens à remercier toute l'équipe **UBI, Anna, Anastasia** et particulièrement **Nadège** pour sa gentillesse, **Olivier** pour son écoute, **Maryse** pour ses conseils et corrections, **Gérard** pour sa bienveillance, **Esthel** pour ses encouragements et les pauses au Subway, **Martin** pour son aide, **Christine** pour son soutien, **Catherine** pour sa générosité et sans oublier **Perrine** qui malgré la distance est restée une complice. Merci pour votre bonne humeur à tous et vos encouragements quotidiens. Vous avez été des acteurs importants pour le bon déroulement de ma thèse. Parfois confidentes, parfois bienveillants, souvent compréhensifs vous avez su m'accompagner en acceptant ma situation atypique et me faciliter le quotidien. Merci pour ces années passées et les prochaines à venir.

Je remercie **Dr Jean-Yves Tinevez, Dr Nathalie Aulner, Dr Audrey Salles** et toute l'équipe de **PBI** pour leur aide en microscopie photoniques et en analyse d'image.

Je remercie **Dr Jost Enninga, Dr Anne Danckaert, Dr Saaid Safieddine et Dr Shaynoor Dramsi**, quatre scientifiques qui ont cru en moi depuis mes débuts et qui m'ont donné l'envie de faire une thèse.

Merci à mes amis **Hélène et Rémi Le Borgne, Albine Gos, Marie Maokampio, Tharshana Stephen, Marie-Noëlle Rossignol, Emilie Dugon et Sharuja Natkunarajah**, pour nos années de Licence, de Master jusqu'à aujourd'hui.

A titre plus personnel, je tiens à témoigner ma reconnaissance à **mes parents et à mes proches**.

Merci à mes parents, d'avoir toujours su m'épauler dans mon projet de thèse. Merci de m'avoir accompagnée à vivre sereinement ces 4 années et d'avoir toujours cru en ma réussite. Papa Maman, merci d'être toujours présents dans les petites et grandes étapes de ma vie.

Merci à mon frère François, Marie, Louise et « petite graine » d'avoir écouté mes histoires d'étudiante avec beaucoup d'humour.

Un grand merci à ma sœur Emilie et mon neveu Gautier pour avoir cru en moi. Emilie tu as été un acteur important dans toute cette aventure. Par pudeur je dirais juste qu'il y a 4 ans j'ai eu besoin de me plonger dans ma vie professionnelle. Ces 4 dernières années ont été bien remplies et j'aspire maintenant à plus de tranquillité. Merci d'être toujours à mes côtés.

Gilles, je te remercie de m'épauler au quotidien depuis 20 ans et de me soutenir. Je n'aurai jamais pu réaliser une thèse sans toi. Merci de m'avoir dit pendant 4 ans que tu m'aimerais avec ou sans thèse.

Je ne peux finir ces remerciements sans penser chaleureusement à mes enfants Rafael et Maxime. Mes amours de tous les jours qui m'ont permis de relativiser les aléas du monde de la science et à surmonter mes doutes. Vous êtes une force.

Louis Pasteur disait « La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés ». Merci de m'avoir préparé chacun à votre manière pendant ces 4 années de thèse pour me permettre d'arriver au bout d'un rêve et de penser au prochain.

Tellement d'images et d'émotions me sont venus lors de l'écriture de ces remerciements. Merci à tous.

Table des matières

DEFINITIONS	11
INTRODUCTION	15
I. CILS ET FLAGELLES	17
1.1. LA STRUCTURE DES CILS ET FLAGELLES	18
a) La poche ciliaire	18
b) Du corps basal au bout distal de l'axonème.	18
1.2. LE ROLE DES CILS ET FLAGELLES	20
1.3. LES CILIOPATHIES	22
1.4. LES MODELES D'ETUDE	24
II. <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	27
2.1. BIEN PLUS QU'UN PARASITE	27
a) Le trypanosome : un parasite bien connu	27
b) Cycle parasitaire et différenciation	28
2.2. LE FLAGELLE DE <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	30
a) Un flagelle motile	30
b) Des structures atypiques	31
III. LE TRANSPORT INTRAFLAGELLAIRE	35
3.1. FORMATION DES CILS ET FLAGELLES	35
3.2. LA DECOUVERTE DE L'IFT	36
a) Une découverte "microscopique"	36
b) Le rôle du transport intraflagellaire dans la construction des trains	37
3.3. LES MOTEURS MOLECULAIRES DU TRANSPORT INTRAFLAGELLAIRE	41
a) La kinésine II	41
b) La dynéine 2	44
3.4. LES PROTEINES IFT	47
a) Deux complexes	47
b) Les protéines IFT-B	49
c) Les protéines IFT-A	50
3.5. LES TRAINS IFT	56
QUESTIONS	63
RESULTATS	73
LA LOCALISATION DU TRANSPORT INTRAFLAGELLAIRE	75
BIDIRECTIONAL INTRAFLAGELLAR TRANSPORT IS RESTRICTED TO TWO SETS OF MICROTUBULE DOUBLETS IN THE TRYPANOSOME FLAGELLUM.	75
INTRAFLAGELLAR TRANSPORT DURING ASSEMBLY OF FLAGELLA OF DIFFERENT LENGTH IN <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i> ISOLATED FROM TSETSE FLIES.	95
LA CONSTRUCTION DES TRAINS IFT	115
I. COMPOSITION MOLECULAIRES DES TRAINS ANTEROGRADÉS	115
II. ROLE DE L'IFT-B DANS LA FORMATION DES TRAINS ANTEROGRADÉS	117
2.1 L'extinction d'IFT88 affecte sévèrement le transport antérograde	117
2.2. La structure et la longueur des trains dépendent de la présence d'IFT88	119
2.3. Une localisation inattendue de l'IFT-A	120
III. CONTRIBUTION DE L'IFT-A A LA FORMATION DES TRAINS ANTEROGRADÉS	121
3.1. Les 6 gènes <i>IFT-A</i> sont conservés chez <i>Trypanosoma brucei</i>	121
3.2. Localisation d'IFT140, IFT122 et IFT139	122
3.3. Le trafic intraflagellaire d'IFT122 et IFT139 dépend d'IFT140	124
3.4. IFT140 est indispensable à la formation des trains antérogrades	125

3.5 IFT140 régule la longueur des trains antérogrades	128
3.6. Rôle d'IFT140 dans le transport antérograde de la dynéine DHC2.1	130
IV. ROLE DE LA KINESINE DANS LA CONSTRUCTION DES TRAINS IFT	132
MATERIELS ET METHODES	135
I. Lignées cellulaires et construction des souches	137
II. Microscopie photonique	139
III. Microscopie électronique FIB-SEM	139
IV. Analyse des données de microscopie 3D	140
DISCUSSION	141
<u>TABLE DES FIGURES</u>	161
<u>REFERENCES</u>	163

DEFINITIONS

ABC

ARNi : L'ARN interférence est un mécanisme de régulation post-transcriptionnel de l'expression génétique par des ARN de petite taille (20-25 nucléotides). Ce mécanisme nécessite une RNase appelée Dicer qui clive les longs ARN double brin en petits ARN double brin d'une vingtaine de nucléotides qui induisent la dégradation des ARN messagers en faisant intervenir un complexe multi-protéique RISC (pour RNA Induced Silencing Complex). Ceci entraîne une diminution de la traduction du gène d'intérêt et de la quantité de la protéine correspondante.

Cardia : Organe situé entre l'œsophage et l'intestin chez la mouche tsé-tsé.

Ciliopathies : Maladies génétiques liées à un défaut de cil ou flagelle.

Cil et Flagelle : Organites cellulaires conférant des fonctions motrices, sensorielles ou morphogénétiques aux cellules. En ce qui concerne les cellules eucaryotes, les cils sont formés de microtubules et sont des extensions cytoplasmiques.

Complexes IFT : Deux complexes de protéines IFT appelés IFT-A et IFT-B sont formés respectivement de 6 protéines (IFT144, IFT140, IFT139, IFT122, IFT121, IFT43) et 16 protéines (IFT172, IFT88, IFT81, IFT80, IFT74, IFT70, IFT57, IFT56, IFT54, IFT52, IFT46, IFT38, IFT27, IFT25, IFT22, IFT20).

DEFG

FIB-SEM (Focused Ion Beam – Scanning Electron Microscopy) : Microscope possédant une colonne ionique et une colonne électronique. La combinaison de ces deux faisceaux permet d'abraser un échantillon inclus en résine par les ions Gallium et d'imager la surface abrasée par microscopie électronique à balayage. L'utilisation successive ou simultanée des deux faisceaux ionique et électronique permet de collecter des séries d'images qui une fois alignées constituent de larges volumes (~10µm) d'une résolution isotropique (équivalente en x, y et z) de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

Gène : Un gène est une portion d'ADN codant pour une protéine.

HIJKLM

mNeonGreen : Protéine fluorescente verte / jaune basique (constitutivement fluorescente) (Shaner et al., 2013), dérivée de *Branchiostoma lanceolatum*. C'est un monomère avec un poids moléculaire de 26,6kDa. ($\lambda_{ext}=506nm$ et $\lambda_{em}=517nm$). La brillance et la stabilité de la mNG (Rendement Quantique=0,8, Brillance=93) sont plus élevées que celles de la GFP (Rendement Quantique=0,65, Brillance=54). Le rendement quantique est caractérisé par la capacité du fluorophore à réémettre sous forme de lumière, l'énergie absorbée.

Moteurs moléculaires : Protéines capables de transformer l'énergie chimique en énergie cinétique ou mécanique par des modifications de leur conformation. Par exemple, la kinésine (*se mouvoir* en grec) se déplace en marchant le long des microtubules en présence d'ATP. Chaque "pas" consomme une molécule d'ATP et lors de la libération d'ADP et de phosphate inorganique, il y a propulsion de la tête expliquant la semi-rotation. La vitesse de déplacement est très variable en fonction des concentrations en ATP, et de la charge portée par la kinésine.

NOP

Protéines IFT : Protéines impliquées dans le transport intraflagellaire, il en existe 22 nommées selon leur poids moléculaire apparent chez *Chlamydomonas*.

QRST

Tandem Tomato : Protéine fluorescente dimérique rouge dérivée de *Discosoma sp.* C'est un dimère avec un poids moléculaire de 54,2 kDa. ($\lambda_{\text{ext}}=554\text{nm}$ et $\lambda_{\text{em}}=581\text{nm}$). La brillance de la TdT (Rendement Quantique=0,69, Brillance=95) est plus élevée que la GFP (Rendement Quantique=0,65, Brillance=54) pour un rendement quantique équivalent.

Traduction : Etape de synthèse des protéines par les ribosomes, à partir de l'information génétique contenue dans les ARN messagers.

Trains / particules IFT : Les trains IFT sont des multimères de complexes protéiques situés entre les microtubules et la membrane flagellaire véhiculés par les moteurs moléculaires dans les cils et flagelles.

Transcription : Première étape de l'expression génique basée sur l'ADN, au cours de laquelle un segment particulier d'ADN est « copié » en ARN par une enzyme appelée ARN polymérase.

Transport intraflagellaire (IFT) : Mouvement bidirectionnel de particules ou trains IFT se déplaçant le long de l'axonème entre les microtubules et la membrane flagellaire grâce à l'énergie des moteurs moléculaires.

INTRODUCTION

1.1. La structure des cils et flagelles

La plupart des cils et flagelles partagent une architecture commune conservée tout au long de l'évolution. Ils contiennent trois régions structurellement différentes de la base au bout distal qui sont : le corps basal (Figure 2A), la zone de transition (Figure 2B-C) et l'axonème (Figure 2D). Les cils peuvent être partiellement internalisés, et dans ces cas, une poche ciliaire (ou flagellaire) formée par une invagination membranaire est observée autour de la base (Figure 2B).

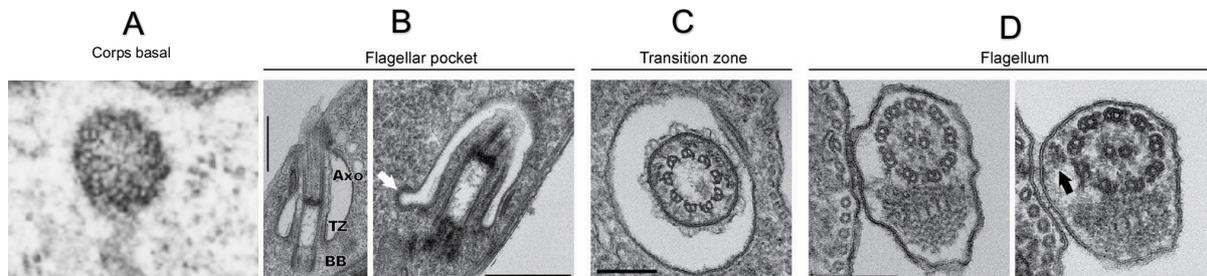


Figure 2 : Structure des cils et flagelles

Sections transversales ou longitudinales à différents niveaux du flagelle de *Trypanosoma brucei*: BB : corps basal (A) composé de triplets de microtubules (Buisson and Bastin, 2010), poche flagellaire (B), TZ : zone de transition (C) où les microtubules périphériques sont sous forme de doublets. Au niveau de l'axonème (D) une paire centrale de microtubules est visible. Une particule ou train IFT (voir partie II.) est indiquée par la flèche noire. Barres d'échelle (B) : 500 nm et (C, D) : 200nm. (Wachter et al., 2019)

a) La poche ciliaire

Le cil est souvent ancré plus ou moins profondément dans le cytoplasme. Sa région proximale se retrouve entourée d'une invagination de la membrane plasmique. Ce domaine membranaire est appelé poche ciliaire ou poche flagellaire. Il a été observé dès la première description des cils primaires, par Barnes en 1961, et décrit avec précision par Sorokin en 1968 qui a réalisé, à partir d'images de microscopie électronique en transmission, des reconstructions des événements principaux de la ciliogénèse (Sorokin, 1968).

La poche ciliaire a été observée à la base de différents types de cils (primaires, mobiles) et dans de très nombreux types cellulaires (Molla-Herman et al., 2010). Elle est impliquée dans l'endocytose par la voie dépendante de la clathrine, qui pourrait aussi inclure des événements d'internalisation de protéines membranaires provenant du cil. La poche ciliaire se comporte comme un domaine d'interface entre le cil et le cytosquelette d'actine. La poche pourrait jouer un rôle de plate-forme d'accueil pour des vésicules transportant des protéines membranaires et des récepteurs ciliaires provenant de la voie de biosynthèse (appareil de Golgi) ou des endosomes (Benmerah et al., 2015).

b) Du corps basal au bout distal de l'axonème.

Le **corps basal** est une structure cylindrique composée de triplets de microtubules (Figure 2A) qui se trouve à la base des cils et sert de point de nucléation pour la croissance des microtubules de l'axonème.

Chez les cellules animales et plusieurs organismes unicellulaires, les corps basaux sont dérivés des centrioles. Les corps basaux sont composés de 9 triplets de microtubules appelés A, B et C. Ils se présentent comme des corps cylindriques de $\approx 0,2 \mu\text{m}$ de diamètre, et d'une longueur comprise généralement entre 0,2 et 0,8 μm . Il existe des exceptions comme des corps basaux très longs (environ 1,5 μm) à l'origine de grands flagelles pouvant mesurer près de 200 μm chez *Trichonympha* (Guichard et al., 2012). Dans la plupart des cellules, un centriole est à l'origine de la formation d'un corps basal et sert de point d'ancrage pour les microtubules dans les centrosomes. Chez *Chlamydomonas*, les deux centrioles sont chacun à l'origine d'un flagelle (Cavalier-Smith, 1974) mais chez les animaux, seul le centriole père forme un cil.

Les **fibres de transition** forment un anneau d'environ 500 nm de diamètre autour de la base ciliaire où diverses protéines sont présentes : par exemple, RP2 qui ressemble au facteur de repliement de la tubuline et SEPT2 (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017). Chez le trypanosome, RP2 se localise en forme d'anneau ($\sim 500 \text{ nm}$ de diamètre) à la base ciliaire, au niveau des fibres de transition. RP2 pourrait fournir un contrôle de qualité pour les tubulines avant l'incorporation dans l'axonème (Stephan et al., 2007) D'autres protéines comme SEPT2 participent à la formation d'une barrière de diffusion membranaire (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017). Des études d'immunofluorescence à partir de plusieurs types de cellules et d'organismes montrent des pools de protéines IFT à la base ciliaire, immédiatement à proximité de la zone de transition (Deane, 2001) (Williams et al., 2011).

Les fibres de transition (en bleu, Figure 3) permettent d'attacher les doublets de microtubules à la membrane. Elles pourraient également servir de site d'amarrage aux protéines entrant dans le flagelle car le point de liaison de la fibre de transition à la membrane plasmique définit la limite à laquelle les vésicules destinées au cil peuvent fusionner.

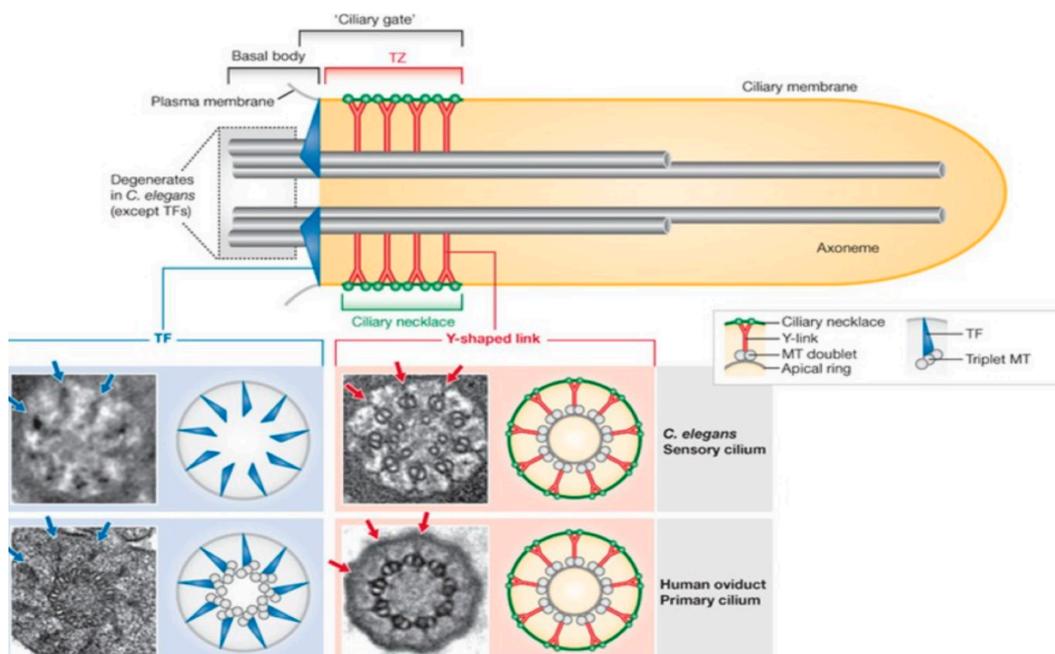


Figure 3 : Structure de la base du cil

Les fibres de transition, et la zone de transition avec son collier ciliaire associé, sont conservées dans les cils et flagelles. Tous les cils ont un axonème constitué de microtubules qui émergent du corps basal. Les fibres de transition et la zone de transition sont représentées schématiquement avec des

images de microscopie électronique en transmission (TEM) représentatives d'un cil sensoriel de *Caenorhabditis elegans* et d'un cil primaire humain. Les structures en Y organisent ou composent le collier ciliaire présent sur la surface ciliaire (représenté sous forme de perles). Chez les nématodes, le corps basal dégénère presque complètement après la ciliogénèse, ne conservant que les fibres de transition. La nature et la fonction des microtubules singulets internes observés dans les coupes transversales de *C. elegans* sont inconnues (Reiter et al., 2012).

La **zone de transition** est localisée à l'extrémité distale du corps basal et à la base de l'axonème. Elle se caractérise en microscopie électronique par des projections qui relient les microtubules à la membrane et qui adoptent une forme caractéristique leur conférant leur nom : les liens Y (Gilula, 1972) (Satir, 1968). Elle est impliquée dans la sélection des protéines ciliaires en constituant la barrière ciliaire qui contrôle la composition des cils (Reiter et al., 2012). La plaque basale termine la zone de transition et annonce le début de l'axonème.

Après la zone de transition, on trouve l'**axonème** qui est la structure fondamentale des cils. Dans l'axonème, les microtubules sont organisés en un cylindre composé de 9 doublets de microtubules (Figures 2 et 3), qui peut contenir une paire centrale. Cette disposition est appelée 9 + 2. Les doublets périphériques sont constitués d'un tubule A complet constitué de 13 protofilaments et d'un tubule B en forme de demi-lune qui est attaché au tubule A. Il est incomplet et contient au plus 11 protofilaments. Les deux microtubules centraux sont tous les deux complets (13 protofilaments). La conformation en 9 + 2 est rencontrée dans la majorité des cils mobiles. Des bras de dynéine sont associés au microtubule A des doublets et génèrent les battements ciliaires. Ces battements sont animés par deux types de mouvements : le battement de poussée (le cil se plie) et le battement de récupération (il revient à sa position initiale). Les bras de dynéine, en interaction avec les microtubules, confèrent l'activité motrice du cil. Plus précisément, les bras de dynéine internes contrôlent l'amplitude de fléchissement tandis que les bras de dynéine externes 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. La nexine est un complexe de protéines qui régule l'activité de la dynéine (*Dynein Regulatory Complex* ou DRC)

Au contraire, les cils non mobiles possèdent une structure dite en 9 + 0 où la paire centrale et les bras de dynéine sont absents. Toutefois, il existe quelques cas de cils mobiles en 9 + 0 qui ont des bras de dynéine comme les cils du nœud nodal (Nonaka et al., 1998). Dans ce cas, le mouvement est rotationnel.

1.2. Le rôle des cils et flagelles

La construction des cils et flagelles est bien connue et sera discutée en détail dans la partie 3.1. Une fois formés, les cils et les flagelles des eucaryotes exercent des fonctions motiles et/ou sensorielles qui sont souvent essentielles pour la survie des unicellulaires et pour le développement des organismes pluricellulaires.

Pour certains organismes, la formation des cils est indispensable pour leur mouvement, ou à une agitation du milieu extérieur afin de faciliter la recherche de substances ou d'organismes nutritifs. Par exemple, l'algue verte *Chlamydomonas* nage pour se déplacer, accéder aux nutriments et surtout pour réguler sa dose de

lumière. *Chlamydomonas reinhardtii* possède un « stigma » sur le côté de la cellule. Il s'agit d'un photorécepteur. Une fois un signal lumineux capté par le stigma, une cascade biochimique s'ensuit au sein de la cellule et induit une modification des battements de flagelles qui mène finalement à une réorientation de l'algue vers la source lumineuse. Ce capteur photosensible permet ainsi à *Chlamydomonas* d'orienter sa nage. Cette propriété, appelée phototactisme (positif), permet à la cellule de se déplacer vers des zones optimales pour la photosynthèse en journée. Au contraire, durant la phase nocturne de son cycle circadien, le phototactisme négatif permet à la cellule de s'éloigner des éventuelles sources lumineuses. Ainsi, la nage qui était aléatoire en l'absence de lumière devient directionnelle en présence d'une source lumineuse (Bennett and Golestanian, 2015).

Un dysfonctionnement des cils chez l'Homme est à l'origine de nombreux problèmes de développement regroupés sous le nom de « ciliopathies » (Benmerah et al., 2015) (Reiter and Leroux, 2017) (Braun and Hildebrandt, 2017) (Walentek and Quigley, 2017).

Chez les mammifères, il existe deux catégories principales de cils : les cils primaires et les cils motiles (Figure 4).

Les cils primaires sont présents à la surface de la quasi-totalité des cellules de l'organisme humain, à l'exception des hépatocytes et de certaines cellules des lignées lymphoïdes et myéloïdes. Chaque cellule ne comporte qu'un cil primaire, formé à partir du centriole père du centrosome. Ces cils fonctionnent comme une sorte d'antenne cellulaire qui peut capter les signaux venant de l'extérieur et moduler certaines voies de signalisation.

Les cils motiles sont présents, chez l'homme, à la surface des cellules multiciliées dans différents tissus pour mettre en mouvement des fluides ou d'autres cellules :

- Au niveau de l'épendyme, les cellules multiciliées tapissent les ventricules cérébraux, pour permettre le mouvement du liquide céphalo-rachidien.
- Dans tout le tractus respiratoire, les cellules ciliées permettent de faire remonter le mucus. Les cellules multiciliées de la trachée et des bronches participent à l'élaboration d'un "escalateur muco-cilié". Le battement des cils au niveau de la trachée permet la remontée du mucus vers la glotte, où il est par la suite mélangé à la salive et avalé ou éventuellement recraché. Cet escalateur muco-cilié joue un rôle d'immunité innée en constituant une barrière physique contre l'entrée d'agents infectieux. Les agents pathogènes piégés dans le mucus sont évacués grâce à l'action des cils présents au niveau de la surface apicale.
- Dans les trompes de Fallope, les cellules multiciliées permettent la migration des ovocytes alors que dans les canaux efférents, d'autres cellules multiciliées créent une turbulence pour éviter que les spermatozoïdes ne s'accumulent (Yuan et al., 2019).

Un dernier type cellulaire à mentionner est le spermatozoïde qui utilise son flagelle unique pour se déplacer.

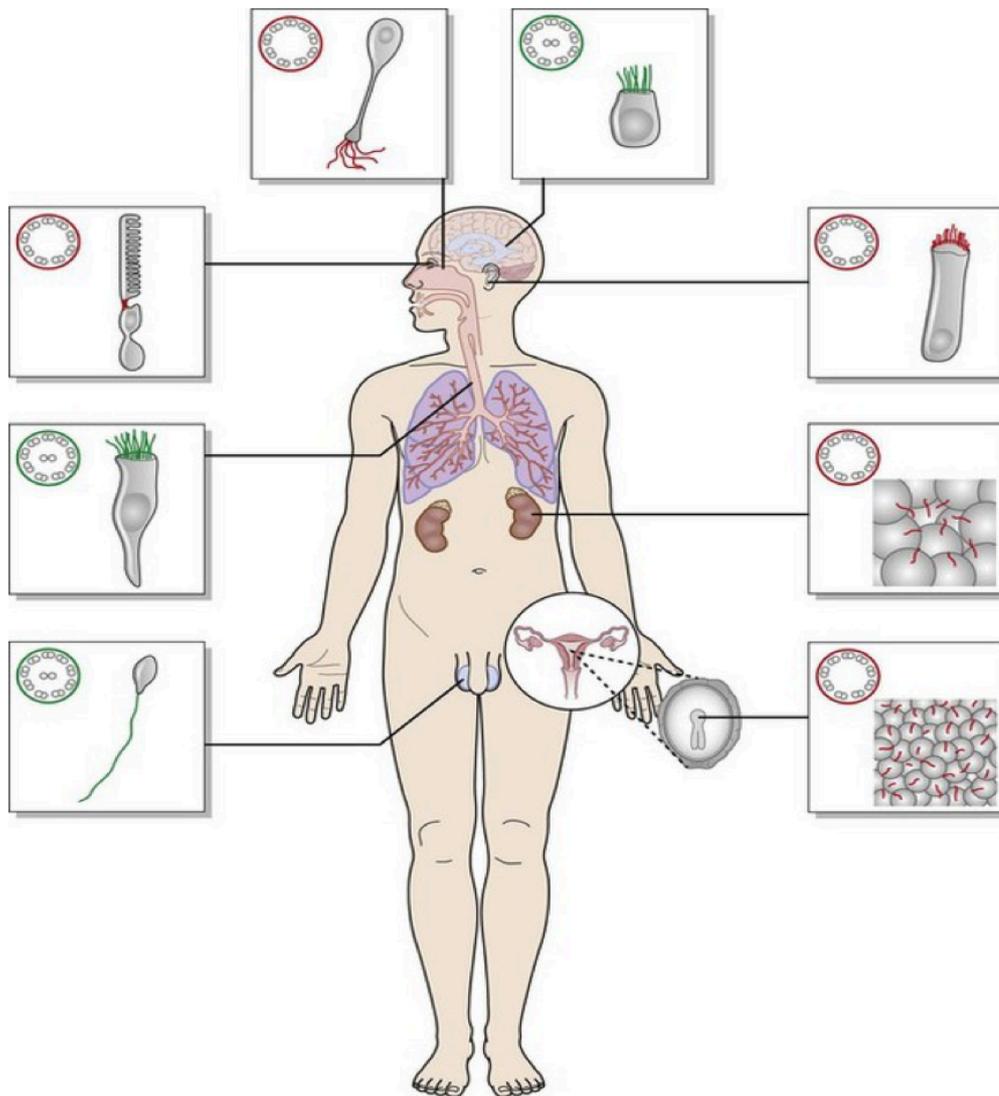


Figure 4 : Représentation schématique des cils dans diverses cellules

Représentation de la diversité des cellules ciliées chez l'être humain. Les cils mobiles sont représentés en vert et les cils sensoriels en rouge. (Dollfus et al., 2006)

1.3. Les ciliopathies

La construction et le maintien de la longueur des cils et flagelles sont indispensables à la réalisation de leur fonction motrice ou sensorielle. Chez l'Homme, les cils ont diverses fonctions spécifiques liées aux tissus (motiles et sensorielles) et sont essentiels au cours du développement, de la morphogenèse et de l'homéostasie, expliquant pourquoi les troubles liés aux cils peuvent affecter de nombreux organes. Les ciliopathies regroupent toutes les maladies liées à des défauts de cils dans l'organisme (Figure 5) (Reiter and Leroux, 2017) (Braun and Hildebrandt, 2017). Elles peuvent affecter différents organes en accord avec la présence des cils et entraîner divers symptômes : infertilité, obésité, surdité, encombrement bronchique, atteinte rénale, ... (Bachmann-Gagescu, 2014). Les symptômes sont multiples et différents en fonction de la mutation dans le gène et du type de cils impactés.

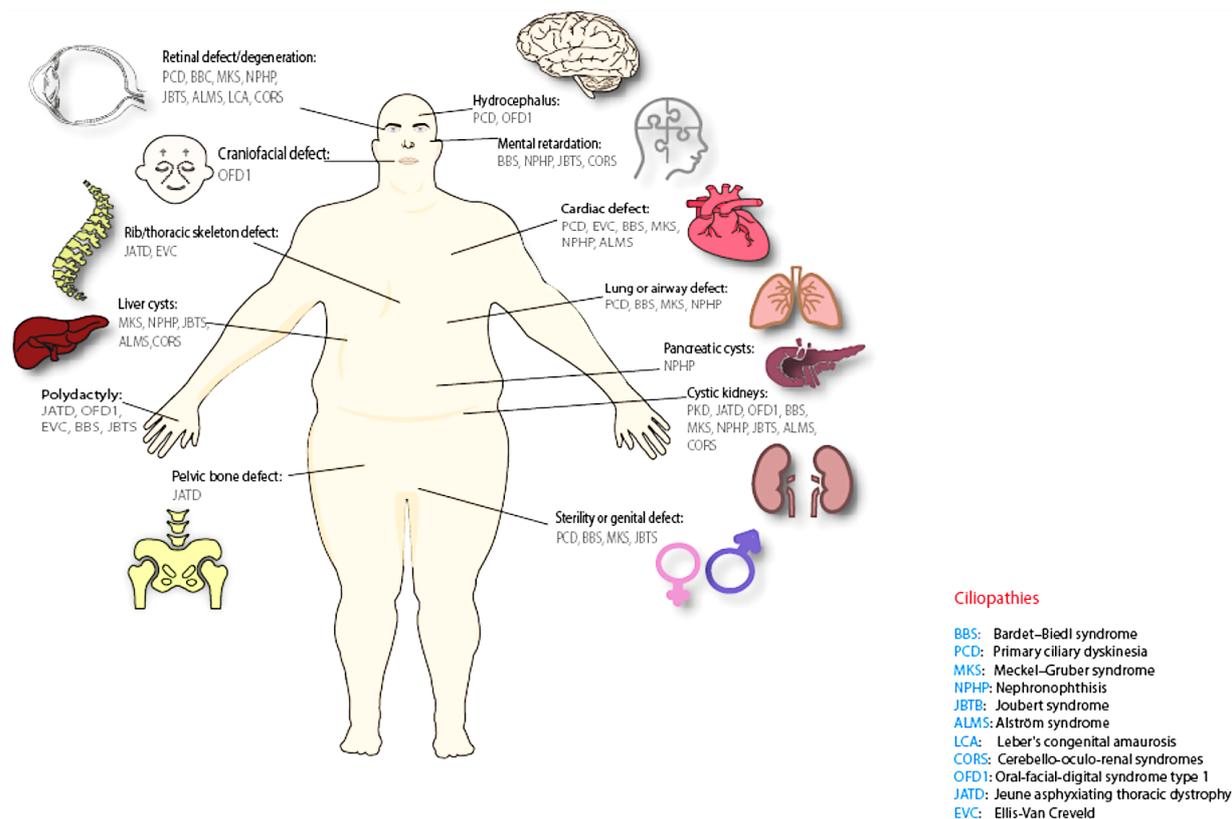


Figure 5 : Ciliopathies

Les ciliopathies sont nombreuses et se déclinent en différents syndromes listés à droite. Chaque syndrome affecte différents organes ou fonctions. Les conséquences les plus directes sont sur la concentration et la distribution de certains éléments sensoriels ou sur les propriétés mécaniques du cil. Schéma : <http://www.kaplanlab.com/Ciliopathy.html>

Un exemple classique de ciliopathies est le syndrome de dyskinésie ciliaire primitive (DCP). Cette maladie rare (1/20.000 naissances) et génétiquement hétérogène se caractérise par des défauts chroniques des voies respiratoires supérieures et inférieures. Environ la moitié des patients présente une anomalie de latéralité des organes internes (*situs inversus total* ou *situs ambiguus* / hétérotaxie). Le *situs inversus* provoque une inversion en miroir des positions du cœur et des poumons. Presque tous les hommes sont infertiles, à cause d'un trouble de la motilité des spermatozoïdes. Une diminution de la fertilité ou des antécédents de grossesses extra-utérines ont été rapportés chez les femmes affectées (Lobo et al., 2015). Le diagnostic repose sur les signes cliniques caractéristiques. Les méthodes incluent la microscopie électronique à transmission qui identifie des anomalies ultrastructurales ciliaires spécifiques sur des échantillons de biopsie, et la vidéo-microscopie à haute vitesse afin d'étudier la forme de l'onde des cils et la fréquence de leurs battements (Figure 6). Le test moléculaire génétique identifiant des mutations dans les gènes causaux peut confirmer le diagnostic.

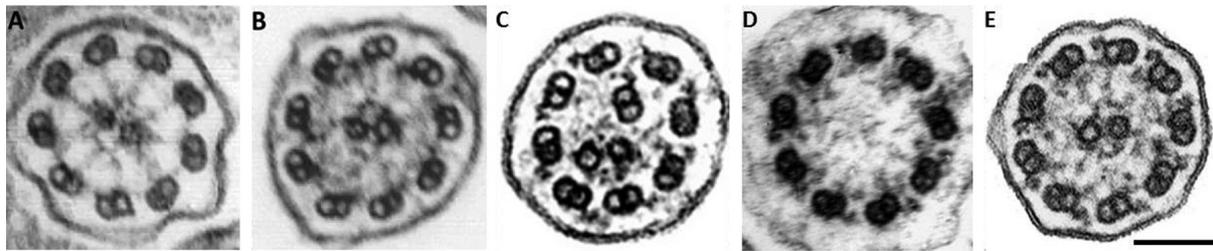


Figure 6 : Dyskinésie ciliaire primitive

Coupes transversales de cils en microscopie électronique à transmission chez des patients atteints de dyskinésie ciliaire primitive. (A) Absence combinée des bras externes de dynéine et des bras internes de dynéine. (B) Absence des bras externes de dynéine. (C) Absence des bras internes de dynéine et désorganisation axonémale. (D) Anomalie du complexe central. (E) Absence d'anomalie ultrastructurale décelable. Barre d'échelle = 0,1 μm . (Vallet et al., 2013)

Une autre ciliopathie est le syndrome de Bardet-Biedl (BBS), qui entraîne une atteinte multiviscérale. Sa prévalence en Europe est de 1/125 000 à 1/175 000. Elle est définie par une combinaison de signes et de symptômes, dont beaucoup ne deviennent manifestes qu'après plusieurs années : obésité, rétinopathie pigmentaire, polydactylie post-axiale, atteinte de la fonction rénale, hypogénitalisme et difficultés d'apprentissage. L'expression clinique individuelle est très variable. La plupart des signes sont présents chez une majorité de patients, mais seule la rétinite pigmentaire est constante après l'enfance. Il existe de nombreux autres signes cliniques dits mineurs associés de façon moins constante comme le diabète ou l'hypertension artérielle.

Les ciliopathies se caractérisent par une hétérogénéité génétique majeure : chaque syndrome clinique peut être causé par des mutations dans différents gènes, et des mutations d'un gène donné peuvent entraîner différents tableaux cliniques de ciliopathies (Fliegauf et al., 2007).

1.4. Les modèles d'étude

Les ciliopathies sont caractérisées par une impressionnante diversité de symptômes, et une étiologie génétique souvent complexe. La connaissance précise de la biologie des cils et flagelles s'avère donc essentielle pour la compréhension de ces maladies. Afin de mieux comprendre la composition moléculaire des cils, leur mode d'assemblage, mais aussi leurs fonctions sensorielles et de motilité, des organismes modèles sont utilisés en laboratoire (Vincensini et al., 2011). Malgré la conservation, on voit beaucoup de types de cils différents chez l'homme, d'où l'intérêt d'avoir des modèles différents. Certains modèles sont privilégiés pour des raisons biologiques (catégories de cil, mobile ou non, présence de structure extra-axonémale, longueur) et d'autres pour des raisons technologiques (outils disponibles, facilité de manipulation).

L'algue verte *Chlamydomonas*, le poisson zèbre, le xénope, le nématode *C. elegans* ou la drosophile, ainsi que des protistes comme *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Trypanosoma* ou *Leishmania* sont des modèles privilégiés. Chacune de ces espèces a des atouts spécifiques pour l'étude des cils et des flagelles (Figure 7).

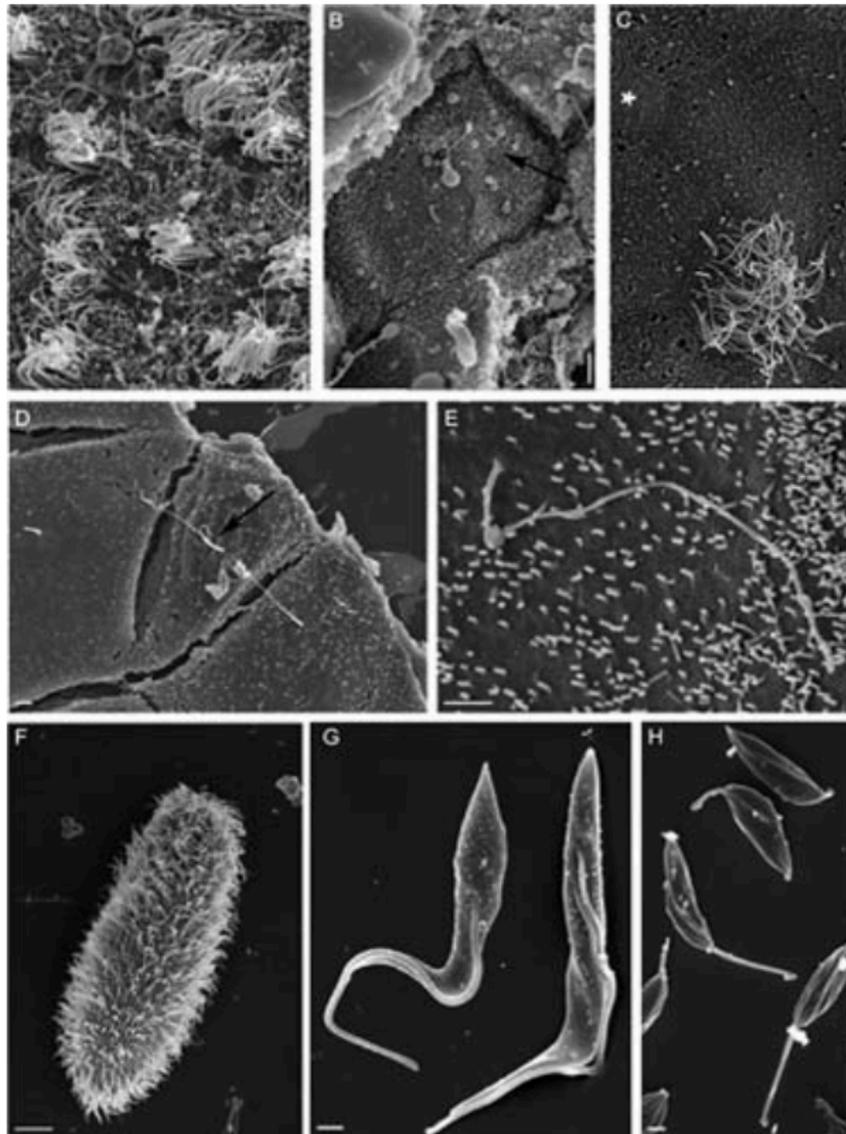


Figure 7 : Modèles d'étude des cils et des flagelles

Image de microscopie électronique à balayage. (A) Épithélium des ventricules d'un cerveau de souris. (B) Tubule collecteur de rein de souris visualisé après cryofracture. (C) Épithélium mucociliaire d'épiderme de xénope (D) Cellules de canaux collecteurs de la médulla interne de rein de souris (IMCD). (E) Cellules de Madin-Darby de rein de chien (MDCK). (F) *Paramecium tetraurelia*. (G) Forme procyclique de *Trypanosoma brucei*. (H) Stade promastigote de *Leishmania donovani*. Barre d'échelle = 1μm, sauf pour *Paramecium*, 10μm (Vincensini et al., 2011).

Les modèles auxquels je ferai plus souvent référence sont :

- ***C. reinhardtii*** possède deux flagelles (architecture 9+2) et présente divers types de nage en réponse à des stimulations lumineuses, ce qui permet de disséquer les voies de contrôle du battement des flagelles. Il présente de nombreux avantages pratiques : les flagelles sont faciles à purifier en grande quantité et ils sont non essentiels, ce qui fait de *Chlamydomonas* un très bon modèle pour la biochimie et la génétique directe (génération de mutants et possibilité de croisement) (Dutcher, 2020). La composition protéique de ses flagelles a fait l'objet

d'analyses protéomiques, dans un premier temps par électrophorèse bidimensionnelle (Dutcher, 1995) et ensuite par spectrométrie de masse (Pazour et al., 2005). Ces études évaluent à plus de 500 le nombre de protéines flagellaires, ce qui signifie que *Chlamydomonas* mobilise plus de 3 % de son potentiel codant pour ce seul organite. Des travaux pionniers menés sur cette algue verte ont conduit à la découverte et à la caractérisation d'un grand nombre de gènes impliqués dans le battement et la construction du flagelle, dont les dynéines axonémales ainsi que les acteurs du transport intraflagellaire (IFT) et leurs moteurs (Pazour et al., 2006) que les composants des particules (Cole et al., 1998).

- ***C. elegans*** apporte le pouvoir de la génétique à l'étude des processus ciliaires. Il possède des neurones sensoriels avec des terminaisons ciliées. Deux organes sensoriels, composés chacun de douze cellules nerveuses ciliées permettent à *C. elegans* de détecter les composés solubles ou volatiles présents dans son environnement. En plus des collections de mutants, les outils génétiques de marquage à la GFP sont aisément mis en œuvre, ce qui permet de visualiser l'IFT *in vivo* dans des souches sauvages ou mutantes. Le mouvement des particules IFT après couplage à des protéines fluorescentes a été démontré pour la première fois chez le nématode (Orozco et al., 1999). Ces cils ne battent pas, et le ver peut être anesthésié pour faciliter les observations. Plusieurs types de cils sont présents, à la fois en termes de structure et de fonction (Perkins et al., 1986), et fournissent un modèle idéal pour l'étude de la diversité des cils au sein d'un même organisme (Mukhopadhyay et al., 2008).
- ***Trypanosoma brucei*** est un unicellulaire eucaryote qui se cultive très facilement à des densités élevées (10 millions de cellules/mL). Il présente plusieurs avantages biologiques : il possède un flagelle mobile, de nombreux gènes flagellaires sont conservés et il maintient le flagelle existant durant l'assemblage du nouveau, offrant ainsi la possibilité de comparer l'organite en construction et l'organite en maintenance dans la même cellule. Cette propriété sera particulièrement importante pour mes travaux de thèse portant sur la construction des trains IFT. 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 ont de longs flagelles (environ 20µm au stade procyclique qui sera utilisé pour mes travaux), ce qui est idéal pour l'imagerie, se prêtent facilement à la génétique inverse (délétion/intégration de gènes par recombinaison homologue, ARN interférence ou ARNi) et le marquage endogène permet l'expression de protéines de fusion fluorescentes (Kelly et al., 2007) (Dean et al., 2015) (Julkowska and Bastin, 2009). L'extinction de gènes par ARNi est efficace et spécifique ; l'ARN cible est rapidement dégradé et la protéine disparaît selon son propre taux de renouvellement. L'émergence progressive du phénotype peut être visualisée par immunofluorescence ou vidéo microscopie : on peut observer la situation normale dans l'ancien flagelle, mais pas dans le nouveau (Bastin et al., 2000; Kohl et al., 2003). L'ensemble de ces critères fait de *T. brucei* un excellent modèle d'étude pour étudier les cils et flagelles (Vincensini et al., 2011).

II. *Trypanosoma brucei*

2.1. Bien plus qu'un parasite

a) Le trypanosome : un parasite bien connu

Le trypanosome africain est un protiste connu pour être responsable de la maladie du sommeil ou trypanosomiase humaine africaine (HAT) ou animale (AAT). Il est transmis par la mouche tsé-tsé, ce qui explique la restriction de la maladie en Afrique centrale. Cette maladie a été décrite par David Livingstone en 1857 lors de ses voyages exploratoires dans le Sud-Est de l'Afrique (Livingstone, 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) (Bruce, 1915). 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, la transmission cyclique du trypanosome entre les mammifères et la mouche tsé-tsé a été établie.

Aujourd'hui, l'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. 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. L'instabilité politique des différents pays a conduit à l'arrêt de ce programme et à l'abandon de la surveillance de la maladie. A la fin du vingtième siècle, elle est réapparue dans plusieurs pays avec un pic dans les années 90. En 2013, 6 228 cas ont été notifiés et en 2020 seul 700 cas ont été diagnostiqués (Franco et al., 2020) grâce à une surveillance active des patients dans les zones à risque. L'élimination de cette maladie est possible mais pas son éradication, en particulier si certains porteurs sont asymptomatiques (Buscher et al., 2018).

La nagana, ou trypanosomiase animale africaine, met en péril 50 millions de têtes de bétail et menace l'agriculture avec un impact économique grave estimé à 1,5 milliard de dollars américains par an (Kennedy, 2008).

Les trypanosomes sont des organismes eucaryotes appartenant à l'ordre des kinétoplastidés. Ils sont caractérisés par la présence d'une unique mitochondrie. Le kinétoplaste contient l'ADN mitochondrial qui est condensé et est visible par microscopie photonique (Figure 8).

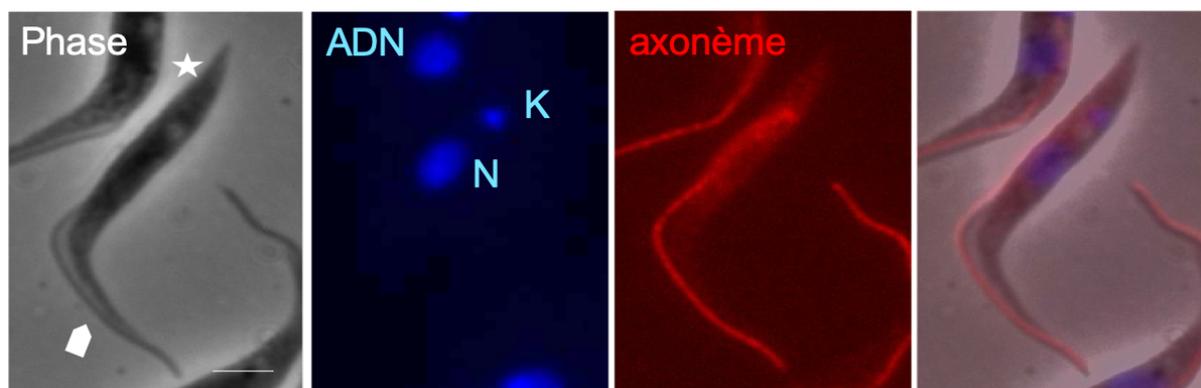


Figure 8 : *Trypanosoma brucei*

Images de microscopie photonique d'un trypanosome au stade procyclique en culture. L'ADN a été marqué par du DAPI (en bleu ; N : noyau, K : kinétoplaste) et les axonèmes sont marqués par immunofluorescence au moyen de l'anticorps mAb25 qui reconnaît la protéine SAXO1 (Dacheux et al., 2012) (en rouge). L'image de droite est le résultat de la superposition des images de cellules, ADN, et axonème. Le battement flagellaire entraîne la cellule vers l'avant, définissant les parties antérieure (flèche) et postérieure (étoile) du parasite. Barre d'échelle = 5µm.

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, sont transmis par les réduves, des insectes hématophages. Lors du repas sanguin, les réduves défèquent sur la peau de l'hôte entraînant des démangeaisons. Lorsque l'hôte se gratte, la plaie se contamine via les parasites présents dans les excréments.

La seconde catégorie est celle des salivaires. *Trypanosoma brucei* fait partie des formes infectieuses présentes dans la salive de la mouche tsé-tsé et qui pénètrent chez leur hôte lors d'un repas sanguin (via le derme, la lymphe puis le sang). Deux sous-espèces de *T. brucei* causent les différentes formes de la maladie du sommeil. *T. brucei gambiense* provoque des infections chroniques et se trouve en Afrique centrale et en Afrique de l'Ouest. *T. brucei rhodesiense* est présent dans le Sud et l'Est de l'Afrique et conduit à une forme plus aiguë (mais plus rare, seulement 1 à 2 % des cas) de la maladie. Des traitements médicamenteux (nifurtimox et éflornithine ou fexinidazole) existent pour soigner les trypanosomiases humaines.

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 et ne sont pas infectieux pour l'homme.

b) Cycle parasitaire et différenciation

Le trypanosome est un parasite extracellulaire. Le cycle parasitaire de *Trypanosoma brucei* alterne entre l'insecte vecteur (la glossine) et des hôtes mammifères (Figure 9). Les trypanosomes doivent donc adapter rapidement leur métabolisme ainsi que leur surface à leur nouvel environnement. 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.

Plusieurs étapes du cycle parasitaire ont été décrites et étudiées (Rotureau and Van Den Abbeele, 2013). Dans les mammifères, les trypanosomes se multiplient dans le sang de l'hôte et se présentent sous une forme élançée dont la longueur fait environ 27 μm (Figure 9, n°1). Ils sont donc directement exposés à la réponse immunitaire de l'organisme. Ils 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. La variation antigénique permet de changer régulièrement ce revêtement de surface à partir d'un pool de 1000 à 2000 gènes (Sima et al., 2019). 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 forme allongée (slender) se multipliant et se reproduisant en 6 h par fission binaire et la forme trapue (stumpy) émergeant uniquement lors du pic de parasitémie. Ce sont les parasites de forme trapue qui vont assurer la transmission. En 2016, une cohorte de chercheurs dont Brice Rotureau et Christelle Cren-Travaillé ont démontré que les parasites sont présents en grandes quantités au niveau de la peau des personnes infectées (Capewell et al., 2016). Plus récemment, une étude sur le terrain a montré que des personnes asymptomatiques pouvaient également présenter des parasites dans la peau et dès lors constituer un réservoir inattendu (Camara et al., 2020). Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives pour le diagnostic mais aussi démontre une nouvelle voie de transmission du parasite. Elle sera à prendre en compte dans le contexte de l'élimination de la maladie (Informal Expert Group on Gambiense et al., 2018).

Après ingestion par la mouche tsé-tsé au moment d'un repas sanguin, les parasites se différencient pour s'adapter à la vie dans divers tissus, ce qui s'accompagne de changements morphologiques et modifications biochimiques (Figure 9, n°2-6). Les formes trapues se différencient rapidement en stade procyclique et colonisent l'intestin moyen où elles se multiplient (Rotureau and Van Den Abbeele, 2013). Lors de cette étape, la synthèse d'une nouvelle couche de glycoprotéines est engagée. Elle est composée de deux types de procycline qui remplacent la couche de VSG (*Variant Surface Glycoprotein*) (Roditi and Clayton, 1999). Par la suite, les parasites migrent dans l'intestin antérieur et s'allongent jusqu'à 45 μm dans certaines souches (Van Den Abbeele et al., 1999). Ils continuent leur migration vers le cardia où les formes épimastigotes, caractérisées par le positionnement du kinétoplaste entre le noyau et le pôle antérieur de la cellule (Vickerman, 1985) se divisent asymétriquement. Elles donnent naissance à deux cellules avec la morphologie épimastigote, une courte et une longue (Rotureau et al 2011). Les parasites épimastigotes courts 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 qui correspondent au stade métacyclique (seul stade infectieux pour les mammifères), où le kinétoplaste se trouve à l'extrémité postérieure de la cellule (Rotureau et al., 2012). Ces cellules non prolifératives ont acquis une couche de VSG en préparation pour l'inoculation à un nouvel hôte mammifère. Les parasites métacycliques ne se divisent pas, ils se différencient en stade sanguin (slender) et commencent alors à proliférer.

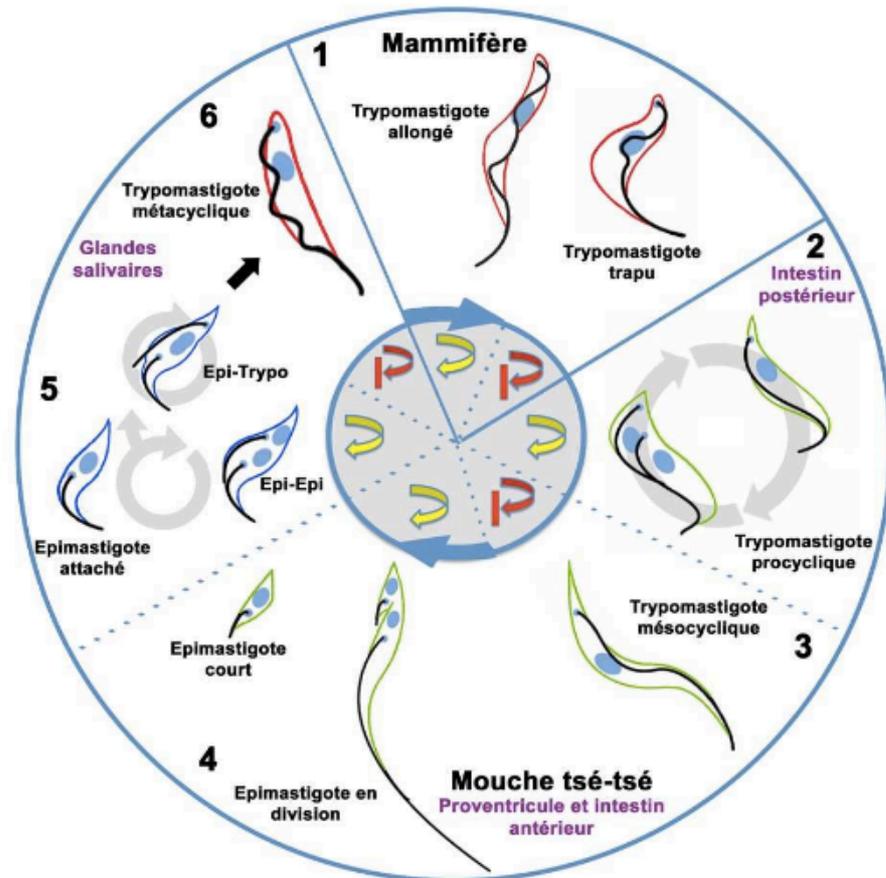


Figure 9 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*

- 1) Des parasites allongés et trapus sont présents dans l'intestin moyen.
 - 2) Seuls ceux de stade trapu se différencient en stade procyclique et prolifèrent. Ces cellules établissent 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 gagnent le cardia 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 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 asymétrique Epi-Trypo se produit (Rotureau et al 2012), donnant naissance à un nouveau stade trypomastigote.
 - 6) Ces cellules poursuivent leur différenciation dans les glandes salivaires pour établir une population infectieuse dite métacyclique. Quand une mouche tsé-tsé infectée au niveau des glandes salivaires se nourrit sur l'hôte, ces parasites sont injectés dans le derme et le cycle peut recommencer.
- Redessiné par Cécile Fort à partir de (Rotureau et al., 2011) (Rotureau et al., 2014)*

2.2. Le flagelle de *Trypanosoma brucei*

a) Un flagelle motile

Le flagelle du trypanosome lui permet de se déplacer. Sa motilité se définit par la propagation d'ondes à haute fréquence et basse amplitude qui sont initiées à partir de l'extrémité distale du flagelle vers la base de l'organite, assurant la nage en avant du parasite. L'extrémité distale du flagelle bat à une fréquence de 12-14 Hz. L'amplitude de l'onde est constante lorsqu'elle est transmise le long de la partie libre

du flagelle et de l'extrémité antérieure de la cellule mais se réduit progressivement à mesure qu'elle se rapproche de la base de l'organite qui est noyée dans le corps cellulaire. A intervalles de temps variables, le flagelle bascule pendant de courtes périodes vers une propagation d'ondes de la base vers l'extrémité dont la fréquence de battement est de 3 à 5 Hz. Ces ondes sont donc de basse fréquence mais de plus grande amplitude et assurent les changements d'orientation (Branche et al., 2006).

Les trypanosomes sont très mobiles autant dans les tissus que lorsqu'ils sont cultivés en milieu liquide. Dans ces conditions, 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 ont permis de caractériser sa motilité (Heddergott et al., 2012). Des simulations informatiques montrent que le mouvement du flagelle de *T. brucei* est une adaptation à son environnement dense comme le sang ou les tissus. Le mouvement de *T. brucei* est crucial pour l'infection chez la souris (Shimogawa et al., 2018).

Chez l'insecte, *T. brucei* se déplace de l'intestin moyen vers les glandes salivaires. Les parasites parcourent une grande distance et doivent pénétrer la matrice pérîtrophique et le cardia (proventricule) suggérant un rôle important de la mobilité, le flagelle a potentiellement un rôle sensoriel pour la détection de l'environnement et savoir dans quelle direction nager. Brice Rotureau a mis en évidence que la motilité des différents stades du parasite était directement adaptée à leur fonction au cours du cycle parasitaire (migration, attachement ou prolifération). De plus, des parasites mutants incapables de nager en avant peuvent initier l'infection dans l'intestin mais échouent dans l'étape de différenciation suivante pour d'atteindre le cardia et les glandes salivaires, démontrant le caractère essentiel de la mobilité pour achever la partie vécérielle du cycle parasitaire (Rotureau et al., 2014).

b) Des structures atypiques

Chez le trypanosome, il n'y a pas de centriole, le cil émerge directement du corps basal. Comme la plupart des protistes ciliés, les trypanosomes conservent leurs corps basaux et leur flagelle au cours de leur cycle cellulaire. Lors de la division, ils synthétisent un nouveau corps basal, à partir d'un pro-corps basal pour construire un nouveau flagelle (Sherwin and Gull, 1989a) (Vaughan and Gull, 2015).

L'**axonème du trypanosome** présente une ultrastructure en « 9+2 » avec 9 doublets de microtubules périphériques entourant une paire centrale de singlets de microtubules (Figure 10). Les doublets périphériques portent les bras de dynéine internes et externes qui sont responsables du mouvement flagellaire, ainsi que les ponts radiaux ancrés au microtubule-A et orientés vers la paire centrale. L'étude du génome du trypanosome a révélé que la grande majorité des gènes codant les protéines axonémales (bras de dynéine, ponts radiaux, paire centrale) est conservée chez *T. brucei* (Berriman et al., 2005). Nous avons donc une conservation moléculaire en association avec la conservation structurale (Ralston et al., 2009). A titre d'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 (Branche et al., 2006) (Sapiro et al., 2002).

Schneider et ses collègues ont mis en évidence des modifications post-traductionnelles en 1987 (Schneider et al., 1987). Les sous-unités de microtubules α et β -tubuline subissent des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation et la glutamylation (Casanova et al., 2015). Des tubulines moins abondantes tels que γ -, ϵ -, δ - tubuline sont présentes chez les Trypanosomatidés, probablement au corps basal. 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 en 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 et al., 2003).

Le flagelle de *T. brucei* contient une structure extra-axonémique connue sous le nom de **fibre paraflagellaire** (PFR pour *paraflagellar rod*) qui est attachée le long de l'axonème (Figure 10).

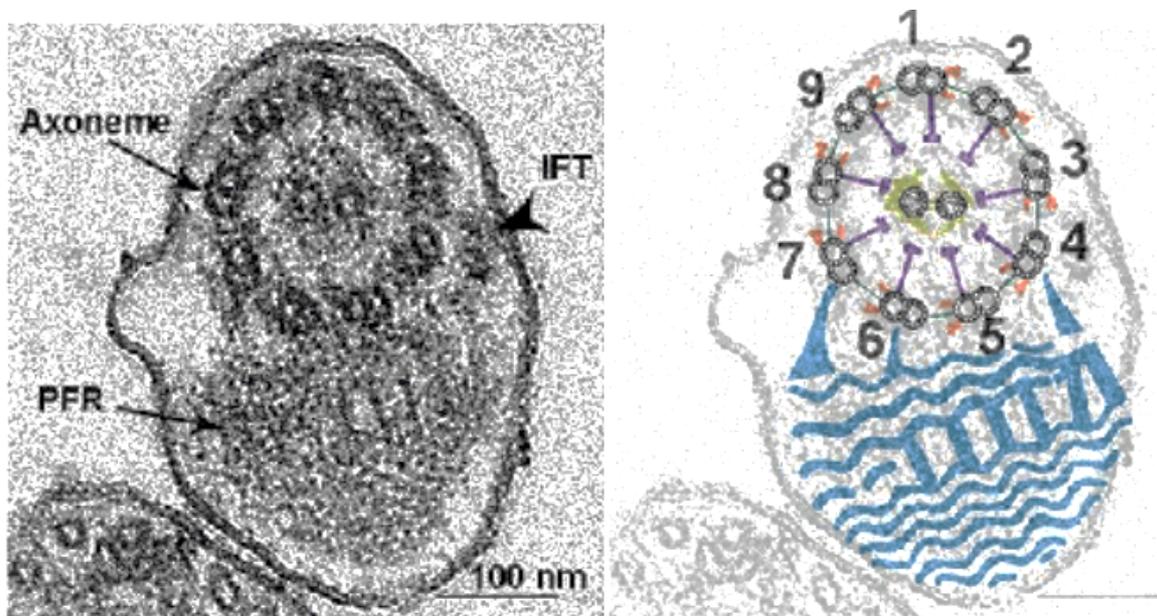


Figure 10 : Section transversale de l'axonème de *T. brucei*

Coupe transversale du flagelle de *T. brucei* observée en microscopie électronique en transmission. La représentation schématisque, superposée à l'image originale, montre les principaux composants structuraux de l'axonème, avec la numérotation des doublets de microtubules (Branche et al., 2006). La numérotation des doublets suit des règles conventionnelles : une ligne perpendiculaire à l'axe médian des microtubules de la paire centrale est tracée et entre en contact avec le tubule A d'un seul doublet défini comme le numéro 1. La numérotation suit l'orientation dans le sens des aiguilles d'une montre définie par les bras de dynéine présents sur le microtubule A de chaque doublet. Les bras de dynéine sont représentés en orange, les ponts radiaires en violet, les projections de la paire centrale en jaune et la PFR, avec ses 3 régions, ainsi que les connecteurs vers les doublets 4 et 7, est représentée schématiquement en bleu. Sur l'image de gauche, la tête de flèche indique une particule IFT positionnée au niveau du doublet 4 (voir ci-dessous).

La structure de la PFR est bien connue et décrite grâce à la microscopie électronique en 1986 par Farina ou plus récemment par Hughes en 2012 (Hughes et al., 2012) (Figure 11). Chez les kinétoplastidés, la PFR est parallèle à l'axe de la paire centrale qui ne présente pas de phénomène de torsion, au contraire de ce qui a été observé chez *Chlamydomonas* ou chez les ciliés (Branche et al., 2006) (Gadelha et al., 2006) (Ralston et al., 2006). L'asymétrie de l'interface axonème-PFR et l'orientation des bras de dynéine permettent une identification sans ambiguïté des doublets externes, numérotés de 1 à 9 selon la convention. La présence de la PFR sera un atout dans mes travaux de thèse pour positionner chaque doublet de microtubule en microscopie électronique.

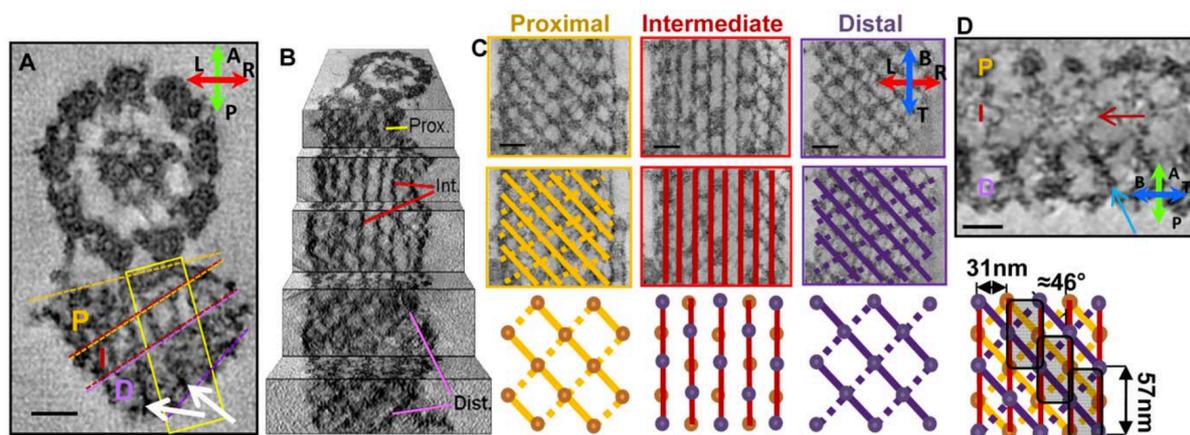


Figure 11 : Structure de la PFR

Observation en microscopie électronique en transmission (A) de vues transversales d'un flagelle démembré de *T. brucei* avec l'axonème et la PFR, indiquant les 3 zones de la PFR : proximale (P), intermédiaire (I) et distale (D). Des densités s'étendant à travers la PFR peuvent être observées (flèches blanches). Coupes transversales avec les zones P, I et D indiquées. (B) Vue sous forme d'escalier des zones de la PFR. (C) Vue de chacune des zones montrant des filaments parallèles dans la zone intermédiaire (flèche rouge) et des filaments orthogonaux s'étendant de la zone proximale à la zone distale (flèche bleue). Le diagramme composite monte les zones PFR en projection avec une périodicité et une unité de répétition structurale (rectangles ombrés). (D) La PFR est située au niveau des doublets de microtubules 5 et 6 et reliée par des connecteurs au niveau des doublets de microtubules 4 et 7. Le connecteur reliant le doublet 7 à la PFR a une structure en forme de Y facilement reconnaissable (Hughes et al., 2012).

Concernant la formation de la PFR, Philippe Bastin a démontré qu'elle est assemblée par addition de nouvelles sous-unités au bout distal (Bastin et al., 1999) comme l'axonème. En 2009, l'équipe de Linda Kohl a identifié la première kinésine nécessaire à l'assemblage de la PFR sur l'axonème : la kinésine 9. Son absence entraîne des modifications structurales dans la fibre paraflagellaire visibles en microscopie électronique et des défauts de mobilité de la cellule (Demonchy et al., 2009). La PFR est déstructurée et plusieurs de ses constituants se retrouvent de façon épisodique et anarchique tout autour de l'axonème.

Par cryotomographie électronique, Alexey Koifman a décrit la structure du flagelle dans trois états de flexion (Figure 12). Le réseau PFR dans les flagelles droits se répète tous les 56 nm sur la longueur de l'axonème, correspondant à l'espacement des protéines de connexion. Pendant la flexion flagellaire, les longueurs des compartiments unitaires de la PFR restent constantes tandis que les angles inter-

axiaux varient, comme pour un « cric » (Koyfman et al., 2011). Plusieurs hypothèses existent concernant le rôle de la PFR :

- 1) La PFR est requise pour la motilité des trypanosomes mais sa fonction précise reste à déterminer (Bastin et al., 1998). En 1998, Philippe Bastin a utilisé une approche ARNi sur la protéine PFR2 pour produire une ablation moléculaire spécifique de la structure PFR. Les cellules mutantes sont paralysées, démontrant que le PFR a un rôle essentiel dans la motilité flagellaire.
- 2) L'axonème entraîne l'expansion et la compression du réseau PFR. Cette découverte structurale suggère que la PFR modifie le mouvement de l'axonème dans le plan pour produire la motilité bihéliçoïdale (Koyfman et al., 2011).
- 3) La PFR pourrait également être associée à d'autres fonctions comme le transport de constituants dans le flagelle, ou un lieu de production d'énergie pour la cellule (Portman and Gull, 2010).

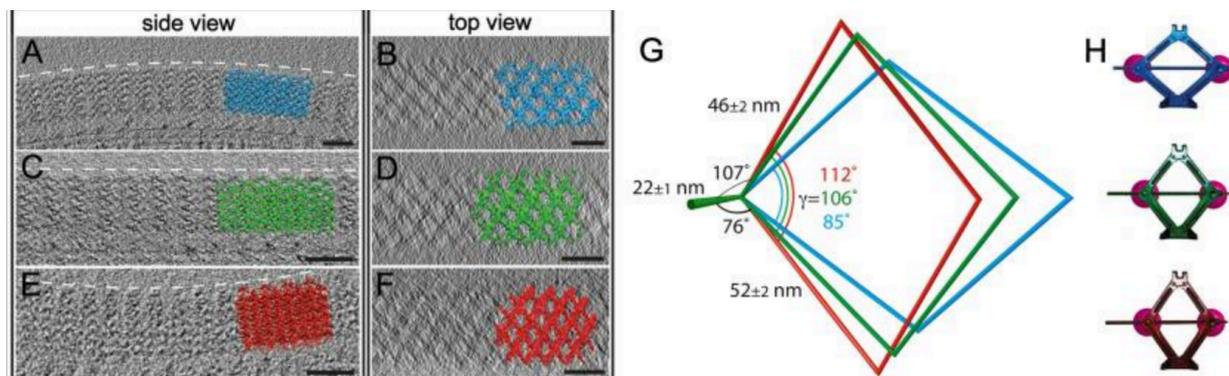


Figure 12 : Rôle de la fibre paraflagellaire

Le flagelle de *T. brucei* agit comme un vérin biologique. Vues de côté (A, C et E) et vues de dessus (B, D et F) d'un tomogramme d'une PFR qui est plié vers l'intérieur (A et B), droit (C et D) et plié vers l'extérieur (E et F). Les tomogrammes sont affichés en gris. Les reconstructions sont en couleur. (Barres d'échelle : 100 nm.) (G) Vue de dessus des axes des cellules unitaires cristallographiques. Alors que les distances axiales restent constantes, l'angle γ change lorsque la PFR se plie. (H) Modèles représentant les différents angles. Les protéines de connexion sont représentées par des sphères roses (Koyfman et al., 2011).

La PFR est unique aux trypanosomes et à quelques organismes apparentés, mais des structures extra-axonémiques sont fréquemment observées dans un certain nombre d'organismes différents, telles que les fibres denses externes du flagelle des spermatozoïdes humains (Escalier, 2003).

III. Le Transport IntraFlagellaire

3.1. Formation des cils et flagelles

Les premières expériences visant à comprendre le mécanisme d'assemblage des flagelles ont été réalisées par Joël Rosenbaum dans les années 60 (Rosenbaum et al., 1969).

La formation des cils et flagelles a été surtout étudiée chez les algues parce qu'elles peuvent être manipulées facilement. Elle commence par une phase de latence qui est suivie d'une croissance rapide puis, par une phase plus lente jusqu'à atteindre la longueur finale (Rosenbaum and Carlson, 1969). La synthèse de protéines flagellaires est indispensable et a lieu pendant la phase de latence (Rosenbaum and Child, 1967). Lorsque les flagelles sont détachés *in vitro* en présence de dibucaïne, *Chlamydomonas* commence à les régénérer presque immédiatement. En culture cellulaire, des cellules peuvent être sélectionnées dans lesquelles un flagelle est retiré et l'autre laissé intact. Lorsqu'un seul des deux flagelles est amputé, le flagelle intact se raccourcit par cinétique linéaire tandis que celui amputé se régénère. Les deux flagelles atteignent une longueur intermédiaire égale puis s'allongent simultanément et se rapprochent de leur longueur initiale à la même vitesse. Une régénération partielle des flagelles se produit à des concentrations de cycloheximide inhibant la synthèse protéique, ce qui suggère que les précurseurs flagellaires sont présents mais en quantités limitées. Lorsqu'un seul flagelle est amputé en présence de cycloheximide, le raccourcissement se déroule normalement et le degré d'élongation dans le flagelle amputé est plus grand que si les deux étaient amputés en présence de cycloheximide. Le processus de raccourcissement est donc indépendant de la synthèse des protéines. Les protéines du flagelle en cours de raccourcissement peuvent être recyclées pour la formation de nouveaux flagelles.

Les protéines composant le flagelle sont donc situées dans le corps cellulaire mais où se situe le site d'assemblage ?

Grâce à ses études auto-radiographiques au moyen d'acides aminés radiomarqués chez *Chlamydomonas*, Rosenbaum a déduit que le site d'assemblage des protéines est situé à l'extrémité distale des flagelles (Rosenbaum et al., 1969). En 1992, Johnson prouve que l'incorporation a lieu à l'extrémité distale du cil (Johnson and Rosenbaum, 1992). Chez *Chlamydomonas*, deux cellules biflagellées fusionnent pour former une seule cellule quadriflagellée contenant deux noyaux et un cytoplasme commun. Johnson a utilisé cette fusion cellulaire pour transférer des composants flagellaires non assemblés du cytoplasme d'une cellule dans celui d'une autre afin d'étudier *in vivo* la polarité de l'assemblage flagellaire. Dans une première série d'expériences, les sites d'addition de tubuline sur des axonèmes flagellaires allongés ont été déterminés. Les cellules donneuses qui avaient deux flagelles de pleine longueur et exprimaient une construction alpha-tubuline marquée par un épitope tag ont été fusionnées avec des cellules receveuses qui avaient deux flagelles de demi-longueur. Grâce à un pool commun de précurseurs qui comprenait la tubuline marquée, les cellules quadriflagellées avaient quatre flagelles de pleine longueur. L'immunofluorescence et la microscopie électronique ont montré que les microtubules

des axonèmes flagellaires des cellules receveuses s'allongent uniquement par addition de nouvelles sous-unités à leurs extrémités distales. Dans une autre série d'expériences, la polarité d'assemblage des ponts radiaires, une classe de structures axonémales associées aux microtubules, a été déterminée. Des cellules donneuses de type sauvage qui avaient deux flagelles mobiles de pleine longueur ont été fusionnées avec des cellules receveuses paralysées qui avaient deux flagelles sans ponts radiaires. Dans les 90 minutes après la fusion cellulaire, les flagelles précédemment paralysés sont devenus mobiles. La microscopie par immunofluorescence utilisant des antisérums spécifiques de protéines de ponts radiaires a montré que ces protéines apparaissaient en premier aux extrémités des axonèmes et s'assemblaient progressivement vers les bases.

Ensemble, ces résultats suggèrent que la tubuline et les protéines de ponts radiaires sont transportées à l'extrémité du flagelle avant leur assemblage dans la structure flagellaire.

Les travaux décrits montrent que les composants flagellaires sont disponibles dans le corps cellulaire mais que le site d'assemblage des flagelles se situe au bout distal. Une question se pose : Comment les protéines axonémales arrivent-elles au bout distal avant d'être incorporées ?

3.2. La découverte de l'IFT

a) Une découverte "microscopique"

C'est en 1993, que Kozminski et ses collègues observèrent, par contraste interférentiel différentiel (DIC), un mouvement bidirectionnel de « radeaux » le long des flagelles paralysés de *Chlamydomonas* (Figure 13). Cette découverte va être le début d'un nouvel axe de recherche sur les mécanismes de formation des cils et flagelles. Des particules se déplacent de la base du flagelle vers son extrémité distale à une vitesse de 1-2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (transport antérograde) et d'autres voyagent de l'extrémité distale du flagelle vers la base à une vitesse de 3-4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (transport rétrograde). Il observe également que l'IFT induit l'élongation du cil et que l'inhibition de l'IFT induit sa résorption (Kozminski et al., 1995).

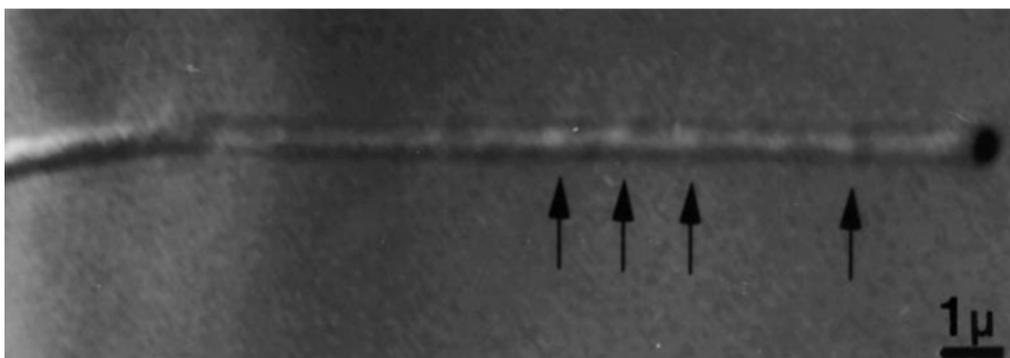


Figure 13 : Image de microscopie de la découverte de l'IFT.

Image de microscopie montrant les particules (flèches noires) le long du flagelle de l'algue vert. Le corps cellulaire est situé à gauche (Kozminski et al., 1995).

Kozminski et ses collègues proposèrent l'hypothèse que ces radeaux pourraient correspondre aux particules denses observées par microscopie électronique décrites 26 ans plus tôt, par Ringo. Il avait observé des coupes longitudinales et transversales en microscopie électronique de flagelles de *Chlamydomonas* qui avaient révélé un nombre variable de granules opaques aux électrons d'une longueur moyenne de 500 nm et d'une largeur d'environ 20 nm localisés entre la membrane flagellaire et l'axonème (Figure 14). En coupe transversale, ces granules denses aux électrons sont à proximité des microtubules (Gibbons, 1960) (Ringo, 1967). Toutefois, aucune fonction particulière n'avait été proposée à cette époque.

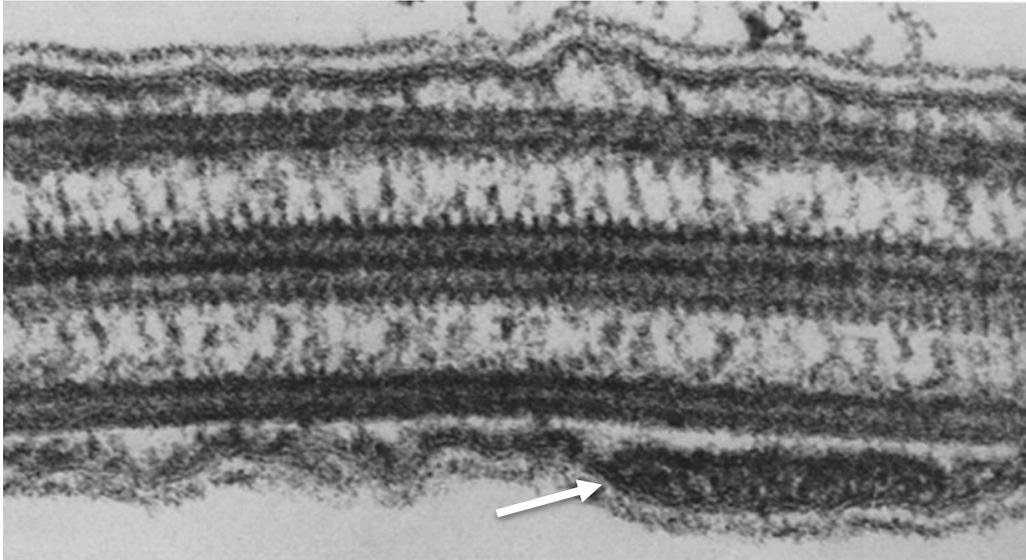


Figure 14 : Structure située entre la membrane flagellaire et les microtubules.

Coupe longitudinale d'un flagelle montrant un matériel opaque aux électrons entre les microtubules et la membrane flagellaire (flèche blanche) (Ringo, 1967).

Par microscopie corrélative, Kozminski a pu établir le lien entre les particules se déplaçant le long des cils et les structures denses aux électrons situées entre l'axonème et la membrane flagellaire observées en microscopie électronique en transmission

Il décrit ainsi pour la première fois le transport intraflagellaire (ou IFT pour *intraflagellar transport*).

Pour ses travaux, Rosenbaum a reçu la médaille EB Wilson de l'ASCB (Société américaine de biologie cellulaire) en 2006, la plus haute distinction décernée dans le domaine de la biologie cellulaire.

b) Le rôle du transport intraflagellaire dans la construction des trains

Quelle est la fonction des particules véhiculées dans les flagelles ? Quel est le rôle de l'IFT ?

En 1995, Kosminski avait démontré que l'IFT est essentiel à la formation du flagelle chez *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1995) et cette découverte a été confirmée chez d'autres modèles : *Tetrahymena* (Brown et al., 2002), nématodes

(Starich et al., 1995) (Collet et al., 1998), insectes (Sarpal et al., 2003), poissons (Sun et al., 2004), *Trypanosoma* (Kohl et al., 2003), chez la souris (Huangfu et al., 2003) et chez l'Homme (voir Partie 1.3)

Ce n'est qu'en 2001, que Marshall et ses collègues ont démontré que la régulation de la longueur du flagelle est dynamique et dépend de l'IFT. L'IFT assure l'assemblage ainsi que le maintien de l'intégrité et de la longueur du flagelle chez *Chlamydomonas*. Lorsque l'IFT est inhibé, le flagelle se résorbe et lorsque l'IFT est assuré la longueur du flagelle croît jusqu'à un état stationnaire.

L'utilisation du mutant *fla10* chez *Chlamydomonas* a permis de mettre en évidence le rôle de l'IFT dans la maintenance de la longueur du flagelle et le lien entre moteurs moléculaires et particules IFT. 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 deviennent plus courts pour atteindre une longueur de 5 µm. A ce stade, seulement une faible proportion de petits trains IFT est encore visible en microscopie à contraste interférentiel. La majorité des protéines FLA10 est localisée au niveau de la base du flagelle chez le mutant. Si l'incubation est poursuivie, les flagelles se résorbent complètement. Ces résultats indiquent que FLA10 est indispensable pour la maintenance des flagelles. De fait, un état d'équilibre entre l'assemblage et le désassemblage des sous-unités de tubuline incorporées ou dissociées au niveau de la pointe du cil doit être assuré.

Ce phénomène dynamique a été décrit par Marshall et Rosenbaum. Il est désigné comme un modèle de point d'équilibre, ou *balance point model* en anglais, car le système IFT reste actif et dynamique, et régule la longueur du cil (Marshall and Rosenbaum, 2001). Le modèle propose que le taux d'assemblage varie en fonction de la longueur en raison de la dépendance inhérente à la longueur du transport intraflagellaire. Plus le flagelle est court et plus le taux d'assemblage est actif. Le désassemblage est indépendant de la longueur, de sorte que les deux taux ne peuvent atteindre un point d'équilibre qu'à une seule longueur.

Comment l'IFT contribue à l'assemblage des flagelles ? L'hypothèse longtemps proposée était que l'IFT permet le transport de constituants à l'extrémité distale du flagelle. Cette hypothèse n'a été démontrée qu'en 2015 par Craft et ses collaborateurs (Craft et al., 2015).

Chez *Chlamydomonas*, l' α -tubuline marquée à la GFP pénètre dans les cils en tant que cargaison de transport intraflagellaire. Par microscopie en fluorescence en utilisant le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) les flagelles sont photo-blanchis, effaçant ainsi le fort signal de la tubuline GFP présente dans les microtubules de l'axonème. Le signal fluorescent des nouvelles unités de GFP-tubuline peut ainsi être examiné dès son entrée dans le flagelle. Une vidéo montre une co-localisation entre le signal de la GFP-tubuline et la mCherry-IFT20 et prouve que la tubuline est transportée par les trains IFT (Figure 15). Au début de la croissance du flagelle, l'apport de tubuline est élevé, et l'organite s'allonge rapidement. Plus le flagelle s'allonge, plus son taux de croissance ralentit jusqu'à atteindre l'équilibre entre

les taux d'assemblage et de désassemblage. Si la croissance se poursuit au-delà du point d'équilibre, la vitesse de désassemblage est plus rapide et le flagelle raccourcit pour revenir au point d'équilibre.

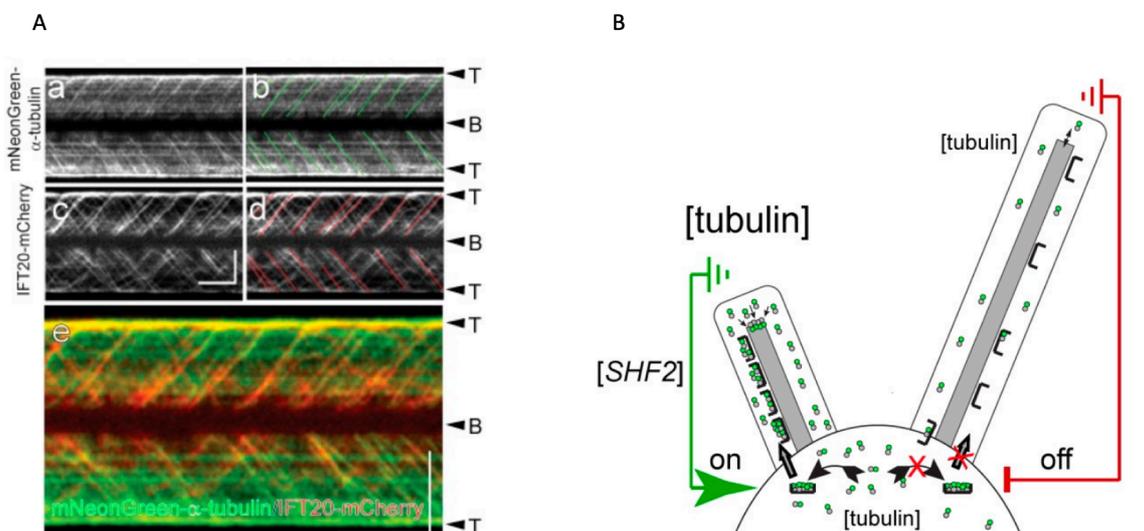


Figure 15 : Transport de la tubuline dans les cils

Cette figure représente le transport de la tubuline dans les flagelles de *Chlamydomonas*. Il est possible de voir en microscopie sur cellules vivantes le transport de la tubuline par l'IFT. Kymographes (A) issus d'observations simultanées sur les mêmes flagelles montrant la co-localisation entre la GFP-tubuline (vert) et la mCherry-IFT20 (rouge). La tubuline est donc véhiculée par l'IFT en tant que cargo et un modèle de régulation de la tubuline dans le cil a pu être établi (B). Le cil incomplètement assemblé induit un signal entraînant une augmentation de la quantité de trains IFT avec la tubuline (flèche verte). Le transport accru de la tubuline augmentera la concentration de tubuline soluble dans la matrice des cils et favorisera la polymérisation des microtubules axonéaux. Un système de régulation à la baisse existe également lorsque l'apport de tubuline est suffisant (flèche rouge) (Craft et al., 2015).

De façon générale, le transport intraflagellaire (IFT) permet donc l'acheminement de composants nécessaires à l'élongation et au maintien du cil comme la tubuline (Lehtreck et al., 2017). L'IFT permet aussi de transporter d'autres protéines comme les protéines membranaires, les ponts radiaux ou encore les complexes de régulation des dynéines (DRC4) (Wren et al., 2013).

En 2003, Linda Kohl a démontré que l'IFT est essentiel à la construction des flagelles et à la morphogénèse des trypanosomes (Kohl et al., 2003). Pour étudier la fonction du flagelle, sa formation a été perturbée en inhibant par ARNi des composants requis pour le transport intraflagellaire. La régulation à la baisse du transport intraflagellaire conduit à l'assemblage d'un flagelle plus court. Les cellules avec un flagelle plus court sont plus petites, avec une corrélation directe entre la longueur du flagelle et la taille des cellules. Une analyse morphogénétique détaillée révèle que la pointe du nouveau flagelle définit le point où la cytokinèse est initiée. Ensuite, lorsque la formation du nouveau flagelle est complètement bloquée (mais le flagelle existant reste présent), la cellule se divise et la fille dépourvue de flagelle est très courte, perd la forme et la polarité normale. Elle peut toujours dupliquer le corps basal et le noyau, mais échoue à la cytokinèse. L'élongation du flagelle contrôle la formation de structures cytosquelettiques (présentes dans le corps cellulaire) qui agissent comme des

organisateurs moléculaires de la cellule. La régulation de la longueur du flagelle contrôle la morphogenèse au cours du cycle parasitaire (Rotureau et al., 2011).

En 2013, Johanna Buisson a caractérisé l'IFT en réalisant une approche en microscopie photonique permettant l'analyse séparée et automatisée du transport intraflagellaire aller et retour. Cette étude utilisant la microscopie photonique sur des cellules vivantes qui surexpriment la protéine de fusion GFP::IFT52, a révélé une vitesse uniforme pour l'IFT rétrograde ($5 \mu\text{m/s}$) mais deux populations distinctes pour le mouvement antérograde qui sont sensibles à la température. Pour 2/3 d'entre eux, les particules IFT voyagent à une vitesse de $2,4 \mu\text{m/s}$ tandis que la seconde population voyage à une vitesse plus lente de $1,5 \mu\text{m/s}$ (Buisson et al., 2013). Lorsqu'ils atteignent l'extrémité distale, les trains antérogrades sont divisés en trois et convertis en trains rétrogrades. Lorsqu'un train antérograde rapide rattrape un train lent, il est presque deux fois plus susceptible de fusionner avec lui plutôt que de le dépasser, ce qui implique que ces trains voyagent sur un ensemble restreint de microtubules. La question se posait alors : est-ce que des protéines transportées dans le flagelle peuvent être recyclées ?

En utilisant des expériences de photoblanchiment, Johanna Buisson a montré pour la première fois que les protéines IFT provenant du flagelle sont mélangées avec celles présentes à sa base et peuvent réitérer un cycle IFT complet dans le flagelle. Ce recyclage dépend de la longueur du flagelle et des vitesses IFT. La modélisation mathématique intégrant tous les paramètres révèle en fait l'existence de deux pools de protéines IFT à la base du flagelle, mais un seul est activement engagé dans l'IFT (Figure 16).

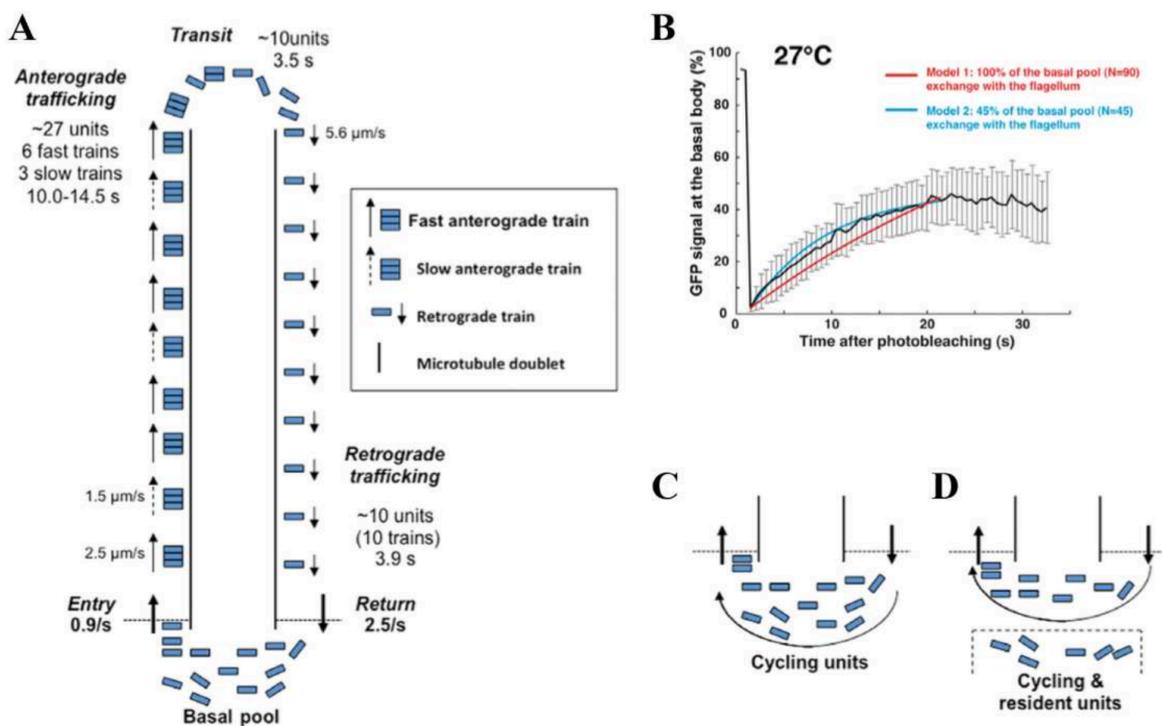


Figure 16 : Modèle de la répartition des trains IFT dans le cil du trypanosome.

Les trains antérogrades 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 (A). Lorsque les trains IFT arrivent à l'extrémité distale du flagelle, ils sont fragmentés en trois trains rétrogrades. Les trains IFT rétrogrades repartent plus rapidement vers

la base du flagelle à une vitesse d'environ 5,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ - Quantification du signal fluorescent à la base du flagelle avant et après photoblanchiment (B) - Modèles dynamiques du recyclage des IFT à la base du flagelle avec la participation de l'ensemble des protéines IFT (C, modèle 1) où seulement d'une population (D, modèle 2) (Buisson et al., 2013).

En 2016, Cécile Fort a démontré lors de ses travaux de thèse que l'IFT est essentiel à la maintenance de la composition du flagelle du trypanosome mais pas de sa longueur. En effet, pour étudier le rôle de l'IFT chez les flagelles matures, elle avait bloqué l'expression des gènes *IFT88* et *IFT140* par ARNi et avait suivi le transport intraflagellaire au moyen d'une protéine de fusion YFP::IFT81 sur cellules vivantes (Fort et al., 2016). Dans les deux cas, le flagelle assemblé avant l'initiation de l'ARNi reste présent et la croissance du nouveau flagelle est inhibée comme attendu. Par contre, l'IFT est absent dans les flagelles matures chez les cellules *IFT88^{RNAi}* et à l'arrêt chez les cellules *IFT140^{RNAi}*. Des expériences d'immunofluorescence 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}* n'a montré 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 structuraux de l'axonème après construction du flagelle. Par contre, la présence d'autres protéines est modifiée en absence de transport intraflagellaire : la sous-unité R de la protéine kinase A n'est plus concentrée dans le flagelle mais est largement retrouvée dans le corps cellulaire alors que le moteur kinésine 9B s'accumule à l'extrémité distale du flagelle au lieu de sa base. Enfin, la protéine d'extrémité distale FLAM8 est dispersée le long du flagelle ou même concentrée à sa base. Cela révèle que l'IFT fonctionne également dans le maintien de la distribution de certaines protéines flagellaires une fois la construction de l'organe terminée.

Cette propriété est fondamentale pour pouvoir étudier des cellules dont la production de protéines essentielles à l'IFT a été inhibée (Fort et al., 2016). Éloïse Bertiaux a montré que chez le trypanosome, le flagelle mature est verrouillé et maintenu : ce nouveau modèle a été baptisé « grow and lock » (Bertiaux et al., 2018b).

3.3. Les moteurs moléculaires du transport intraflagellaire

Les particules IFT sont des complexes protéiques véhiculés par des moteurs moléculaires dans les cils et flagelles. Elles sont composées de la kinésine II, la dynéine 2 et des protéines IFT (Piperno and Mead, 1997).

a) La kinésine II

On trouve deux familles de kinésine II : soit sous forme d'un hétérotrimère (constitué de deux chaînes motrices associées par des domaines coiled-coils et d'une protéine associée ou KAP), soit sous forme d'un homodimère (Figure 17).

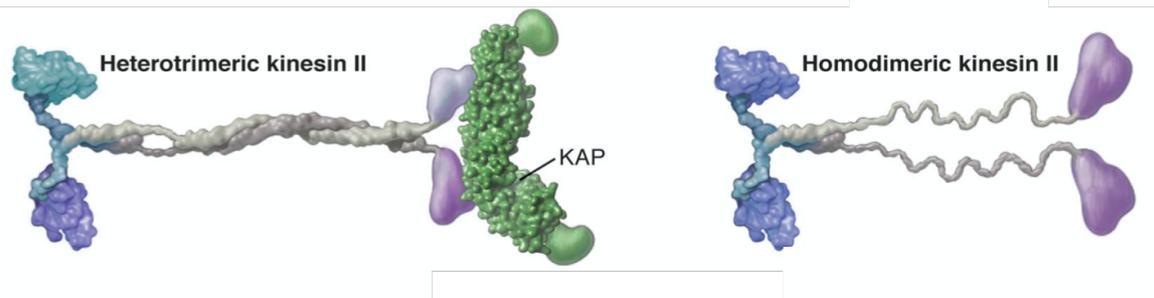


Figure 17 : Structure de la kinésine II.

La kinésine II est composée de deux sous-unités motrices différentes. Le domaine moteur (en bleu) interagit avec les microtubules et contient l'ATPase utilisée pour déplacer l'holoenzyme le long des microtubules. La tige de bobine enroulée est l'endroit où les deux sous-unités motrices interagissent l'une avec l'autre via des domaines coiled-coils (gris). Les domaines situés au niveau de la queue interagissent avec la sous-unité non motrice KAP3. Cette protéine n'est pas présente dans la forme homodimérique (Marsalek et al. 2000) (Hunter and Allingham, 2020)

La kinésine II est une protéine capable de se déplacer en présence d'ATP sur les microtubules de l'axonème, en direction du pôle positif des microtubules, c'est-à-dire vers le bout distal du cil. En absence de kinésine fonctionnelle, il n'y a pas de transport intraflagellaire (Kozminski et al., 1995).

La présence de ce moteur entre la membrane flagellaire et les doublets externes de microtubules a été montrée grâce à des immunomarquages à l'or colloïdal contre la kinésine FLA10 chez *Chlamydomonas*. Le rôle de la kinésine a été mis en évidence grâce aux mutants *fla10*, *fla8* (chaîne motrice) et *fla3* (KAP). La kinésine II assure donc le transport antérograde de l'IFT (Kozminski et al., 1995).

Chez *C. elegans*, Snow a montré que deux holoenzymes, la kinésine-II (hétérotrimérique) et l'OSM-3-kinésine (homodimérique), coopèrent de manière surprenante pour contrôler l'IFT en construisant des parties distinctes des cils. Au lieu que chaque moteur déplace indépendamment sa propre cargaison spécifique vers une destination distincte, les deux moteurs sont associés dans la partie intermédiaire du cil avant qu'ils se dissocient. La forme hétérotrimérique est recyclée par transport rétrograde pendant que OSM-3 poursuit son chemin le long de la partie distale (Ou et al., 2005). L'OSM-3-kinésine transporte seule les particules IFT le long des microtubules singlets distaux pour construire et stabiliser le segment distal. Ainsi, l'activité coordonnée de ces moteurs IFT crée deux systèmes de transports séquentiels.

Chez la souris, la délétion d'une des deux sous-unités motrices de la kinésine hétérotrimérique (la KIF3B) a de profonds impacts sur la formation des cils (Nonaka et al., 1998). Les mutants nuls n'ont pas survécu au-delà de la mi-gestation, présentant une croissance anormalement lente, un ballonnement du sac péricardique et une désorganisation du tube neural. Les souris présentaient des perturbations de l'asymétrie gauche-droite dans la boucle cardiaque. L'immunocytochimie a révélé la localisation de KIF3B dans les cils nodaux chez les souris sauvages. La vidéo-microscopie a montré que ces cils n'étaient plus mobiles. Ces données suggèrent que KIF3B est essentielle pour la détermination de l'asymétrie gauche-droite et que la kinésine est essentielle à la construction des cils (Figure 18).

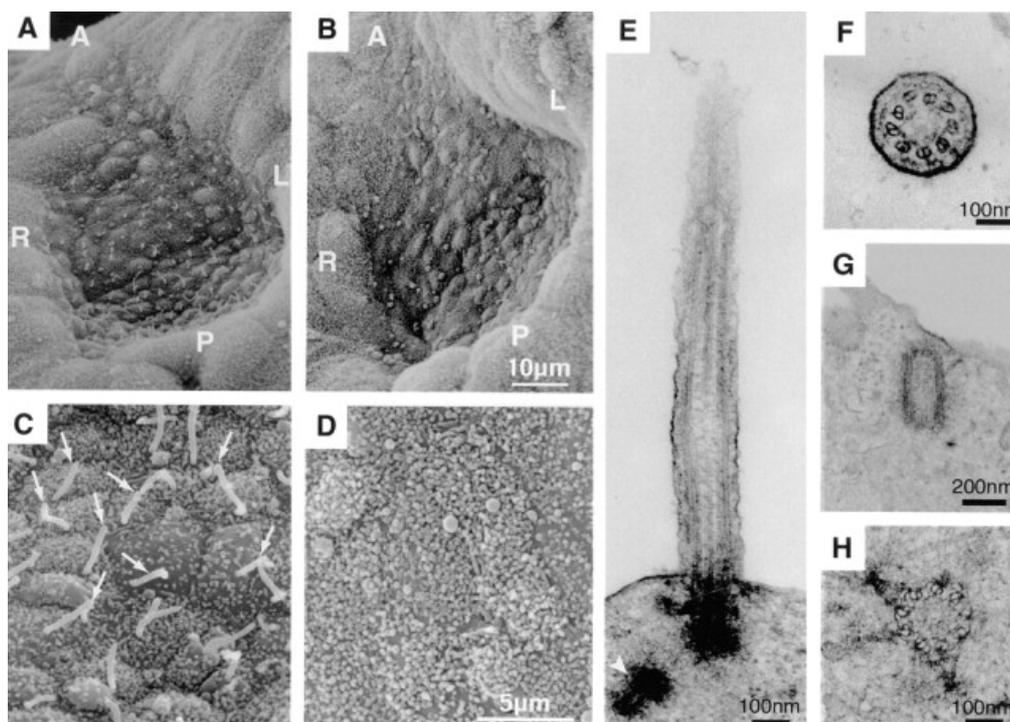


Figure 18 : Impact de la perte de Kinésine KIF3B chez des embryons de souris

Images de microscopie électronique à balayage d'embryons de type sauvage (A et C) et *kif3b*^{-/-} (B, D). (C) et (D) sont à un grossissement plus élevé pour clarifier le phénotype. L'orientation du nœud dans l'embryon est indiquée (A, antérieur ; P, postérieur ; L, gauche ; R, droite). La forme du nœud est triangulaire et se rétrécit vers l'extrémité antérieure (A, B). Chacune des cellules nodales possède un seul cil (flèches, [C]). Ces cils sont absents (D) dans le nœud des embryons *kif3b*^{-/-}.

Images de microscopie électronique en transmission des cellules nodales d'un embryon de type sauvage (E, F) et d'un embryon *kif3b*^{-/-} (G, H). Les cellules nodales de type sauvage ont des cils (E) avec un centriole perpendiculaire au corps basal (pointe de flèche, [E]) et un arrangement de microtubules 9 + 0 (F). Dans les embryons *kif3b*^{-/-}, les cils sont absents, mais les corps basaux sont présents (G, H) (Nonaka et al., 1998).

Le génome de *T. brucei* contient deux gènes qui codent des kinésines II, KIN2A et KIN2B. Ces deux protéines sont présumées homodimériques. Un gène encodant la protéine associée à la kinésine (KAP) n'a pas pu être identifié dans aucun génome de Trypanosomatidés (Julkowska and Bastin, 2009) (Morga and Bastin, 2013). L'inhibition par ARNi de KIN2A ou KIN2B individuellement n'a pas abouti à un phénotype visible : les cellules assemblent des flagelles apparemment normaux et poussent normalement en culture, suggérant une redondance. L'inhibition simultanée de KIN2A et de KIN2B entraîne une diminution de la fréquence des particules IFT dans le flagelle, associée à une accumulation des protéines IFT à la base du flagelle et des flagelles très courts. Ces données montrent que KIN2A et KIN2B sont impliquées dans le transport antérograde pour l'élongation du flagelle (Bertiaux et al., 2018b). Des résultats équivalents ont été obtenus en inhibant l'expression de ces kinésines chez le stade sanguin du parasite (Douglas et al., 2020).

Chez le trypanosome, l'impact de l'absence de kinésine sur les protéines du complexe IFT-B a été étudiée par Benjamin Morga (Bertiaux et al., 2018b). Après 48h d'induction, les cellules des souches *KIN2A2B*^{RNAi}, présentaient des flagelles plus courts ($\cong 7\mu\text{m}$), avec une diminution drastique de la fréquence des trains et une accumulation de l'IFT-B à la base du flagelle (Morga et al., données non publiées). Cette dernière information suggère que le rôle de la kinésine n'est pas limité au

transport des trains antérogrades mais qu'elle participerait également à l'entrée des trains IFT dans le flagelle.

b) La dynéine 2

Les moteurs dynéine assurent le transport rétrograde des trains IFT en assurant leur déplacement du bout distal du cil vers sa base. Les dynéines IFT sont différentes des dynéines cytoplasmiques (Figure 19). Ce sont de gros complexes protéiques d'environ 2 MDa, comportant en général deux chaînes lourdes, et plusieurs chaînes intermédiaires et légères (DiBella and King, 2001).

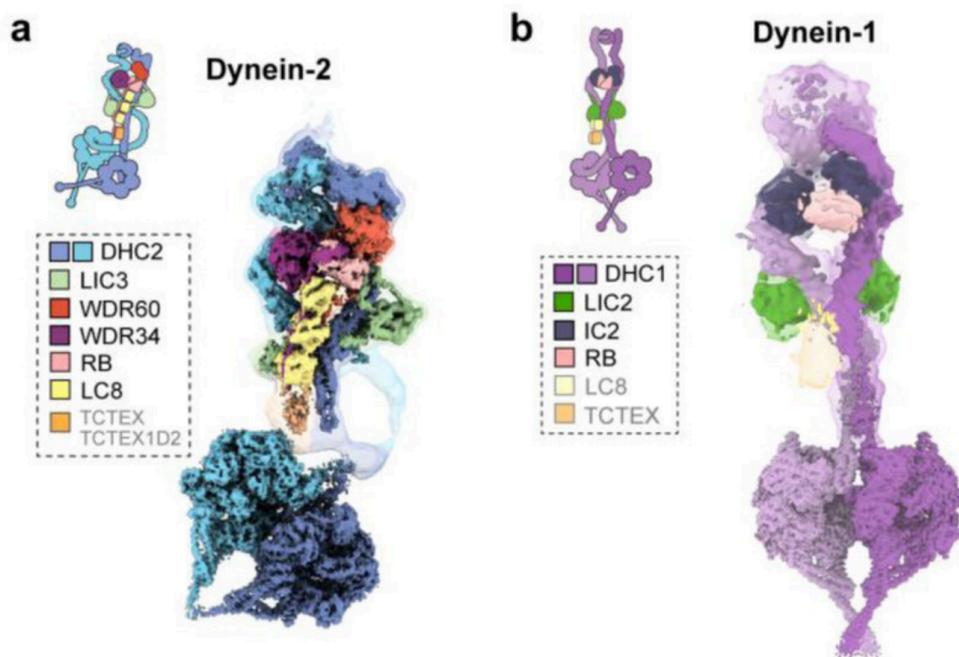


Figure 19 : Structure de la dynéine-2 et de la dynéine 1

(a) Structure réalisées à partir de Cryo-microscopie électronique représentant les domaines de queue et de moteur de la dynéine-2 et une représentation montrant la connexion flexible entre eux (en bleu) (Toropova et al., 2019).

(b) Cryo-microscopie électronique montrant la queue et les domaines moteurs de la dynéine-1. (Zhang et al., 2017). La dynéine-2 a une architecture étonnamment asymétrique par rapport à la dynéine-1.

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 (D1bLIC/XBX1/FAP133) ou légères (LC8) perturbent la construction des cils et flagelles avec une présence abondante de matériel IFT au bout distal. Les particules IFT sont transportées par la kinésine II mais ne peuvent pas retourner à la base en l'absence de moteur rétrograde et s'accumulent à l'extrémité du flagelle (Pazour et al., 1998) (Porter et al., 1999; Signor et al., 1999a; Signor et al., 1999b) (Perrone et al., 2003).

Chez les Trypanosomatidés, on trouve deux gènes distincts pour la chaîne lourde : DHC2.1 et DHC2.2. Chez *Leishmania mexicana*, seul le gène *DHC2.2* a pu être supprimé génétiquement, ce qui a entraîné la formation de minuscules flagelles (Adhiambo et al., 2005). Les flagelles sont visibles sur des sections longitudinales de

microscopie électronique en transmission mais ne s'étendent pas au-delà de la poche flagellaire (Figure 20). En revanche, le knock-out de *DHC2.1* n'a pas pu être obtenu, ce qui a conduit à suggérer que ce gène est essentiel et que les deux chaînes lourdes remplissent des fonctions séparées.

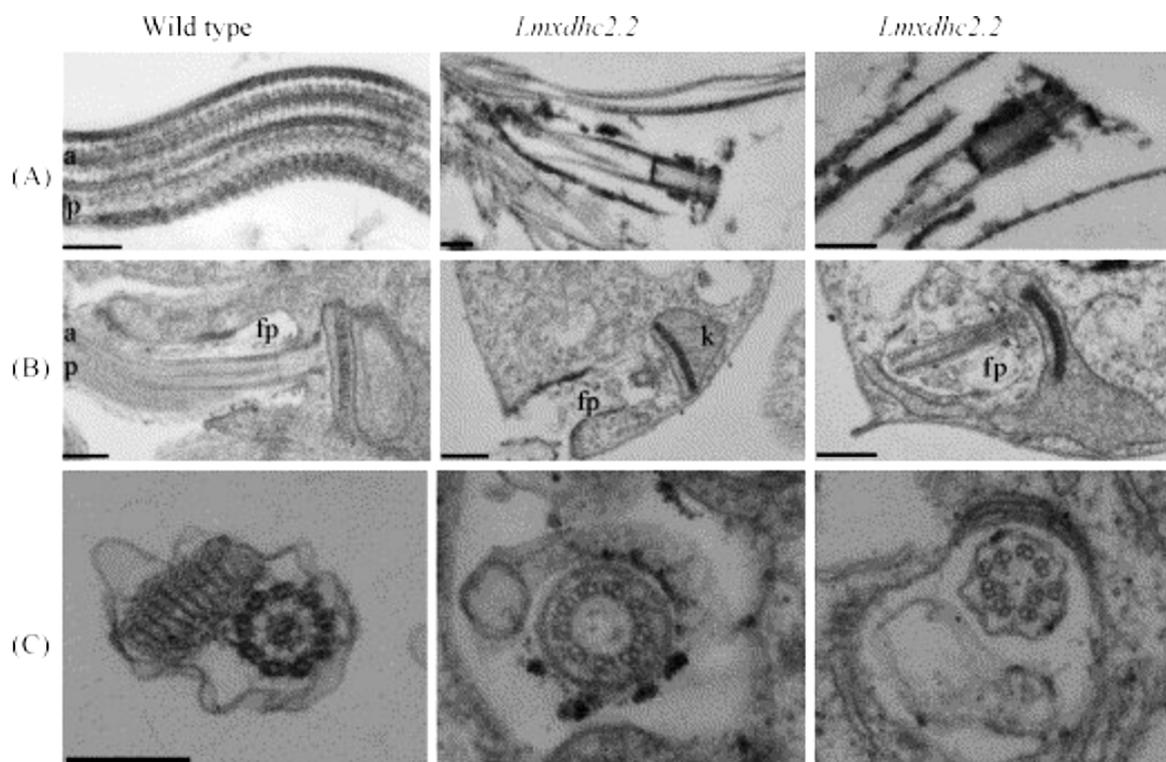


Figure 20 : Mutation de la dynéine chez *L. mexicana*.

Images de microscopie électronique de coupes longitudinales (A, B) et transversales (C) de *L. mexicana* de type sauvage et de mutants *Lmxdhc2.2*, soit sous forme de cytosquelettes extraits au détergent (A), soit des cellules entières (B, C). Des coupes longitudinales ont montré que les flagelles de *Lmxdhc2.2* s'étendent rarement au-delà de la poche flagellaire (fp) et que la fibre paraflagellaire (p) est absente. Les coupes transversales montrent également l'absence de structure PFR et un axonème sous-développé. a, axonème; k, kinétoplaste. Barres d'échelles = 0,5 μm (A et B) et 0,25 μm (C) (Adhiambo et al., 2005).

Chez le trypanosome, deux gènes clairement distincts pour la chaîne lourde de la dynéine 2 impliquée dans l'IFT sont dans le génome. Ces gènes sont appelés *DHC2.1* et *DHC2.2*. La protéine DHC2.1 est présente à la base du flagelle et montre un transport intraflagellaire à la fois dans le sens antérograde et rétrograde, visible lors d'un marquage endogène avec une protéine GFP (Buisson et al., 2013). L'inhibition de l'autre chaîne lourde de la dynéine (DHC2.2) par ARNi inhibe la formation du flagelle (Kohl et al., 2003), et une analyse préliminaire au microscope électronique a indiqué la présence de flagelles courts contenant du matériel dense aux électrons, qui pourrait bien être typique des défauts de transport rétrograde (Absalon et al., 2008b).

En 2014, Thierry Blisnick a étudié le rôle de quatre composants distincts du complexe dynéine IFT chez le trypanosome (Blisnick et al., 2014). Au contraire des kinésines, les deux chaînes lourdes, DHC2.1 et DHC2.2 se révèlent toutes deux essentielles pour le transport rétrograde (Figure 21). Les données d'immunoprécipitation indiquent qu'elles forment un hétérodimère, un fait unique pour les dynéines IFT ainsi que pour tous les autres complexes dynéines qui se déplacent. Ces

données sont à mettre en perspective avec les données structurales de Toporova qui montre que les deux chaînes ne sont pas organisées de façon symétrique (Toporova et al., 2019). Thierry Blisnick a également indiqué qu'une concentration de toutes les sous-unités de dynéines à la base du flagelle était visible en fluorescence.

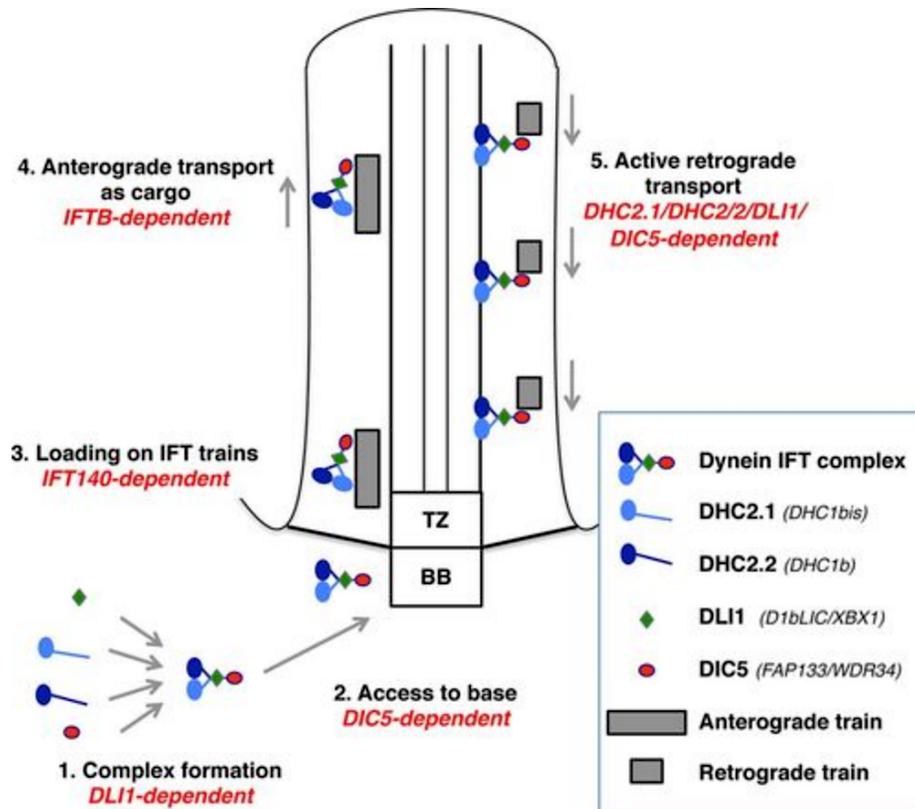


Figure 21 : Modèle pour la formation et la fonction du complexe dynéine.

1) Les sous-unités de la dynéine sont assemblées dans le cytoplasme pour former le complexe dynéine IFT. Cette étape repose sur les quatre sous-unités mais plus spécifiquement sur DLI1.
 2) Le complexe dynéine IFT atteint la base du flagelle. Cette étape dépend de la présence de DIC5.
 3) Le complexe dynéine est chargé sur les trains IFT de manière dépendante de l'IFT140 (ou du complexe IFT-A complet).
 4) Le complexe dynéine est une cargaison du train antérograde et est transporté jusqu'à la pointe de l'axonème. Cela repose sur le transport antérograde et donc sur le moteur kinésine (non dessiné).
 5) Les trains rétrogrades sont renvoyés à la base du flagelle. Un complexe dynéine IFT intact est nécessaire, car l'épuisement de l'un de ses composants est suffisant pour abolir l'IFT rétrograde. BB : corps basal; TZ : zone de transition (Blisnick et al., 2014).

3.4. Les protéines IFT

a) Deux complexes

Les trains IFT ont été purifiés à partir de flagelles isolés de *Chlamydomonas* (Cole et al., 1998) (Piperno et al., 1998). Les trains IFT sont constitués de **deux complexes** chacun composé de plusieurs protéines IFT individuelles (Figure 22). Les complexes IFT-A et IFT-B peuvent être séparés par centrifugation sur gradient de densité de saccharose (les deux complexes migrent à environ 16S, mais sous une augmentation de la force ionique, le complexe B sédimente plus lentement, permettant leur séparation). Les nombreuses sous-unités des complexes IFT ont été nommées en fonction de leur poids moléculaire (Cole et al., 1998).

- le complexe IFT-A contient : IFT144, **IFT140**, **IFT139**, **IFT122**, IFT121 et IFT43
- le complexe IFT-B contient : **IFT172**, **IFT88**, **IFT81**, IFT80, IFT74, IFT70, IFT57, IFT56, IFT54, IFT52, IFT46, IFT38, IFT27, IFT25, IFT22 et IFT20

Les propriétés biochimiques et les fonctions biologiques de ces sous-unités IFT sont diverses, c'est pourquoi je me concentrerai uniquement sur les protéines IFT pertinentes dans le cadre de mon travail de thèse (indiquées en gras).

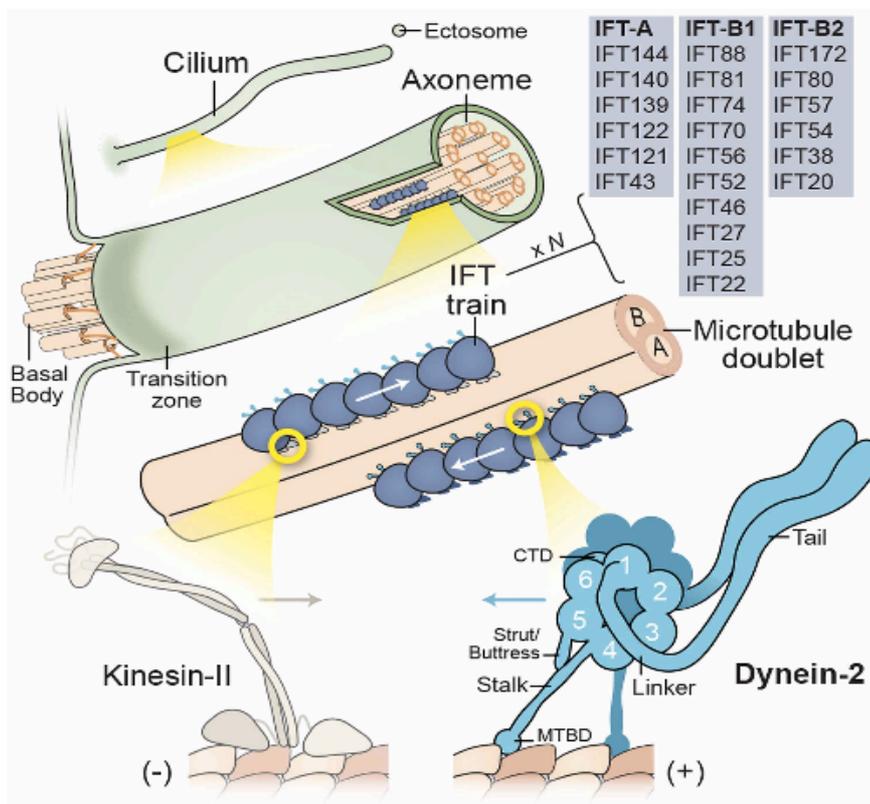


Figure 22 : Moteurs moléculaires et protéines IFT

Les moteurs moléculaires (Kinésine-II et Dynein-2) et les protéines IFT forment les trains IFT. Il existe 22 protéines IFT : 6 protéines IFT-A et 16 protéines IFT-B (Webb et al., 2020).

La perturbation des protéines IFT-B entraîne l'absence de cil ou la présence de cils considérablement raccourcis (Brazelton et al., 2001) (Hou et al., 2007), ce qui est comparable aux mutants kinésine II précédemment décrits chez la souris ou d'autres espèces (Nonaka et al., 1998; Walther et al., 1994). L'inhibition des membres du complexe IFT-A entraîne des cils mal formés avec des renflements proéminents contenant des accumulations de protéines IFT, rappelant les mutations précédemment décrites de la dynéine IFT (Pazour et al., 1998; Piperno et al., 1998) (Signor et al., 1999a).

Ces découvertes ont conduit à l'idée que les complexes IFT-B et IFT-A sont spécifiquement et respectivement impliqués dans le transport antérograde et rétrograde.

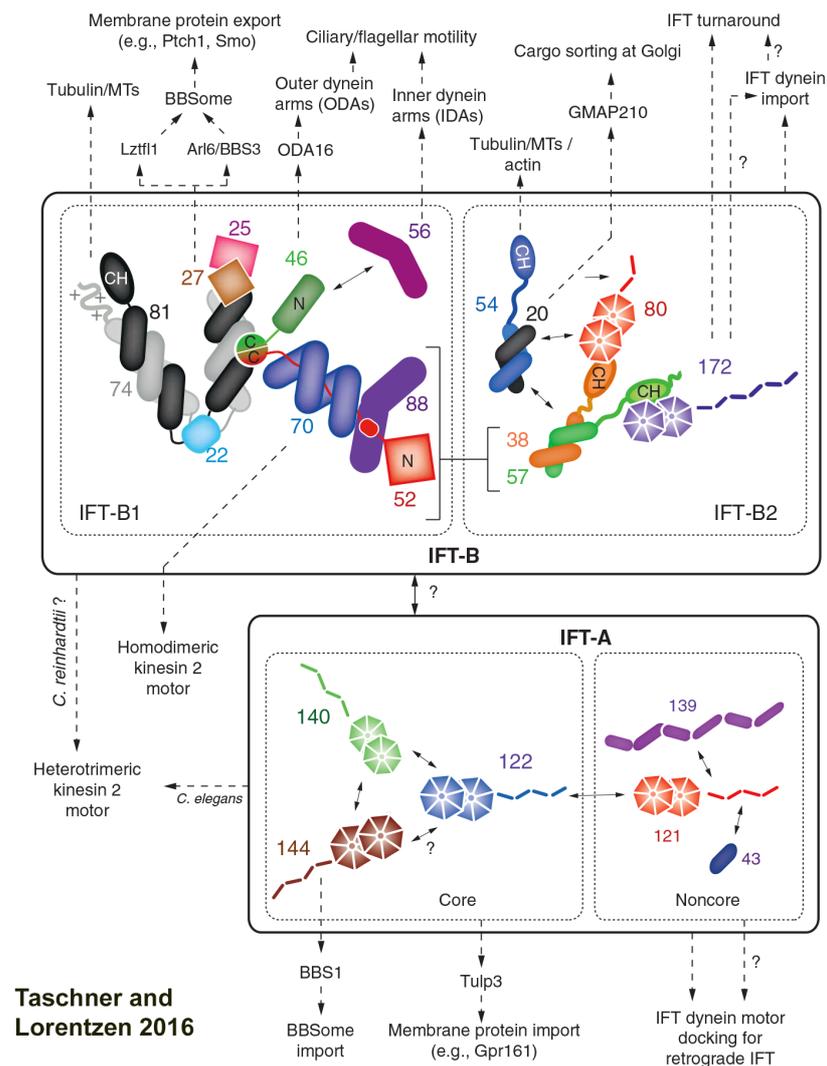


Figure 23 : Les complexes IFT-A et IFT-B

Représentation schématique des complexes IFT-A et IFT-B chez *C. reinhardtii*. Les interactions directes entre protéines IFT sont représentées avec des lignes continues et les interactions indirectes représentées par les lignes pointillées (Taschner and Lorentzen, 2016).

Les membres du complexe IFT-A, à l'exception de l'IFT43, sont de grandes protéines avec des masses moléculaires supérieures à 120 kDa. Les protéines de l'IFT-B sont plus petites et sont réparties en deux sous-complexes IFT-B1 et IFT-B2. L'IFT-B1, composé de 10 protéines, forme le noyau central (*core*), et IFT-B2 est composé de 6

protéines dites périphériques (Figure 23). L'ensemble de ces gènes sont conservés chez la presque totalité des espèces flagellées (van Dam et al., 2013) et leur absence affecte la formation des cils et flagelles.

Seules deux exceptions sont connues :

- Chez *Plasmodium*, il n'y a pas de gène *IFT*. Le flagelle des gamétocytes est assemblé dans le corps cellulaire puis expulsé (processus d'exflagellation) (Briggs et al., 2004).
- Chez la drosophile, les spermatozoïdes ne sont pas formés par l'IFT. Lorsque les gènes *IFT* sont mutés, les spermatozoïdes ne sont pas affectés, probablement parce qu'ils sont formés dans un syncytium et ne s'individualisent que plus tard en cours de maturation. Toutefois, les cils sensoriels sont fortement affectés (Han et al., 2003) (Sarpal et al., 2003).

Chez le trypanosome, les protéines des complexes IFT-A et IFT-B ont été étudiées par Sabrina Absalon en 2008 (Absalon et al., 2008b). En utilisant l'extinction par ARNi, elle a démontré que les protéines du complexe B (IFT20, IFT38, IFT52, IFT56, IFT57, IFT70, IFT88 et IFT172) sont indispensables à la formation du flagelle. En effet, lorsque l'expression de l'une de ces protéines est inhibée, la cellule ne construit pas de nouveau flagelle ou en présente un très court. Dans le cas des protéines du complexe A (IFT121, IFT122, IFT140, IFT144), un flagelle court est assemblé avec une accumulation de protéines IFT au bout distal. Ces observations permettent de prouver que chacune de ces protéines issues du complexe B et du complexe A sont essentielles à l'IFT, mais les rôles et interactions entre ces deux complexes restent à découvrir.

b) Les protéines IFT-B

Les protéines IFT-B sont caractérisées par la présence de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine (WD40, TPR). Parmi les protéines du complexe B, nous avons utilisé l'IFT172, l'IFT81 et l'IFT88 pour les raisons décrites ci-dessous.

L'**IFT172** est la plus grande protéine IFT connue (Cole et al., 1998) (Pruski et al., 2019). L'IFT172 purifiée a une architecture de deux domaines globulaires avec une longue protrusion en forme de bâtonnet (Wang et al., 2018). L'IFT172 est une protéine périphérique du complexe IFT-B. Elle fait partie du complexe IFT-B2 et est essentielle pour la cillogénèse dans un large éventail d'organismes dont *Chlamydomonas*, *C. elegans*, ou le trypanosome. L'IFT172 est une protéine qui interagit directement avec l'IFT57 et avec la membrane ciliaire avec la capacité de remodeler de grandes membranes en petites vésicules. L'IFT172 est particulièrement intéressante car elle interagit avec le moteur dynéine (Pedersen et al., 2006). Les mutations de l'IFT172 ont été découvertes comme cause des syndromes de Jeune et Mainzer-Saldino dans une cohorte de patients atteints de ciliopathies (Halbritter et al., 2013).

L'**IFT81** fait partie du cœur du complexe IFT-B1 et interagit avec la tubuline ce qui rend son étude particulièrement intéressante dans l'exploration de la formation du cil. Elle possède un domaine d'homologie à la calponine qui est capable de lier la tubuline *in vitro* en association avec IFT74 et assure le transport intraflagellaire de la tubuline à la pointe distale du flagelle (Bhogaraju et al., 2013).

L'**IFT88** est une protéine de 90kDa qui interagit avec IFT52 et IFT70. L'IFT88 est la toute première protéine IFT à avoir été découverte, ce qui a engendré un engouement pour l'étude de l'IFT (Pazour et al., 2000). L'orthologue de l'IFT88 chez les mammifères (Tg737) est mutée chez la souris ORPK (Oak Ridge Polycystic Kidney), un modèle de référence pour étudier la polykystose rénale autosomique récessive (Moyer et al., 1994). Les cils sont plus courts et des défauts de fonctionnement des polycystines associées aux cils rénaux sont observés. Le lien entre l'IFT et la polykystose rénale a provoqué une augmentation significative des recherches sur le transport intraflagellaire. L'IFT88 est impliquée dans l'assemblage des cils des cellules rénales (Pazour et al., 2000), dans la détermination de l'asymétrie gauche-droite (Murcia et al., 2000) mais aussi dans le fonctionnement de la synapse immunologique (Finetti et al., 2009).

c) Les protéines IFT-A

Plusieurs études par coimmuno-précipitation chez *Chlamydomonas* ou chez des cellules mammifères en culture ont révélé l'existence d'un noyau IFT-A comprenant IFT144 (*fla15*), IFT140 et IFT122 alors que les protéines IFT139 (*fla17*), IFT121 et IFT43 sont des protéines périphériques (Mukhopadhyay et al., 2010) (Behal et al., 2012) (Hirano et al., 2017).

Les protéines du complexe IFTA étaient peu étudiées jusqu'aux années 2000 alors que 158 articles portant sur l'IFT-A ont été publiés ces trois dernières années, ce qui montre l'intérêt scientifique récent pour ce complexe. L'ensemble des gènes IFT-A est connu (Figure 24). Les 6 protéines de l'IFT-A portent toutes des domaines protéiques différents.

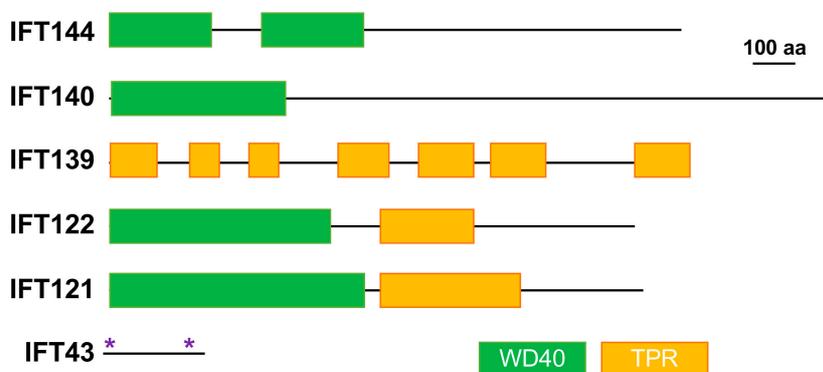


Figure 24 : Tableau représentant les 6 gènes du complexe IFT-A (Fait par Philippe Bastin)

Les domaines protéiques des protéines IFT-A sont représentés en vert (WD40) et en jaune (TPR, *tetratricopeptide domain*). Les deux étoiles indiquent des domaines qui ne sont pas structurés. Ces domaines sont très dynamiques et peuvent adopter différentes configurations.

La protéine **IFT140** est la protéine la plus étudiée du complexe IFT-A. Elle est une protéine du noyau (ou cœur) central du complexe-A. L'IFT140 est en interaction avec l'IFT122 et l'IFT144. Elle contient une hélice β à l'extrémité N-terminale, suivie d'une autre hélice β et différents domaines d'interactions protéine-protéine comme WD40 (Figure 25).

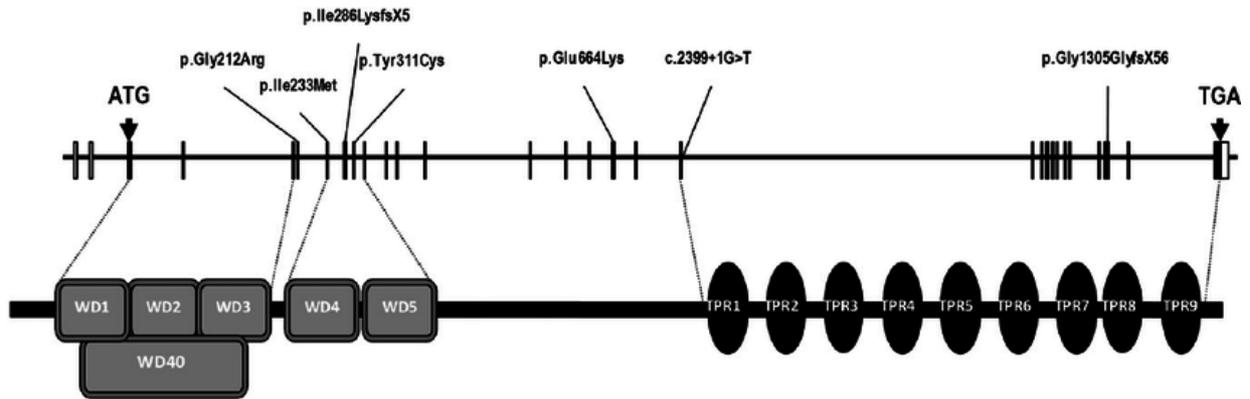


Figure 25 : Structure de la protéine IFT140

Organisation de la séquence protéique d'IFT140 (Perrault et al., 2012). Les différentes mutations observées chez les patients atteints de Mainzer-Saldino sont indiquées en haut de la figure.

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 et al., 2008).

Chez *T. brucei*, des études réalisées par Sabrina Absalon et Thierry Blisnick ont montré que son extinction par ARNi conduit à la formation de courts flagelles boursoufflés qui possèdent une accumulation de la protéine IFT172, indicateur d'un défaut au niveau du transport rétrograde (Figure 26). Après 3 jours d'induction, une accumulation d'IFT-B a été mise en évidence dans le flagelle du trypanosome (Figure 26A). Cette accumulation pourrait suggérer que l'IFT-A joue un rôle dans le recyclage des trains IFT.

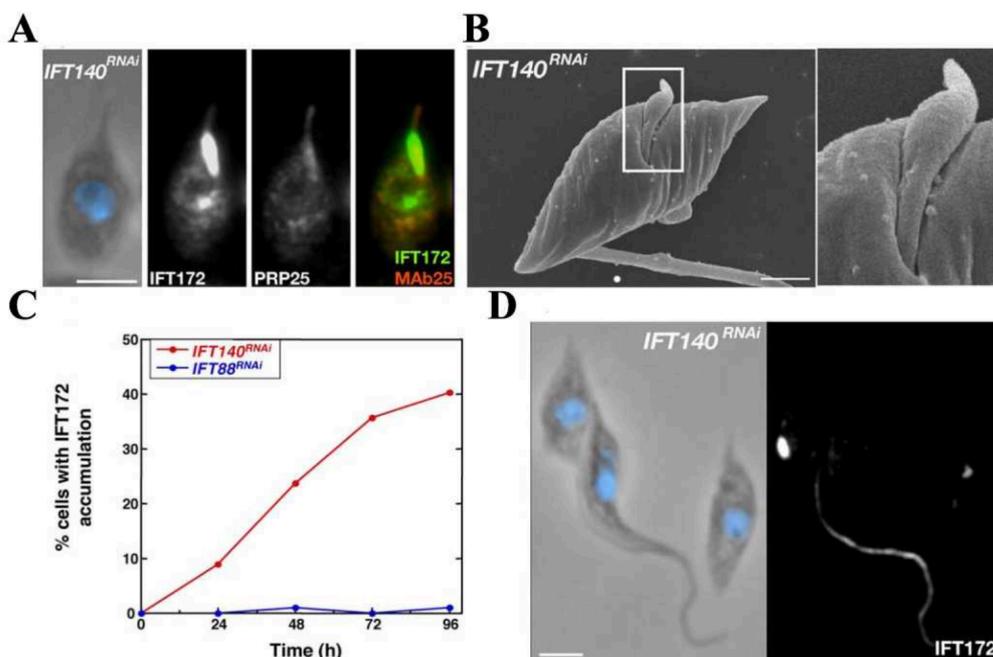


Figure 26 : L'IFT140 chez le trypanosome.

Cellule *IFT140^{RNAi}* induite pendant 3 jours présentant un petit flagelle (A). La cellule est marquée avec un antisérum anti-IFT172 (vert) et avec mAb25 qui reconnaît une protéine de l'axonème (rouge). L'ADN est marqué avec du DAPI (bleu). Image d'une cellule *IFT140^{RNAi}* induite pendant 3 jours et observée au

microscope à balayage (B). Le flagelle est court et dilaté. Barre d'échelle, 1 μm . Quantification du nombre de cellules présentant une accumulation de la protéine IFT-B, IFT172 au cours de l'ARNi dans les lignées cellulaires indiquées (C). Après 3 jours d'induction, un champ de cellules *IFT140^{RNAi}* est montré (D). Seul le nouveau flagelle est trop court et présente une dilatation due à l'accumulation des protéines IFT172. Les cellules ont été marquées avec l'antisérum anti-IFT172 (blanc) et avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle 5 μm . (Absalon et al., 2008a)

Différentes études visant à comprendre le rôle de l'IFT-A dans le transport intraflagellaire ont été effectuées, principalement chez *Chlamydomonas* et *C. elegans*. L'inhibition des IFT-A se traduit en général par la formation de petits flagelles avec une accumulation de protéines IFT-B au bout distal.

Chez *Chlamydomonas*, des flagelles très courts sont observés lorsque IFT121 a été mutée (Behal et al., 2012). Chez *C. elegans*, des phénotypes similaires ont été observés lorsque les protéines IFT139/IFT43 sont mutées (Yi et al., 2017).

Est-ce que ce phénotype est dû au fait que les protéines ciblées sont des protéines périphériques du complexe A ? Une hypothèse serait que sans les protéines périphériques de petits complexes peuvent se former quand même.

En 2017, Bing Zhu et collègues ont étudié le rôle de l'IFT-A dans le transport intraflagellaire chez *Chlamydomonas* (Zhu et al 2017). Ils ont analysé des mutants de tous les gènes *IFT-A* (Figure 27), y compris pour les protéines du cœur et de la périphérie du complexe A. Ils ont démontré que l'IFT43 interagit directement avec IFT121 et que la perte d'IFT43 entraîne une instabilité de l'IFT-A. Chez *Chlamydomonas*, Zhu a fourni des preuves des interactions directes au sein du complexe IFT-A et montré que l'intégrité de l'IFT-A est importante pour sa stabilité et sa localisation cellulaire. Pour terminer, il a prouvé que l'IFT43 et l'IFT140 sont impliquées dans la mobilisation des précurseurs ciliaires du pool cytoplasmique au cours de la régénération flagellaire, ce qui suggère que l'IFT-A est impliquée dans le transport des composants ciliaires dans le cytoplasme vers la région péri-basale du corps.

Chez *Chlamydomonas*, IFT139 est codée par le gène *FLA17*. Une mutation de l'IFT139 entraîne une diminution de la vitesse des particules IFT rétrogrades, une diminution de la concentration de protéines IFT-A dans les flagelles et la formation d'un renflement flagellaire caractéristique contenant des protéines IFT-B (Iomini et al., 2009). L'IFT139 est une protéine périphérique du complexe IFT-A et interagit avec l'IFT121. Jordan et ses collègues ont analysé un autre mutant de l'IFT139. Lors d'une étude par cryo-microscopie électronique, ils précisent que IFT139 serait impliquée dans le transport rétrograde uniquement et serait non essentielle car dans cette étude, lorsque cette protéine est mutée, les flagelles ne sont pas impactés au niveau de leur longueur. D'après les données de spectrométrie de masse (Jordan et al., 2018), il reste de la protéine IFT139 dans les flagelles de ce mutant, de même qu'environ 10% des autres protéines IFT-A. Chez ce mutant, 3 exons sont absents mais il n'y a pas de perte de la phase de lecture, il s'agit donc d'une délétion interne. La protéine tronquée est bien présente mais en quantité réduite. La nature de la mutation n'est donc pas connue contrairement à l'étude faite par Iomini, ce qui peut expliquer les différences de phénotypes observés (Jordan et al., 2018).

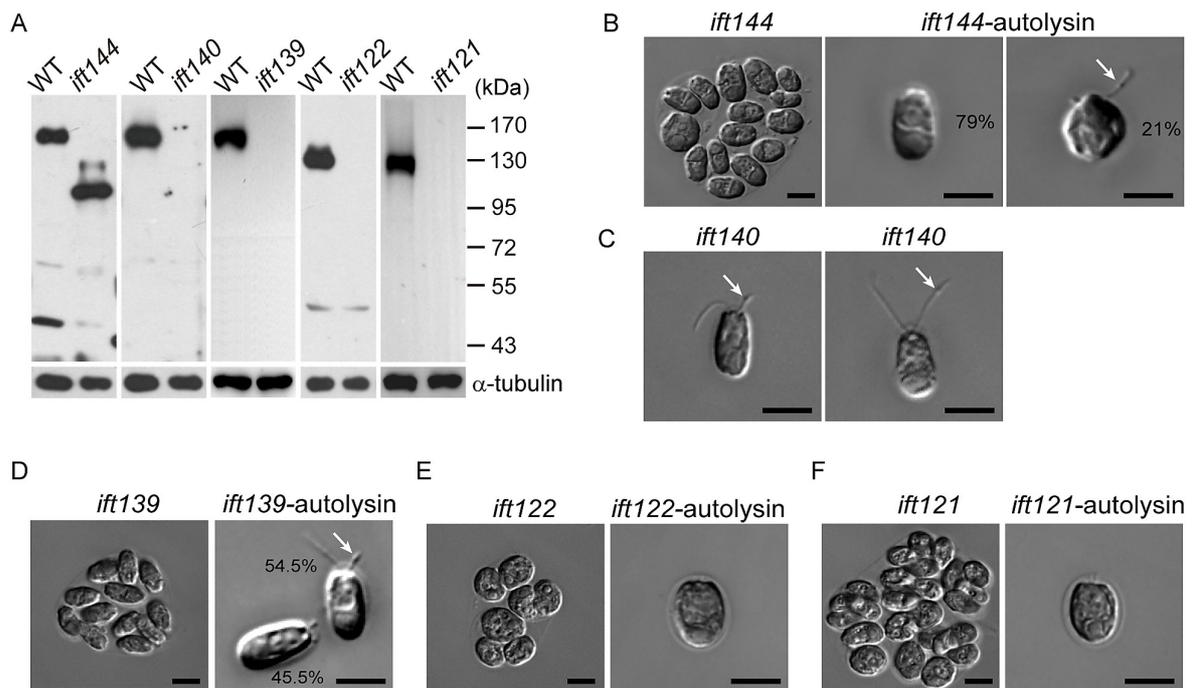


Figure 27 : Caractérisation des mutants IFT-A.

Les mutants IFT-A indiqués ont été analysés par immunoblot de lysats de cellules entières avec des cellules de type sauvage (WT) comme contrôle (A). Les transferts ont été sondés avec un anticorps contre chaque protéine IFT-A individuelle. Images DIC de cellules de différents mutants (B-F). Mutant *ift144* (B). Mutant *ift140* (C). Mutant *ift139* (D). Mutant *ift122* (E). Mutant *ift121* (F). Les flèches indiquent les renflements flagellaires. Barre d'échelle = 5 μ m. Les phénotypes flagellaires de chaque mutant sont représentés : certains ne font plus de flagelles du tout et d'autres en font encore à des degrés divers. (Zhu et al., 2017).

Picariello a étudié un mutant chez *Chlamydomonas* prédit comme nul pour la protéine FT140 (Picariello et al., 2019). La mutation n'a eu aucun effet sur l'IFT-B mais a déstabilisé l'IFT-A, empêchant l'assemblage des flagelles. Si les IFT-A ne servent qu'au transport rétrograde, pourquoi avons-nous ce phénotype ? L'assemblage de l'IFT-A nécessite l'IFT140. Une mutation partielle de l'IFT140, qui entraîne la perte des répétitions WD N-terminales de la protéine, a relativement sauvé l'IFT et soutenu la formation de flagelles plus courts mais qui contenaient des niveaux normaux d'IFT-B dans le flagelle et des quantités considérablement réduites d'IFT-A. Les axonèmes de ces flagelles avaient une ultrastructure d'apparence normale et, comme étudié par SDS-PAGE, une composition normale. Par contre, la composition de la membrane flagellaire était anormale. L'analyse de cette fraction par spectrométrie de masse a révélé des diminutions de l'abondance des petites GTPases et des protéines de signalisation cellulaire. Ainsi, IFT-A est spécialisé dans l'importation de protéines associées aux membranes. Des niveaux anormaux de ces derniers sont susceptibles d'expliquer les multiples phénotypes des patients présentant des anomalies de l'IFT140. Une hypothèse peut être qu'une faible quantité de protéine IFT-A permet au flagelle d'être assemblé alors que si l'IFT-A est absent, le flagelle ne peut pas être assemblé.

Chez *Chlamydomonas*, Tyler Picariello et ses collègues ont montré que l'IFT-A voyage toujours avec l'IFT-B ce qui est une preuve que tous les trains IFT sont composés d'IFT-A et d'IFT-B chez *Chlamydomonas* (Picariello et al., 2019). Ils ont

utilisé une souche qui exprime l'IFT140 marquée par la GFP et l'IFT20 (membre du complexe IFT-B) marquée par la mCherry. En observant les deux protéines fluorescentes simultanément, ils ont démontré que les signaux fluorescents vert et rouge co-localisaient au niveau de chaque train (Figure 28).

Est-ce que ce résultat peut être transposable à d'autres organismes sachant que chez le xénope, Toriyama a vu que le cœur de l'IFT-A pouvait voyager sans au moins une des sous-unités de l'IFT-B ? Chez des mutants de protéines de la zone de transition, ils ont observé des défauts de signalisation et de polarité planaire (Toriyama et al., 2016). En recherchant les protéines IFT présentes dans le flagelle, ils ont mis en évidence que 3 protéines du cœur du complexe A voyagent dans les cils sans l'IFT38, une protéine du complexe B.

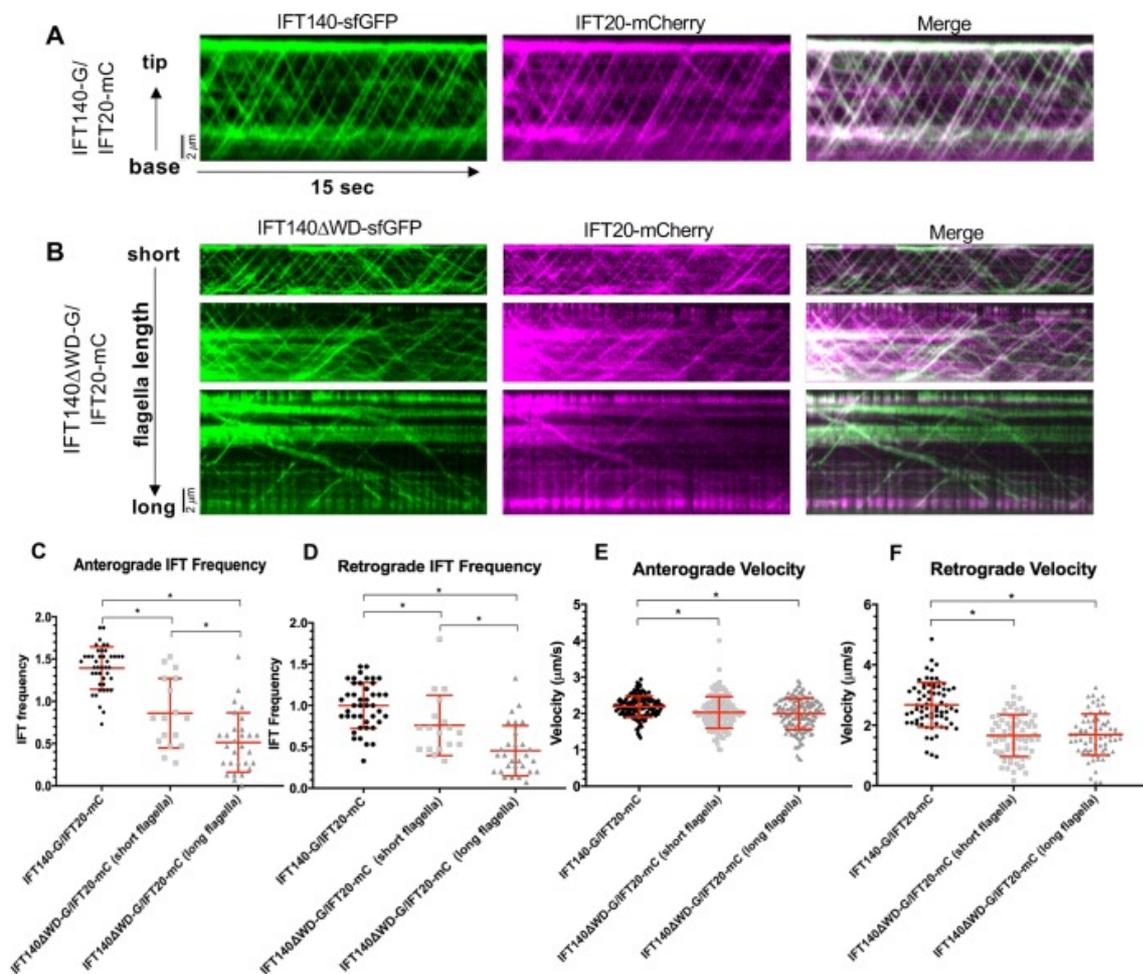


Figure 28 : Étude du rôle d'IFT140 chez *Chlamydomonas*

Kymographes montrant IFT antérograde et rétrograde pour IFT140 couplée à la sfGFP (vert) et IFT20 couplée à la mCherry (magenta) dans des cellules témoins (A). Kymographes montrant l'IFT antérograde et rétrograde sur une gamme de longueurs flagellaires dans les cellules mutées IFT140 (B). Diagrammes montrant la fréquence des trains IFT antérogrades et rétrogrades sur les cellules contrôles, avec de courts flagelles puis avec de longs flagelles. Dans l'ensemble, la fréquence IFT est diminuée dans les flagelles de la souche mutante. La fréquence est plus faible dans les flagelles longs par rapport aux courts (C, D). (E, F) Diagrammes montrant la vitesse des trains IFT antérogrades et rétrogrades (E, F). La vitesse IFT rétrograde est considérablement affectée par la mutation de l'IFT140 quelle que soit la longueur des flagelles observés. Les flagelles définis comme courts étaient $\leq 3\mu\text{m}$; les flagelles longs étaient $> 3\mu\text{m}$ (Picariello et al., 2019).

Chez l'Homme, différentes études récentes montrent le rôle important de l'IFT140 dans l'organisme. Il existe plusieurs ciliopathies liées à des mutations des protéines de l'IFT-A entraînant des symptômes différents. Les ciliopathies sont les suivantes :

- **Syndrome Mainzer-Saldino** : malformations osseuses (Figure 29), lésions rénales, dystrophie rétinienne (mutations affectant l'*IFT140* mais aussi l'*IFT172*)



Figure 29 : Manifestations clinique et radiologique d'un individu présentant un syndrome Mainzer-Saldino

Conséquences de certaines mutations d'*IFT140* (Perrault et al., 2012). Le syndrome de Mainzer-Saldino est caractérisé par l'association d'une maladie rénale, d'une dystrophie pigmentaire de la rétine, d'une ataxie cérébelleuse et d'une dysplasie osseuse.

- **Jeune (dysplasie thoracique asphyxiante)** : Dystrophie des côtes avec petit thorax, raccourcissement des os longs, polydactylie, dystrophie rétinienne, atteintes rénale et hépatique progressives (mutations affectant les gènes *IFT140* ou *IFT139*)
- **Syndrome acrocalleux de Senior-Løken** : Polydactylie, agénésie du corps calleux, dysmorphie faciale, Trouble visuel, néphronoptise (mutation affectant l'*IFT144*)
- **Sensenbrenner (dysplasie cranio-ectodermique)** : Raccourcissement des membres, un allongement du crâne, défauts ectodermiques affectant les cheveux, dents et ongles, insuffisance rénale, malformation hépatique – (mutation affectant les gènes *IFT122*, *IFT121*, *IFT43*)

Une publication de Chenyang Zhang montre le rôle de l'IFT dans le développement osseux chez l'homme. Les résultats de cette étude ont montré que, par rapport à de nombreux tissus mous, l'ARNm de *IFT140* était fortement exprimé dans les os (Zhang et al., 2019). Une autre étude de Xiong Wang montre le rôle de l'*IFT140* dans la fertilité. Deux mutations ponctuelles d'*IFT140* ont provoqué un dysfonctionnement des spermatozoïdes et une infertilité masculine (Wang et al., 2019).

Il est important de souligner le fait que les ciliopathies citées impliquent une mutation dans des gènes de l'IFT-A mais aucune n'est prédite d'être nulle. Aucun patient sans cil n'a été recensé (Perrault et al., 2012). Chez la souris, tous les KO d'*IFT-A* (Miller, 2013) ou d'*IFT-B* (Huangfu et al., 2003) meurent au cours du

développement. La seule exception décrite portait sur des souris KO d'IFT25 ou d'IFT27 qui meurent à la naissance (Keady et al., 2012) (Eguether et al., 2014). Ce constat suggère que l'IFT-A joue probablement un rôle essentiel dans l'IFT.

3.5. Les Trains IFT

Keith Kozminski, lors de la découverte de l'IFT avait défini les particules IFT comme des structures denses aux électrons situées entre les microtubules et la membrane flagellaire. Cette définition fait toujours autorité et plusieurs travaux ont mis en lumière la structure des trains et donnent des indications précieuses quant à leur mode de construction.

En 2009, Gaia Pigino a redéfini la structure des particules IFT en tomographie électronique (Pigino et al., 2009). Les particules étant véhiculées par les moteurs moléculaires le long de microtubules qui peuvent s'apparenter à des rails, le terme de « trains » IFT a été proposé au lieu de particules IFT. Les flagelles de *Chlamydomonas* ont été observés après préparation sur un support solide. Ils glissent de tout leur long sur le support et ont été fixés directement dessus. Cette propriété de glissement a pour intérêt de pouvoir inclure les cellules à plat (par « *flat embedding* ») et de positionner les flagelles dans l'orientation souhaitée avant de les sectionner par ultramicrotomie. Grâce à cette approche, il est possible d'obtenir une grande portion de flagelle dans une même coupe épaisse ($\cong 100$ nm). Par tomographie électronique, elle a observé deux types de trains de longueur différente. Certains trains ont une longueur d'environ 700 nm pour 80 nm de largeur et 25 nm de hauteur, tandis que d'autres trains ont une longueur avoisinant les 250 nm pour 50 nm de largeur et 20 nm de hauteur (Figure 30).

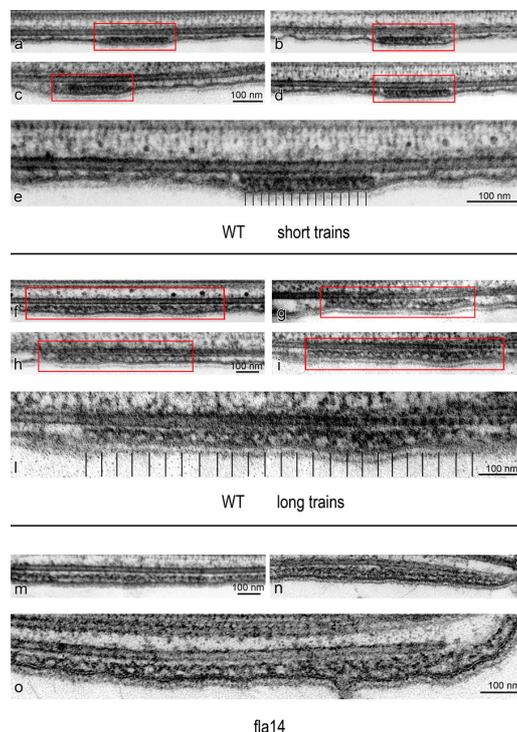


Figure 30 : Deux types de trains observés chez *Chlamydomonas*

Deux types des trains IFT sont mis en évidence par microscopie électronique : des trains compacts et courts (a -e) et des trains longs (f - j) dans la souche sauvage de *Chlamydomonas*. Trains observés sur le mutant *fla14*. Ils ont une structure semblable aux trains long, en forme de zigzag. (m-o) (Pigino et al., 2009).

Dans cette publication, la discrimination entre les trains antérogrades et rétrograde a été basée sur les résultats obtenus avec le mutant *fla14*, qui présente une mutation du gène *LC8*, une sous-unité de la dynéine IFT (Pazour et al., 1998). Les auteurs observent que les trains accumulés dans le flagelle du mutant *fla14* ont la même structure que les trains longs peu compacts du WT. Comme cette mutation impacte le transport rétrograde, ils en ont déduit que les trains longs et peu compacts seraient les trains antérogrades et que dès lors, les trains les plus courts seraient les trains rétrogrades.

En 2016, cette interprétation a été remise en question par de nouveaux résultats basés sur la mise au point d'une technique de microscopie corrélative combinant microscopie photonique et électronique (Stepanek et al 2016). Stepanek et ses collègues ont fixé des cellules exprimant GFP-IFT27 pendant l'observation au microscope photonique à l'aide d'un système de seringue pour ajouter le fixateur chimique. Ce vrai tour de force a permis de comparer les positionnements des trains issus des kymographes des vidéos avec les structures denses observées en microscopie en transmission (Figure 31, gauche). Cette méthode a permis de différencier les trains antérogrades et rétrogrades en fonction de leur direction puis de lier cette information à la structure des trains. Plus précisément, l'avantage de cette méthode corrélative est de pouvoir discriminer sans ambiguïté les trains antérogrades et rétrogrades directement sur des cellules vivantes et d'observer la structure de ces mêmes trains en microscopie électronique (Figure 31, droite).

Étonnamment, trois catégories de trains ont été mises en évidence dans cette étude : les trains antérogrades et les trains rétrogrades qui étaient attendus, mais aussi une nouvelle catégorie de trains dits stationnaires a été décrite. Les trains antérogrades ont une longueur de 233 nm et les trains rétrogrades ont une longueur de 209 nm alors que les trains stationnaires sont de plus grande taille, 650 nm de long. Les trains stationnaires sont donc plus longs que les trains antérogrades et rétrogrades. Les trains antérogrades sont compacts et très denses aux électrons par rapport aux trains rétrogrades et stationnaires. Les trains stationnaires correspondent aux trains les plus long et moins compacts avec une structure répétitive. Les kymographes permettent de faire un lien avec ces observations. Ces résultats révisent donc l'interprétation de la première publication de 2009.

Les kymographes ont permis de déterminer la position des trains sur le flagelle et la microscopie électronique a permis de préciser la localisation des trains au niveau des doublets de microtubules. Il a été démontré que les trains antérogrades voyagent sur les microtubules B et les trains rétrogrades sur les microtubules A. Il a été mis en évidence que les trains IFT observés se croisent mais qu'aucune collision n'est observée.

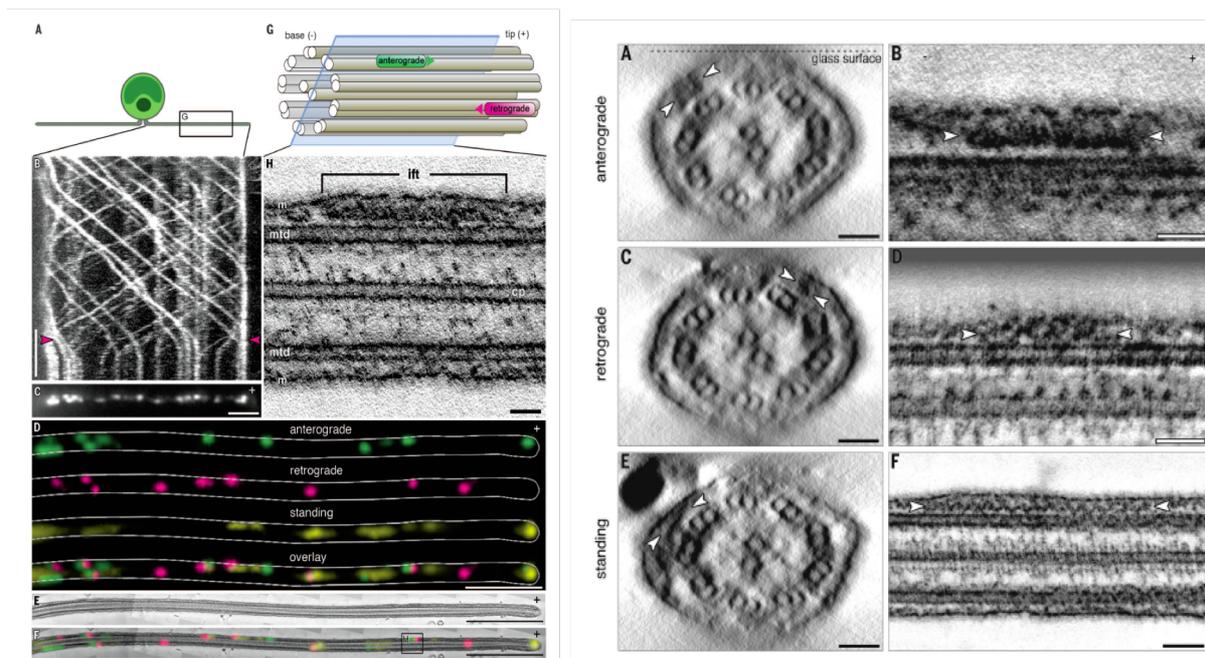


Figure 31 : Morphologie des trains antérogrades, rétrogrades et stationnaires.

Figure de gauche : Représentation illustrée du positionnement du flagelle de *Chlamydomonas* sur un support solide (A). Kymographe représentant le trajet des trains marqués avec IFT27-GFP dans le flagelle, les têtes de flèche magenta montrent le moment de la fixation chimique lors de l'acquisition (B). L'image de microscopie obtenue en fin de fixation présente la position des trains IFT le long du flagelle (C) et les trains IFT ont été annotés en fonction d'un code couleur : antérogrades, vert ; rétrogrades, magenta ; stationnaires, jaune (D).

Figure de droite : Vues transversales et longitudinales de tomographie électronique des trains IFT observés par catégorie : antérogrades (A-B), rétrogrades (C-D) et stationnaires (E-F). Les structures sont différentes. Les trains antérogrades sont compacts et très denses aux électrons (B), les trains rétrogrades sont moins compacts (D) et les trains stationnaires sont plus longs (F) (Stepanek and Pigino, 2016).

En 2018, la structure des trains IFT a été révélée en détail dans une nouvelle publication du groupe de Gaia Pigino (Jordan et al., 2018). Pour déterminer la composition des trains IFT chez *Chlamydomonas*, les cellules ont été cryo-fixées directement après avoir été déposées sur des grilles de microscopie électronique. Ensuite, une technique de microscopie électronique 3D a été utilisée : le *subtomogram averaging* (STA) (Castano-Diez and Zanetti, 2019; Zhang, 2019). Plusieurs « sous-volumes » issus de cryo-tomogrammes d'une même structure sont moyennés pour obtenir des reconstructions 3D mieux résolues, qui peuvent atteindre l'ordre de l'Angström. En moyennant les cryo-tomogrammes de trains IFT issus des différents mutants, ils ont pu discriminer les structures manquantes et ainsi attribuer les structures des trains de la souche sauvage à un composant (IFT-A, IFT-B ou dynéine). Jordan et ses collègues ont utilisé différents mutants IFTA, IFT-B et dynéine pour comparer les structures des trains résultant des mutants par rapport aux trains de la souche sauvage. De cette façon, ils ont pu définir un ratio de chaque composant. Les positions et les proportions de chaque composant au sein des trains IFT antérogrades ont été établies (Figure 32). Un train IFT est composé d'un ratio de dynéine : IFT-B : IFTA de 2 : 8 : 4.

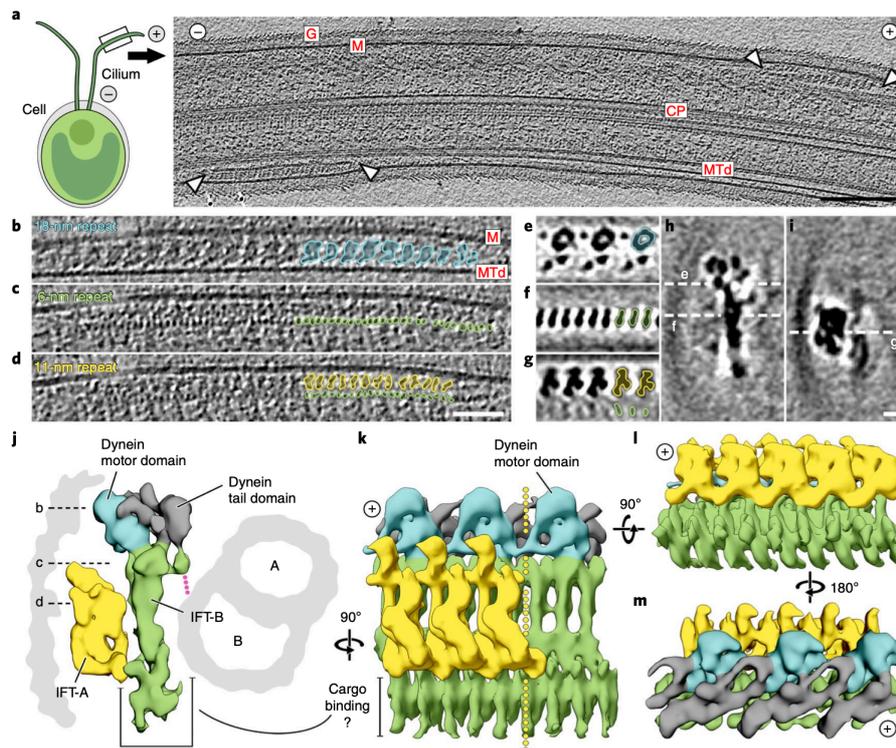


Figure 32 : Structure des trains IFT.

Trois structures répétitives sont présentes dans les trains IFT et illustrées en bleu, jaune et vert. En utilisant des mutants dynéine et IFT-A (IFT-139), les structures répétitives ont pu être attribuées respectivement à la dynéine, l'IFT-A et l'IFT-B (Jordan et al., 2018).

La dynéine change de conformation entre les trains antérogrades et rétrogrades. Lorsqu'elle est associée à un train antérograde, la dynéine est repliée et adopte une configuration inactive. De plus, elle est orientée vers la membrane (et donc pas vers les microtubules). Dans un train rétrograde, la dynéine est active, sous forme « ouverte » et orientée vers les microtubules pour véhiculer les trains vers la base du cil. Le phénomène qui permet d'initier le changement de conformation est pour le moment inconnu.

Une information importante de la publication concerne le complexe IFT-A. Cette étude suggère que l'IFT-A est un cargo des trains antérogrades et participerait à la stabilité de ces trains. Une mutation de l'IFT139, une protéine de l'IFT-A impacte la structure des trains antérogrades qui apparaissent plus petits. La longueur moyenne des trains IFT est de 193nm, ce qui est plus petit que les trains de 312nm observés dans la souche contrôle. Ces petits trains sont également très déstructurés. D'après les données de spectrométrie de masse présentées sur les figures supplémentaires de la publication, il reste 10 à 15% de chaque protéine du complexe A dans les flagelles purifiés.

En tenant compte que les IFT-A sont moins abondantes que les IFT-B (Lechtreck et al., 2009) leur proportion restant détectable en spectrométrie de masse est non négligeable (Figure 33).

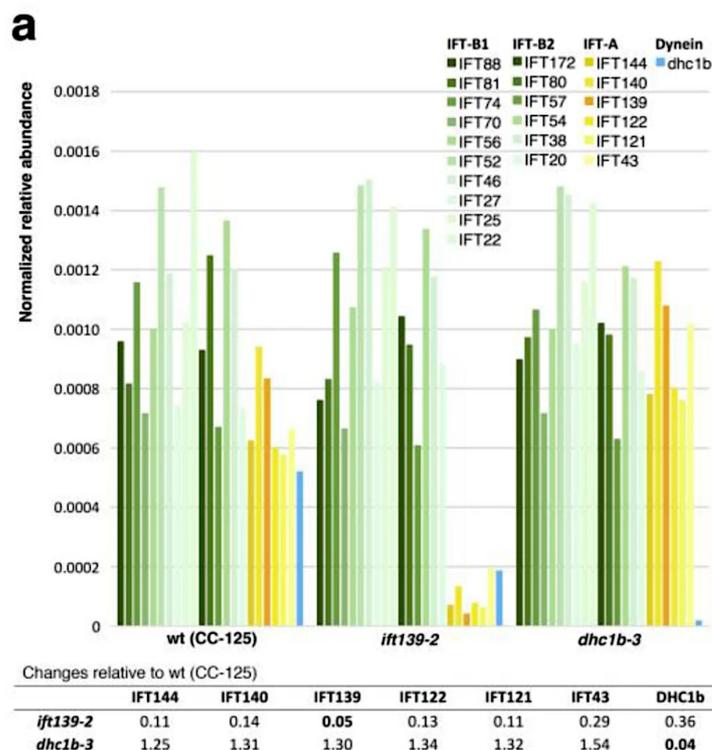


Figure 33 : Composition des flagelles des souche mutantes *ift139-2* et *dhc1b-3*

La spectrométrie de masse montre une réduction de toutes les protéines IFT-A chez le mutant *ift139-2* et de la chaîne lourde dynéine DHC1b chez le mutant *dhc1b-3*. Les valeurs de chaque échantillon ont été normalisées à la quantité totale de protéines IFT-B pour faciliter une comparaison directe des protéines IFT-A et IFT-B. Les valeurs ont été divisées par le poids moléculaire des protéines. Dans le mutant *ift139-2*, la quantité d'IFT139 a été réduite à 5% par rapport à la souche sauvage. Les autres protéines IFT-A ont été réduites de 10-30%. La quantité de dynéine DHC1b a été réduite à 36%, expliquant la présence de certains trains IFT constitués uniquement d'IFT-B (Lechtreck et al., 2009).

Le rôle de l'IFT-A dans l'assemblage des trains reste donc à approfondir. L'IFT-A est souvent considéré comme un acteur du transport rétrograde mais son rôle dans la formation des trains antérogrades est peut-être sous-estimé. L'ensemble des travaux portant sur la composition des trains IFT ont été récemment repris dans une revue écrite par Webb (Webb et al., 2020) (Figure 34). Les éléments de composition des trains antérogrades et rétrogrades sont les moteurs moléculaires kinésine, dynéine et les complexes A et B. Les trains antérogrades sont véhiculés par la kinésine et la dynéine est inactive. La dynéine est transportée et n'interagit pas avec les microtubules. Dans le sens rétrograde la dynéine change de conformation et véhicule les trains IFT du bout distal à la base des flagelles.

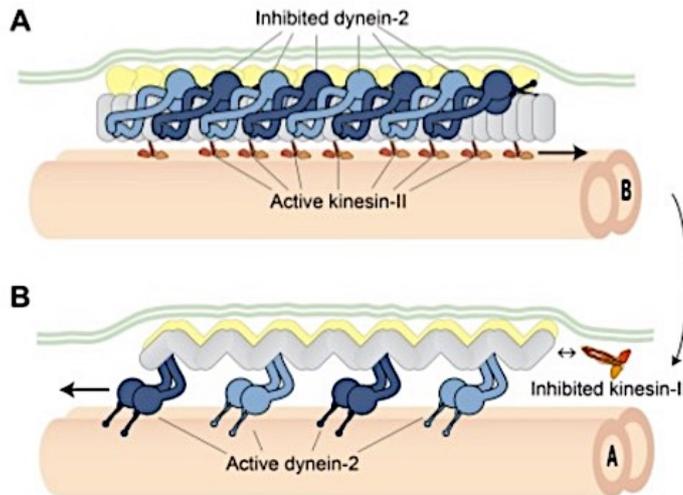


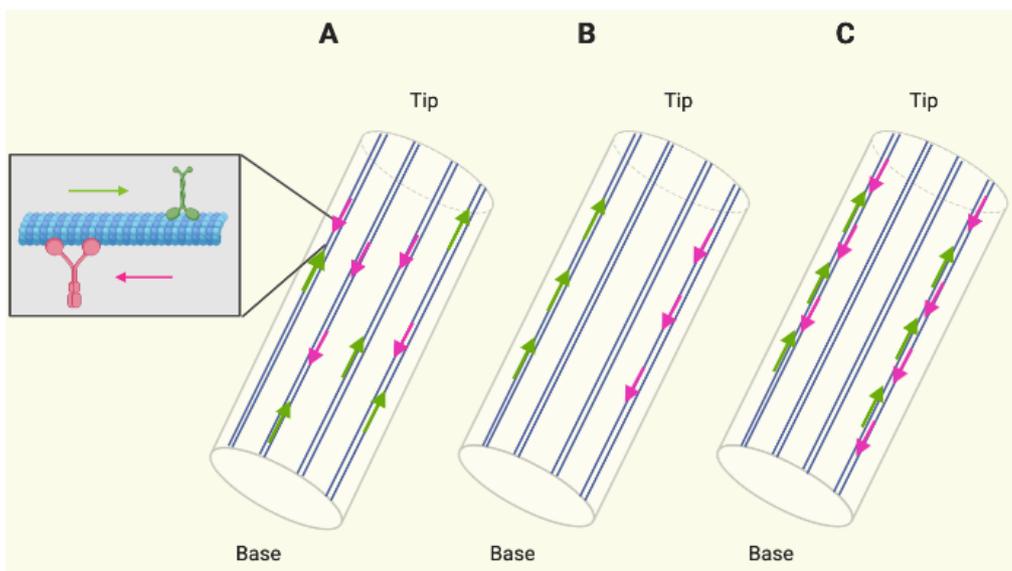
Figure 34 : Les trains IFT et ses acteurs.

Le changement de conformation de la dynéine entre le transport antérograde et rétrograde est visible sur ces schémas. (A) La dynéine 2 (en bleu) est transportée par les trains antérogrades. Le complexe IFT-A est représenté en jaune et le complexe IFT-B est représenté en gris.(B) la dynéine véhicule les trains rétrogrades (Webb et al., 2020).

QUESTIONS

Durant ma thèse, je me suis focalisée principalement sur deux questions scientifiques portant sur le mode de fonctionnement de l'IFT. Dans un premier temps, j'ai travaillé sur la recherche des voies de transport utilisées par les trains IFT. Dans un second temps, je me suis intéressée à la formation et à la composition des trains IFT.

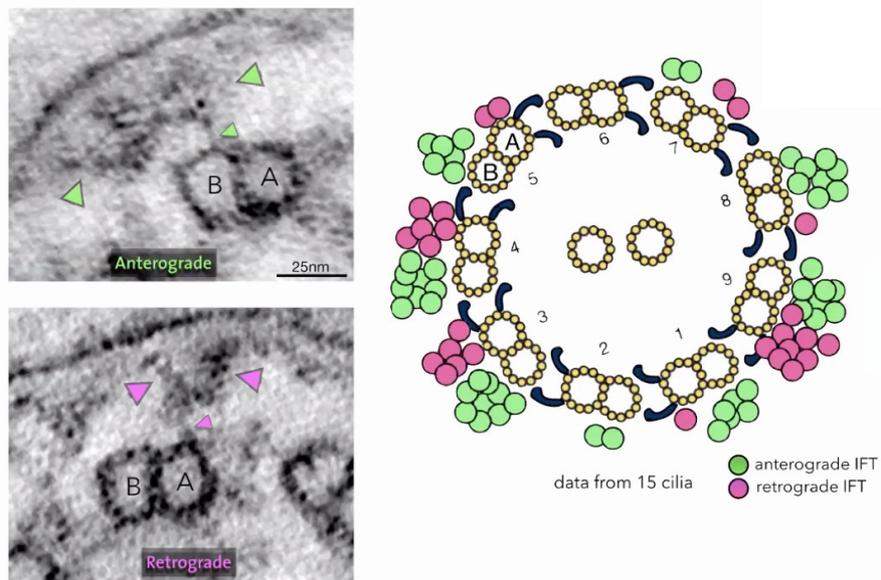
Le transport intraflagellaire (IFT) a été visualisé pour la première fois par microscopie à contraste interférentiel sous forme de particules se déplaçant le long des flagelles de l'algue verte *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1993) (Kozminski, 2012). Depuis cette découverte, les différents acteurs du transport intraflagellaire ont été décrits. Ces particules ont été renommées « trains IFT » et sont composées de protéines IFT (sous forme de deux complexes, les IFT-A et IFT-B) et de moteurs moléculaires qui assurent leurs déplacements. Les trains IFT avancent le long des microtubules qui servent donc de rails. Théoriquement, si l'on considère qu'un microtubule peut accueillir un seul train, 18 rails sont possibles (car 9 doublets de microtubules) pour que les trains se déplacent. Selon les espèces, les trains se déplacent dans le sens antérograde à une vitesse de 0,5-3 $\mu\text{m/s}$ et dans le sens rétrograde à 1-5 $\mu\text{m/s}$ avec une fréquence de 1 à 3 trains par seconde (Buisson et al., 2013). Le trafic est à la fois dense et rapide, mais les événements de collisions sont extrêmement rares. Comment sont donc gérés les deux types de transport au sein du flagelle ? Où les trains IFT sont-ils localisés ? Plus précisément, quelles voies sont utilisées selon le type de transport antérograde ou rétrograde ? La première hypothèse qui se dégage est que les trains antérogrades comme rétrogrades peuvent se déplacer sur n'importe quel microtubule (Figure_Hypothèses 1A). Comme les trains sont fins ($\approx 30\text{nm}$ d'épaisseur), ils pourraient s'éviter en marchant sur des régions différentes des microtubules. Cette hypothèse est la plus simple car aucune régulation particulière ne serait requise. Ensuite, on pourrait imaginer qu'il existe des doublets de microtubules spécifiquement utilisés par les trains antérogrades et d'autres pour les rétrogrades (Figure_Hypothèses 1B). Enfin, les trains antérogrades pourraient se déplacer sur un microtubule de n'importe quel doublet et les trains rétrogrades pourraient utiliser l'autre microtubule du même doublet (Figure_Hypothèses 1C).



Figure_Hypothèses 1 : Les voies de transport des trains IFT.

Les trois hypothèses A, B et C sont représentées schématiquement, seulement 4 doublets de microtubules sont représentés pour plus de clarté. Les flèches vertes indiquent les trains antérogrades et les flèches roses les trains rétrogrades.

En 2016, une première publication a montré le positionnement des trains IFT le long de l'axonème chez *Chlamydomonas* (Stepanek and Pigino, 2016). Cette étude réalisée par microscopie corrélative révèle que les trains antérogrades marchent sur le microtubule B et les rétrogrades se déplacent sur le microtubule A. Les microtubules B servent donc de rails à l'aller et les A au retour. Lors des journées « Cils, Flagelles et Centrosomes » organisées par le GDR Cil à Saint Paul de Nice (10-12 octobre 2017), Gaia Pigino a discuté de ses résultats et a précisé que les trains IFT ont été observés sur 8 des 9 doublets de microtubules, avec toutefois une sous-représentation au niveau des doublets 2 et 7 (Figures_Hypothèses 2). Il faut néanmoins prendre en compte le fait que lors de ces observations, le flagelle de *Chlamydomonas* glisse sur un support, ce qui facilite l'observation en microscopie photonique mais peut induire un biais sur la position ou le mouvement des trains. Les trains pourraient être arrêtés parce qu'ils sont perturbés par le contexte environnemental. En effet, il faut tenir compte des contraintes physiques liées à la position des trains IFT qui sont entre les microtubules et la membrane flagellaire et du fait que les trains véhiculent des protéines membranaires qui pourraient interagir avec le support.



Figure_Hypothèse 2 : Voies de transports utilisés par les trains IFT.

Les trains IFT antérogrades ont été représentés en vert et se déplacent exclusivement sur les tubules B. Les trains IFT rétrogrades ont été représentés en rose et sont présents exclusivement sur les tubules A (Présentation en visioconférence de Gaia Pigino lors du symposium : Collaborative Computational Project for Electron cryo-Microscopy 2020, twitter #CCPEM).

Ce travail suggère que la répartition des trains IFT est spécifique entre les tubules A et B mais que la répartition des trains au niveau des doublets de microtubules est aléatoire dans le flagelle chez *Chlamydomonas*. A partir de l'étude de ce seul cas, peut-on généraliser à l'ensemble des cellules ciliées ?

Question 1 : Où sont localisés les trains IFT chez *Trypanosoma brucei* ?

Nous avons utilisé le trypanosome comme modèle cellulaire pour plusieurs raisons. Premièrement, pour pouvoir comparer la situation chez deux espèces différentes où l'IFT a été bien caractérisé aussi bien en cellules vivantes qu'en microscopie électronique : *Chlamydomonas* et *Trypanosoma*. Deuxièmement, le trypanosome offre

des caractéristiques biologiques particulièrement utiles : son flagelle a une structure extra-axonémale, la PFR qui nous permet d'identifier aisément et sans ambiguïté les doublets de microtubules et de les numéroter avec précision de 1 à 9 (Sherwin and Gull, 1989b), contrairement aux cils de cellules humaines (ou autres mammifères) ou de *C. elegans*.

Pour localiser les trains IFT chez le trypanosome, il faut les observer dans un contexte structural à une résolution suffisante pour pouvoir distinguer les doublets de microtubules. Pour discriminer les trains antérogrades des trains rétrogrades, il faut également pouvoir établir le sens de déplacement des trains IFT le long de l'axonème. La solution idéale aurait été d'utiliser la microscopie corrélative, alliant microscopie photonique et électronique, en combinant l'aspect structural à la direction des trains IFT (Stepanek and Pigino, 2016). L'organisation tridimensionnelle du flagelle du trypanosome autour du corps cellulaire rend difficile l'observation de portion de flagelle suffisamment longues en microscopie photonique et électronique. De plus, contrairement à *Chlamydomonas* dont le flagelle glisse sur des surfaces planes, il est difficile d'immobiliser le flagelle du trypanosome pour l'observation en microscopie photonique avant fixation et de conserver l'organisation structurale pour la microscopie électronique. Comme nous n'avons pas encore de solution satisfaisante pour concilier microscopie électronique et photonique, nous avons fait le choix d'étudier les voies de transport IFT en deux temps. Premièrement, nous localiserons les trains IFT en microscopie électronique en trois dimensions et deuxièmement nous analyserons les types de transport (antérograde ou rétrograde) utilisés par les trains sur cellules vivantes grâce à des marqueurs fluorescents en microscopie à haute résolution.

La microscopie électronique en transmission conventionnelle utilise des coupes de ≈ 70 nm à ≈ 250 nm d'épaisseur pour obtenir une très haute résolution et des informations ultrastructurales précises, mais ne permet pas d'appréhender la répartition des trains IFT sur toute la longueur d'un flagelle qui mesure ≈ 20 μ m. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers une technique de microscopie électronique tridimensionnelle pouvant analyser de grands volumes : le FIB-SEM, pour « Focused Ion Beam – Scanning Electron Microscopy » (Narayan and Subramaniam, 2015). Ce type de microscopie révolutionnaire repose sur l'utilisation de deux faisceaux : un faisceau ionique permet d'abréger l'échantillon tandis qu'un faisceau électronique assure l'acquisition des images. L'utilisation simultanée de ces deux faisceaux permet de collecter des séries d'images qui une fois alignées forment un volume qui peut atteindre plusieurs micromètres, offrant une résolution isotropique de quelques dizaines de nanomètres (Narayan et al., 2014). L'axonème faisant ≈ 20 μ m, il contient en théorie une vingtaine de trains (antérogrades et rétrogrades) dont la taille a été estimée entre ≈ 250 et 400 nm de long (Buisson et al., 2013). Ces données ont été obtenues sur la base de films en microscopie photonique dont la résolution est limitée. Le FIB-SEM a permis de définir la position des trains IFT, leur taille et leur répartition le long du flagelle. Les voies utilisées par les trains IFT ont été mises en évidence sur deux faces opposées de l'axonème mais nous n'avons pas pu différencier les trains antérogrades et rétrogrades. Le diamètre de l'axonème étant de ≈ 180 nm et les voies de transports identifiées se trouvant aux extrêmes opposés, nous avons choisi une méthode de microscopie photonique de haute résolution pour observer les sens de déplacement des trains IFT sur cellules vivantes. Pour avoir la résolution la plus élevée possible, nous utiliserons un objectif avec une large ouverture numérique ($NA=1.57$) pour résoudre le diamètre de l'axonème et voir si les trains utilisent un côté de l'axonème pour se déplacer de la base vers le bout distal et l'autre voie de transport

pour revenir à la base, ou si les deux côtés sont utilisés à la fois pour le transport antérograde et rétrograde (Figure_Hypothèses 1B et 1C).

En plus de ce travail réalisé sur cellules en culture de la forme procyclique du parasite, nous avons étudié le positionnement des trains après les remaniements du flagelle observés lorsque le trypanosome adopte différentes configurations lors d'une infection. Dans le cardia de mouches tsé-tsé infectées, *T. brucei* assemble des flagelles allant de 3 à 30 μm (Rotureau and Van Den Abbeele, 2013). Tenant compte de cette hétérogénéité naturelle de longueur de flagelle dans le cardia, nous avons souhaité observer l'IFT dans ces trypanosomes en FIB-SEM. Plus précisément, où sont situés les trains IFT dans les différents stades des parasites de la mouche ? En microscopie électronique, la difficulté est de pouvoir localiser les parasites dans le cardia afin d'abraser précisément la zone d'intérêt dans l'organe et pouvoir réaliser une série d'images des parasites. Nous avons développé une approche de microscopie corrélative combinant l'observation de coupes semi-fines du cardia avec la microscopie électronique. Les coupes semi-fines de 1 μm d'épaisseur contrastées au bleu de toluidine permettront d'identifier la région d'intérêt où sont concentrés les trypanosomes et de cibler cette zone pour l'abrasion. Nous pourrons ensuite comparer les résultats obtenus avec nos observations faites sur les trypanosomes au stade procyclique et voir si le positionnement des trains IFT peut varier en fonction des stades parasitaires.

Question 2 : Comment les trains IFT antérogrades sont-ils construits ?

Les trains IFT sont composés des protéines IFT et des moteurs moléculaires. Leur organisation a été définie précisément en biologie structurale grâce à la cryo-microscopie électronique (Jordan et al., 2018). Bien que les éléments de composition des trains IFT soit connus, il n'y a pas de preuve formelle que tous les trains IFT aient une composition équivalente. Par exemple, il y a au moins deux catégories de trains antérogrades dans certains cils sensoriels de *C. elegans* (Snow et al., 2004). Il est donc possible qu'il existe des trains de composition différente. Les trains IFT antérogrades et rétrogrades peuvent également varier en terme de longueur ou de vitesses (Buisson et al., 2013) (Jordan et al., 2018).

Il est plausible que tous les trains soient composés d'IFT-A, d'IFT-B, de kinésine II et de dynéine2, mais les moyens d'études sont limités vu que les trains se désassemblent dès qu'on lyse la membrane du flagelle (Cole et al., 1998). L'imagerie des trains est donc la seule approche possible pour déchiffrer leur composition, soit en mouvement en microscopie photonique sur cellules vivantes, soit après fixation rapide et microscopie électronique (Jordan et al., 2018).

Chez le trypanosome, aucune étude n'a prouvé formellement que les trains IFT étaient composés des quatre éléments traditionnels. Je commencerai donc par observer si tous les trains antérogrades chez le trypanosome sont composés de dynéine, IFT-A et IFT-B.

Comment se fait-il que dans le cytoplasme, il n'y a pas d'événement de transport de train IFT alors que tous les composants sont présents ?

Ceci amène la deuxième question de ma thèse.

Quel sont les rôles de l'IFT-A, l'IFT-B et de la dynéine dans la formation des trains ?

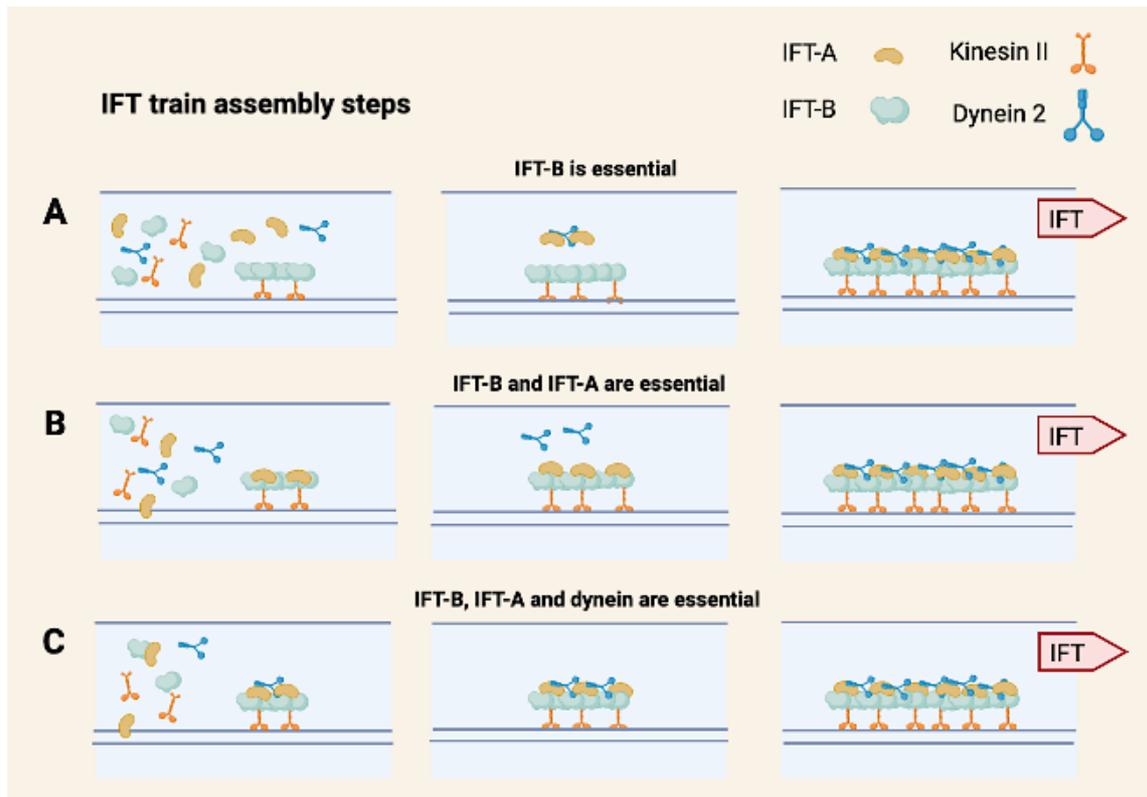
Trois hypothèses sont envisagées (Figure_Hypothèse 3):

(A) Seul l'IFT-B serait essentiel et l'IFT-A et la dynéine seraient des cargos des trains antérogrades (Figure_Hypothèse 3A). Cette hypothèse est largement répandue dans la littérature (Webb et al., 2020). Comme le rôle de l'IFT-A est fréquemment associé à la dynéine et au transport rétrograde, ce modèle suggère que l'IFT-A et la dynéine sont des cargos des trains antérogrades (Jordan et al., 2018). Cette hypothèse implique que les trains peuvent être formés uniquement avec des multimères de l'IFT-B (étape 1) puis que l'IFT-A et la dynéine sont ajoutés sous forme de cargos (étape 2) pour former le train IFT qui voyagera dans l'axonème (étape 3). Cette hypothèse expliquerait les phénotypes sévères qui ont été observés lorsque l'IFT-B est ciblé (KO, mutation ou ARNi). En effet, les cils et flagelles ne sont plus construits, que ce soit par exemple chez *Chlamydomonas* (Pazour et al., 2000), chez la souris (Huangfu et al., 2003), la paramécie (Shi et al., 2018), ou le trypanosome (Kohl et al., 2003) (Absalon et al., 2008b). Dans ces situations où l'IFT-B est ciblé, il est important de rappeler qu'il n'y a pas de preuve formelle que l'absence de flagelle est due à l'absence de trains IFT. On pourrait imaginer que l'IFT est essentiel pour d'autres fonctions que le transport comme par exemple la rentrée d'éléments structuraux du flagelle comme la tubuline.

(B) La seconde hypothèse est que l'IFT-A serait un constituant essentiel avec l'IFT-B pour former un train et que seule la dynéine serait un cargo (Figure_Hypothèse 3B). Pour polymériser et former des trains, les complexes IFT-B doivent être associés aux complexes IFT-A. La dynéine serait ajoutée en tant que cargo pour former les trains IFT complets. La dynéine ne participerait pas à la construction des trains mais serait uniquement requise pour le recyclage de leurs composants lors du déplacement rétrograde. Cette hypothèse expliquerait les observations faites sur certains mutants de l'IFT-A chez *Chlamydomonas*. Par exemple, lors de la perte d'IFT140, IFT122 ou IFT144, les cellules ne présentent pas de flagelle, ce qui suggère qu'il n'y a plus de trains IFT (Zhu et al., 2017).

La majorité des études montre que lorsqu'on perturbe l'IFT-A, on induit un phénotype de défaut de transport rétrograde : les flagelles sont très courts et boursoufflés avec une accumulation au bout distal de protéines du complexe B. On remarquera que ces études sont basées sur des déplétions par ARNi, par exemple d'IFT140 chez le trypanosome (Absalon et al., 2008a) ou d'IFT139 chez la paramécie (Shi et al., 2018), ou de mutations relativement discrètes par exemple d'IFT140 chez *Chlamydomonas* (Picariello et al., 2019) (Zhu et al., 2017) ou chez des patients humains (Perrault et al., 2012). Dans tous ces cas, la quantité de protéine fonctionnelle est réduite mais n'est pas nulle. Une faible quantité d'IFT-A reste détectable. Est-ce que le fait que la quantité d'IFT-A soit faible mais non nulle pourrait expliquer que les trains soient partiellement assemblés mais ne puissent pas transporter la dynéine ?

(C) Une dernière hypothèse est que les complexes A et B ainsi que les moteurs seraient tous essentiels pour la construction des trains (Figure_Hypothèse 3C). Les moteurs pourraient participer à la formation du train, la dynéine en tant qu'élément structural et la kinésine via son activité motrice. Si un de ces éléments était absent, les trains ne seraient pas assemblés. Dans cette hypothèse, l'IFT-A, l'IFT-B et la dynéine sont associés directement puis le train se déplace dans l'axonème.



Figure_Hypothèse 3 : Construction des trains IFT

La construction d'un train IFT est représentée selon les hypothèses A, B et C dans lesquelles un ou plusieurs composants sont essentiels (voir texte pour détails).

Le trypanosome est un organisme modèle idéal pour répondre à ces questions. Son flagelle étant maintenu même lorsque l'IFT est arrêté (Fort et al., 2016), nous allons inhiber via ARNi inductible l'expression de diverses composantes du train et examiner l'impact sur l'assemblage des trains. Ceci serait difficilement réalisable chez d'autres espèces où l'arrêt de l'IFT s'accompagne de la perte des cils et flagelles comme par exemple chez *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1995).

Pour voir si et comment la quantité de protéines IFT régule la construction des trains antérogrades, nous avons choisi de diminuer la quantité d'IFT-B ou d'IFT-A par ARNi indépendamment. Nous avons choisi de cibler deux protéines : l'IFT88 et l'IFT140 qui sont deux protéines essentielles du cœur des complexes B et A (respectivement). Pour suivre l'impact de ces déplétions sur l'IFT et la formation des trains, nous allons coupler IFT140, l'IFT81 et la DHC2.1 à des marqueurs fluorescents. Nous avons choisi l'IFT140 en tant que protéine du cœur du complexe A, l'IFT81 car elle est essentielle au transport de la tubuline et bien caractérisée au laboratoire (Bhogaraju et al., 2013) (Fort et al., 2016) (Bertiaux et al., 2018b) et DHC2.1 comme marqueur d'une des deux chaînes lourdes de la dynéine IFT (Blisnick et al., 2014). Grâce à ces différents marquages en fluorescence, nous pourrions ainsi observer en microscopie photonique l'impact de la diminution d'IFT-A ou d'IFT-B dans le flagelle du trypanosome. Sur cellules vivantes, il sera possible de voir si les trains circulent, et de quantifier leur fréquence et leur vitesse. Il sera également possible de voir leur composition grâce à des marquages indépendants de composants des complexes IFT-A, IFT-B et dynéine. Nous pourrions voir d'une part si les trains sont fonctionnels, c'est à dire, s'ils peuvent se déplacer normalement le long de l'axonème, et d'autre

part si leur composition change en fonction de la diminution de la quantité d'IFT-A ou d'IFT-B. Pour obtenir des informations sur la structure des trains IFT, leur positionnement et leur longueur en fonction de la quantité résiduelle d'IFT140, nous utiliserons le FIB-SEM. Nous chercherons à obtenir des informations sur la morphologie, la position et la longueur des trains. Ces deux approches de microscopie combinant aspects structuraux et composition moléculaire des trains IFT nous aideront à comprendre la contribution des complexes IFT-B et IFT-A dans la construction des trains.

Nous avons également cherché à savoir si la kinésine contribue à la construction des trains. La kinésine étant très difficile à coupler à un marqueur fluorescent (6 tentatives infructueuses au laboratoire, Morga et al., non publié), nous n'avons pas pu l'étudier directement. Toutefois, nous utiliserons l'ARNi pour diminuer la quantité des kinésines 2A et 2B dans la cellule (Bertiaux et al., 2018b) et regarder l'impact sur la quantité de trains antérogrades dans le flagelle par microscopie photonique sur cellules vivantes et la longueur de ces trains IFT au moyen de FIB-SEM.

L'ensemble des résultats devrait permettre de déterminer la contribution des différents composants des trains à leur construction.

RESULTATS

La localisation du transport intraflagellaire

Bidirectional intraflagellar transport is restricted to two sets of microtubule doublets in the trypanosome flagellum.

Bertiaux E*, Mallet A*, Fort C, Blisnick T, Bonnefoy S, Jung J, Lemos M, Marco S, Vaughan S, Trépout S, Tinevez JY, Bastin P.

J Cell Biol. 2018 Dec 3;217(12):4284-4297. doi: 10.1083/jcb.201805030. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30275108

* Contribution équivalente

Résumé : Le transport intraflagellaire (IFT) est le mouvement bidirectionnel rapide de grands complexes protéiques entraînés par des moteurs de type kinésine et dynéine le long des doublets de microtubules des cils et flagelles. Nous avons utilisé une combinaison de microscopie électronique et photonique à haute résolution pour étudier comment et où ces trains IFT se déplacent dans le flagelle du protiste *Trypanosoma brucei*. L'analyse par microscopie électronique à trois dimensions (FIB-SEM) de trypanosomes du stade procyclique a montré que les trains se retrouvent presque exclusivement le long de deux séries de doublets (3-4 et 7-8) et se répartissent en deux catégories selon leur longueur. L'imagerie à haute résolution sur cellules vivantes exprimant mNG::IFT81 ou GFP::IFT52 a révélé pour la première fois un trafic IFT bidirectionnel sur deux voies parallèles dans le flagelle. Les trains IFT antérogrades et rétrogrades circulent sur chacune de ces lignes. À l'extrémité distale, un grand train IFT antérograde individuel est converti en plusieurs trains rétrogrades plus petits en l'espace de 3-4 s tout en repartant du même côté de l'axonème.

Contribution :

Le travail portant sur les voies du transport intraflagellaire avait été initié par Cécile Fort en 2013 et cette étude a été finalisée en 2018. Ma contribution a été de faire les préparations, acquisitions, segmentations et films des données de FIB-SEM. J'ai également fait l'acquisition de vidéos de cellules exprimant la GFP::DHC2.2 à haute résolution et l'analyse des kymographes associés. J'ai également contribué à l'analyse des kymographes des cellules exprimant la mNG::IFT81 avec Eloïse Bertiaux.

ARTICLE

Bidirectional intraflagellar transport is restricted to two sets of microtubule doublets in the trypanosome flagellum

Eloïse Bertiaux^{1,2*}, Adeline Mallet^{1,2,3*}, Cécile Fort^{1,2}, Thierry Blisnick¹, Serge Bonnefoy¹, Jamin Jung¹, Moara Lemos¹, Sergio Marco^{4,5}, Sue Vaughan⁶, Sylvain Trépoût^{4,5}, Jean-Yves Tinevez^{7,8}, and Philippe Bastin¹ 

Intraflagellar transport (IFT) is the rapid bidirectional movement of large protein complexes driven by kinesin and dynein motors along microtubule doublets of cilia and flagella. In this study, we used a combination of high-resolution electron and light microscopy to investigate how and where these IFT trains move within the flagellum of the protist *Trypanosoma brucei*. Focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) analysis of trypanosomes showed that trains are found almost exclusively along two sets of doublets (3–4 and 7–8) and distribute in two categories according to their length. High-resolution live imaging of cells expressing mNeonGreen::IFT81 or GFP::IFT52 revealed for the first time IFT trafficking on two parallel lines within the flagellum. Anterograde and retrograde IFT occurs on each of these lines. At the distal end, a large individual anterograde IFT train is converted in several smaller retrograde trains in the space of 3–4 s while remaining on the same side of the axoneme.

Introduction

Intraflagellar transport (IFT) is the movement of molecular motors and multiprotein complexes that carry tubulin and other flagellar components to the tip of cilia and flagella for assembly (Kozminski et al., 1993; Craft et al., 2015). One or more kinesin motors are responsible for anterograde transport, whereas a dynein motor returns the trains to the base during retrograde transport (Prevo et al., 2017). These moving protein complexes have been termed IFT trains (Pigino et al., 2009). Absence of IFT prevents construction of most cilia and flagella, whereas perturbation of IFT components can impact on the structure and function of the organelle as observed in multiple human genetic diseases (Beales et al., 2007; Dagoneau et al., 2009; Perrault et al., 2012; Halbritter et al., 2013).

Quantification of IFT in animal cells, green algae, trypanosomes, or ciliates revealed a remarkably high speed (0.5–5 μm/s) and frequency (~1–3 trains/s) of IFT trains in both directions (Iomini et al., 2001; Snow et al., 2004; Besschetnova et al., 2010; Brooks and Wallingford, 2012; Buisson et al., 2013; Williams et al., 2014; Prevo et al., 2015; Wheeler et al., 2015; Wingfield et al., 2017). When anterograde trains reach the distal end, they are

converted in usually smaller retrograde trains in the space of a few seconds (Buisson et al., 2013; Chien et al., 2017; Mijalkovic et al., 2017). Trains are fairly large complexes of >20 proteins (Taschner and Lorentzen, 2016) associated to molecular motors whose size is >1 mD (Rompolas et al., 2007), raising the question of how they are organized within the flagellum during anterograde and retrograde trafficking.

In transmission EM (TEM), trains appear as electron-dense particles sandwiched between microtubule doublets and the flagellum membrane. This has been visualized in only two species so far: the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* (Ringo, 1967; Pigino et al., 2009; Vannuccini et al., 2016) and the protist *Trypanosoma brucei* (Absalon et al., 2008). Recently, an elegant study using correlative light EM in *Chlamydomonas* cells expressing a fluorescent IFT protein showed that anterograde trains are positioned on the B tubule of each microtubule doublet, whereas retrograde trains are found on the A tubule (Stepanek and Pigino, 2016). In this organism, IFT trains appeared on all nine microtubule doublets (Stepanek and Pigino, 2016). By contrast, TEM suggested that electron-dense particles looking like

¹Trypanosome Cell Biology Unit, INSERM U1201, Institut Pasteur, Paris, France; ²Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Cellule Pasteur, Paris, France; ³UtechS Ultrastructural Bioimaging (Ultrapole), Institut Pasteur, Paris, France; ⁴Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 9187, Orsay, France; ⁵Institut Curie, Paris Sciences et Lettres Research University, INSERM U1196, Orsay, France; ⁶Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Health and Life Science, Oxford Brookes University, Oxford, UK; ⁷UtechS Photonic Bioimaging (Imagopole), Institut Pasteur, Paris, France; ⁸Image Analysis Hub, Institut Pasteur, Paris, France.

*E. Bertiaux and A. Mallet contributed equally to this paper; Correspondence to Philippe Bastin: pbastin@pasteur.fr.

© 2018 Bertiaux et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).



IFT trains are restricted to microtubule doublets 3–4 and 7–8 of the axoneme in *T. brucei* (Fig. 1 A; Absalon et al., 2008; Höög et al., 2016). The restricted presence of IFT trains on two sets of doublets raises two hypotheses. First, a tantalizing explanation would be that some specific doublets serve as tracks for anterograde transport and others for retrograde trafficking, hence allowing independent control of each mode of transport (Fig. 1 B, Model 1). Second, each individual doublet could serve as a double track for IFT (Fig. 1 B, Model 2) as shown in *Chlamydomonas*. In that situation, train frequency and speed could be similar or different between doublets. In both models, once anterograde trains reach the distal end of the flagellum, they need to be converted to retrograde trains in order to return back to the proximal end. Does conversion happen on the same doublet that the anterograde train traveled along, or does each anterograde train enter a common pool of material at the distal end of the flagellum, where retrograde trains are then assembled? In this study, we investigated IFT train distribution along the length of the trypanosome flagellum using focused ion beam scanning EM (FIB-SEM) to get a 3D view and to measure the length of each IFT train using a 10-nm Z axis increment. We formally demonstrate that trains are indeed mostly found on doublets 3–4 and 7–8 and that they fall in two categories defined by their length. Using high-resolution live-cell imaging, we reveal which hypothesis is correct for the distribution of anterograde and retrograde trafficking, and we apply kymograph analysis to examine the conversion of anterograde to retrograde trains.

Results

FIB-SEM analysis revealed the length and 3D distribution of IFT trains

To obtain a global view of the 3D distribution of IFT trains by EM, different approaches are available. Since the twisted shape of the trypanosome flagellum (Sherwin and Gull, 1989) restricts the use of conventional transmission electron tomography to short portions of the axoneme, we turned to FIB-SEM, which allows the collection of hundreds of sequential EM images at 10 nm Z resolution (Kizilyaprak et al., 2014). WT trypanosomes were chemically fixed, dehydrated, and embedded in resin in conditions similar to classic TEM. Acquisition in x–y relies on scanning EM collecting backscattered electrons and therefore provides a lower resolution compared with TEM. However, invaluable Z information is gained by milling the block face with 10-nm increments using the ion beam. In these conditions, isotropic large volumes can be acquired with ultrastructural resolution at 10 nm voxel size to analyze intracellular structures in long portions of flagella. This turned out to be a considerable advantage to monitor IFT train positioning. Four samples were reconstructed, each containing several trypanosomes. Navigating through the volume of each sample revealed the typical trypanosome architecture with the cell body containing the subpellicular microtubules, the nucleus, the large mitochondrion and its kinetoplast (mitochondrial DNA), the ER, the Golgi apparatus, or the glycosomes (Fig. 2 A and Video 1). The shape, size, and distribution of these organelles were in agreement with published data based on electron tomography (Lacomble et al., 2009) or serial block face

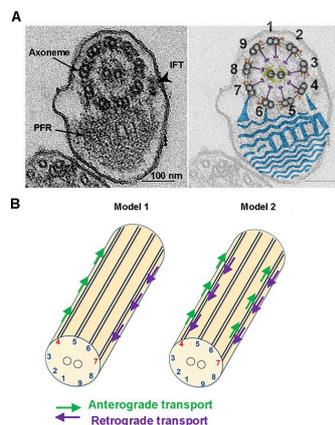


Figure 1. Positioning of IFT trains in the trypanosome flagellum and models for IFT trafficking. (A) Cross section of the trypanosome flagellum observed by conventional TEM. The arrowhead indicates an IFT particle positioned at the level of doublet 4. The cartoon shows the main structural components of the axoneme, with the numbering of microtubule doublets (Branche et al., 2006) 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) The restricted presence of IFT on doublets 3–4 and 7–8 can be explained by two models: either some doublets are used specifically for anterograde transport and the other ones support retrograde IFT (Model 1) or bidirectional trafficking takes place on all doublets (Model 2). Only one doublet was highlighted for the sake of clarity.

sectioning (Hughes et al., 2017). Flagella were clearly recognized in both cross and longitudinal sections, including multiple cases where the proximal portion was seen to emerge from the flagellar pocket (Video 1). The base of the flagellum displayed the typical organization with the basal body, the transition zone, the axoneme, and finally, the axoneme and the paraflagellar rod (PFR), a lattice-like structure (Hughes et al., 2012) essential for motility (Bastin et al., 1998). Flagella were correctly attached to the cell body with the exception of the distal end, which is always free as expected (Sherwin and Gull, 1989).

Importantly, IFT trains can be seen without ambiguity as electron-dense particles found between the flagellar membrane and microtubule doublets (Fig. 2 A, arrows in bottom panels, and Video 1). To determine doublet number, the fixed orientation of the axoneme relative to the PFR (Branche et al., 2006; Gadelha et al., 2006; Ralston et al., 2006) was exploited (Fig. 1 A). Indeed, the presence of a thick projection that connects the B tubule of doublet 7 to the PFR makes doublet numbering straightforward (Fig. 1 A). In case this projection was not visible, the proximal-to-distal orientation of the axoneme was determined by traveling through the volume knowing that dynein arms are oriented clockwise when starting from the base of the flagellum (Sherwin and Gull, 1989). Because several portions of flagella

Bertiaux et al.
IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology
<https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

4285

Downloaded from <http://rupress.org/jcb/article-pdf/217/12/4284/864990> by guest on 22 September 2020

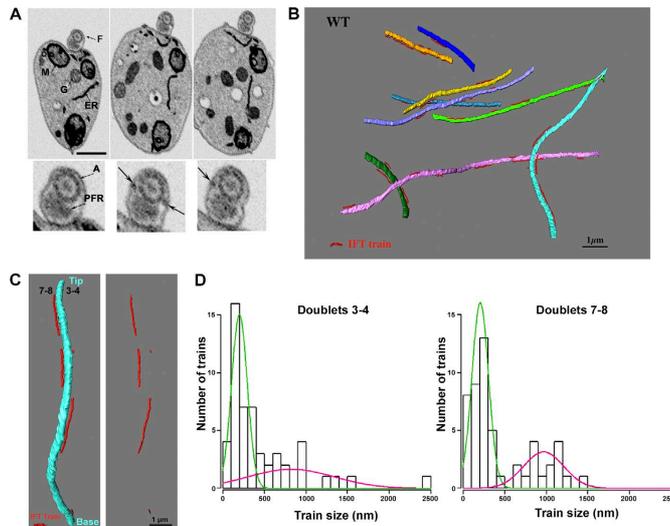


Figure 2. IFT trains of similar length are distributed on doublets 3–4 and 7–8. (A) Successive images from Video 1 showing WT trypanosomes analyzed by FIB-SEM. Each image corresponds with a Z stack of three slices between positions 424 and 475. The progression is from anterior to posterior. Top: Low magnification of the cell body with major organelles indicated. F, flagellum; G, glycosome; M, mitochondrion. Bottom: A magnification of the flagellum area is shown with the axoneme (A) and the PFR. The arrows indicate IFT particles. (B) Portions of flagella reconstructed after FIB-SEM. Each axoneme is shown with a different color, and IFT trains are in red (for animation, see Video 2). (C) Another example of a flagellum from a WT trypanosome coming from a different stack than the one presented in A and B with the axoneme (sky blue) and several IFT trains (red). Doublet numbers and flagellum orientation (basal body and tip) are indicated. (D) Length of the IFT trains on doublets 3–4 (green; $n = 52$) and 7–8 (magenta; $n = 56$) determined from FIB-SEM analysis. Data are from 27 portions of flagella representing a total axoneme length of 166 μm . Two populations can be separated with short trains (green) and longer ones (magenta; see text for details).

were encountered in a single volume, each axoneme was individually marked with a different color, and IFT trains are indicated in red (Fig. 2, B and C; and Video 2). Most trains were found along doublets 3–4 and 7–8 and exhibited various lengths (Fig. 2, B and C). We detected 52 trains closely associated to doublets 3–4 and 56 trains to doublets 7–8 in 27 distinct flagella (total cumulated axoneme length was 166 μm , and the average length of the visible axoneme was $6.25 \pm 4.21 \mu\text{m}$). Only two trains were not found on these doublets (both were present on doublet 1). All of the reconstructed axonemes from the FIB-SEM data were pooled in order to calculate an average train number in a typical axoneme. An average of 6.15 trains were found associated to doublets 3–4, and 6.6 trains on doublets 7–8. This is below the expected numbers of 8.6 anterograde trains and 8.9 retrograde trains per flagellum deduced from their speed and frequency in live cells (Buisson et al., 2013), suggesting that some trains might be missed in the FIB-SEM analysis.

Measurements of the length of IFT trains from the FIB-SEM data suggested the presence of two distinct populations on each set of doublets (Fig. 2 D). This was confirmed by statistical analysis using R software, with 61% short trains ($202 \pm 94 \text{ nm}$) and 39% longer trains ($822 \pm 515 \text{ nm}$) associated to doublets 3–4 ($n = 52$), whereas 68% short trains ($207 \pm 99 \text{ nm}$) and 32% longer trains ($968 \pm 239 \text{ nm}$) associated to doublets 7–8 ($n = 56$; Fig. 2 D).

In most cases, the random orientation of flagella restricted the discrimination of individual doublets in the FIB-SEM volumes. However, we could find a few flagella whose positioning allowed the segmentation of individual doublets, hence offering the opportunity to see whether IFT trains associated preferentially to doublet 3 or 4 or to doublet 7 or 8. One such example is presented in Fig. 3 and corresponds with the cell in the center of the field of view in Video 1. Doublets could be segmented over several micrometers, and four trains were present along them.

Trains annotated as IFT1, IFT2, and IFT4 were all found to be in closer proximity to doublet 7 compared with doublet 8, whereas train IFT3 was closer to doublet 4 than to doublet 3 (Fig. 3). This suggests that IFT trains could travel mostly on doublets 4 and 7. Unfortunately, this analysis was only feasible with very few flagella and cannot be taken as a generality.

Overall, these results demonstrate that IFT trains are restricted to doublets 3–4 and 7–8 along the length of the flagellum in trypanosomes, with a possible preference for 4 and 7 at least in some flagella. The average train number and their average length are equivalent for the two sets of doublets, hence suggesting that similar trains travel on each of them rather than supporting the second hypothesis of anterograde and retrograde IFT trafficking taking place on each doublet. However, FIB-SEM does not give information on train direction, and the possible presence of arrested trains (Stepanek and Pigino, 2016) cannot be ruled out and could interfere with the interpretation. Now that the spatial distribution of IFT trains has been clarified, we turned to live-cell imaging in order to investigate their dynamics.

Immunofluorescence analysis indicates that IFT proteins are found on both sides of the axoneme

Measurements of flagellar sections by TEM showed that the doublets 4 and 7 are separated by $190 \pm 11 \text{ nm}$ ($n = 20$), which is below the resolution of conventional light microscopy. To evaluate the feasibility of detecting IFT on these two separate sides of the axoneme, we tried different fixation protocols and examined the distribution of IFT proteins by immunofluorescence assays with antibodies against the IFT172 protein (Absalon et al., 2008) and the axonemal protein TbSAXO1 (Dacheux et al., 2012). Fixation of trypanosomes in paraformaldehyde followed by a postfixation in methanol led to the detection of TbSAXO1 as a single thick line (second column, Fig. 4) as expected from immunogold analysis

Bertiaux et al.
IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology
<https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

Downloaded from <http://rupress.org/jcb/article-pdf/217/12/4284/8649890> by guest on 22 September 2020

4286

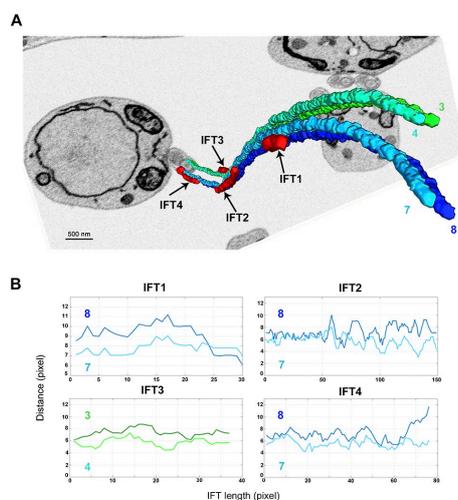


Figure 3. IFT trains are found closer to doublets 4 and 7 compared with doublets 3 and 8. (A) 3D view of a rare flagellum where individual doublets could be discriminated. Segmentation was performed to highlight the vicinity of the IFT trains (red) and microtubule doublets 3 (dark green), 4 (light green), 7 (light blue), and 8 (dark blue). (B) Plots representing the distances between the center of the skeleton for the indicated IFT trains and that of the microtubule doublets along their length using the same color code. In this flagellum, IFT trains are found closer to doublets 4 and 7.

that showed that this protein was present throughout the axoneme (Dacheux et al., 2012). By contrast, IFT172 staining appeared as two parallel lines decorating both sides of the TbSAXO1 staining (third column, Fig. 4). This was observed in the single flagellum of G1 cells (Fig. 4 A) and in both mature and growing flagella of duplicating cells (Fig. 4 B). Methanol fixation results in dehydration and flattens the sample on the slide, possibly leading to a better separation of IFT trains allowing their detection as two separate lines by conventional light microscopy. This is promising because this suggests that IFT positioning on distinct doublets could be discriminated by light microscopy.

The next step was the investigation of IFT in live cells, which requires the expression of a fluorescent reporter in trypanosomes (Adhiambo et al., 2009; Bhogaraju et al., 2013; Buisson et al., 2013; Huet et al., 2014). Cell lines expressing GFP::IFT52 have been used reproducibly to detect IFT (Absalon et al., 2008; Buisson et al., 2013), but in this setup, GFP::IFT52 was expressed from the ribosomal DNA locus with a strong promoter (Wirtz and Clayton, 1995). This led to bright flagellar signal but also to significant cytoplasmic signal (Buisson et al., 2013). To avoid any risk of potential artifacts due to overexpression, an in situ tagging approach (Kelly et al., 2007; Dean et al., 2017) was selected to generate a cell line expressing IFT81 fused to mNeonGreen (mNG; Shaner et al., 2013) from its endogenous locus. IFT81 is a well-known member of the IFT-B complex involved in tubulin binding and transport (Bhogaraju et al., 2013; Kubo et al., 2016) and was shown previously to traffic within the trypanosome flagellum (Bhogaraju et al., 2013). Western blotting with an anti-mNG antibody demonstrated that the fusion protein displayed the expected mobility on SDS-PAGE (Fig. S1 A). Live analysis showed the classic distribution with a strong signal at the base of the flagellum and train trafficking in both anterograde and retrograde direction within the flagellum that was detected by kymograph analysis (Fig. S1, B and C; and Video 3). Kymograph analysis revealed that the frequency and speed of anterograde trains (Fig. S1, D and E) was similar to what was reported previously for other IFT-B proteins (Bhogaraju et al., 2013; Buisson et al., 2013; Huet et al., 2014). Finally, applying the paraformaldehyde-methanol fixation protocol followed by direct observation of the mNG::IFT81 fluorescent signal led to the detection of two parallel lines within flagella (Fig. S1 F). The behavior of mNG::IFT81 is therefore comparable with that of GFP::IFT52, and both cell lines were used for imaging IFT in trypanosomes.

High-resolution live-cell imaging reveals bidirectional IFT on two sides of the axoneme

These results are encouraging because they suggest that live imaging by light microscopy could permit the visualization of IFT on two sides of the axoneme. We turned to superresolution based on structured illumination microscopy (SIM; Gustafsson, 2000; Gustafsson et al., 2008) to visualize IFT trafficking. SIM imaging provided the spatial resolution and demonstrated the

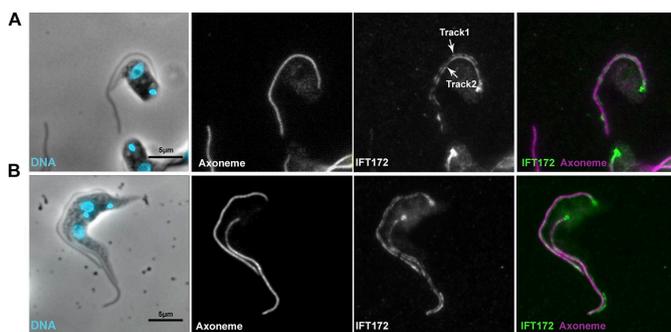


Figure 4. IFT proteins are found on two distinct lines along the axoneme in fixed cells. (A and B) Control trypanosomes (strain expressing YFP::ODA8; Bonnefoy et al., 2018) were fixed in paraformaldehyde followed by methanol after fixation and processed for immunofluorescence using a marker antibody for the axoneme (middle; magenta on the merged image) and a monoclonal antibody against IFT172 (right; green on the merged image). The leftmost panel shows the phase-contrast image merged with DAPI staining (cyan). (A) Cell with one flagellum. (B) Cell assembling a new flagellum. In both cases, a single continuous thick line was observed for the axoneme marker, whereas discontinuous staining spreading on two close but distinct lines was visible for IFT172.

Bertiaux et al.
IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology
https://doi.org/10.1083/jcb.201805030

Downloaded from http://jcb.org/ at guest on 22 September 2020

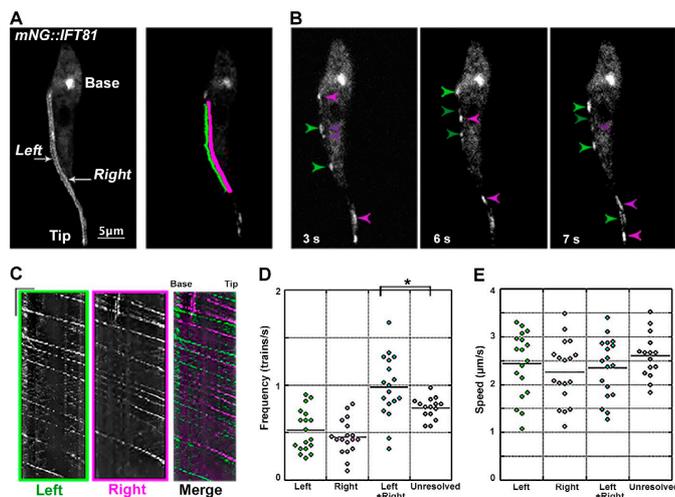


Figure 5. Bidirectional IFT trafficking takes place on two sides of the axoneme in live trypanosomes expressing mNG::IFT81. (A) Temporal projection of a stack of images corresponding with Video 5 showing the presence of two parallel lines for IFT in the flagellum in addition to the pool of IFT at the base. The left (green) and right (magenta) sides were defined after orientating the cell with the posterior end on top of the image and the flagellum on the left-hand side. **(B)** Still images from Video 5 of live trypanosomes expressing mNG::IFT81 imaged at high resolution. Green and magenta arrowheads indicate trains on the left and right sides, with light arrowheads indicating anterograde trains and darker arrowheads showing retrograde trains. The time point for each image is indicated. **(C)** Kymograph analysis of the same cell showing trafficking on the left side (green), on the right side (magenta), and the merged images for the region of interest indicated in A. Bars: 2.5 μm (horizontal bar); 2.5 s (vertical bar). **(D)** Dot plot of the frequency of anterograde IFT trains visible on the left (green) and the right (magenta) side, the sum of both (cyan), and from videos where only one track was visible (unresolved; gray). Values are coming from 18 different cells containing a total of 529 trains. *, $P = 0.02$. **(E)** Same representation but for the speed of anterograde trains. Only statistically significant differences are shown (one-way ANOVA test).

existence of two parallel lines within the flagellum for fluorescent mNG::IFT81 in live cells (Fig. S2 A). Next, we tried to record IFT trafficking over time using the GFP::IFT52 cell line (Fig. S2 B and Video 4). This demonstrated that IFT trains move on two distinct parallel lines in trypanosomes in agreement with the EM data. However, the acquisition time (800 ms) was not compatible with the rapid speed of IFT in trypanosomes ($\sim 2 \mu\text{m/s}$ for anterograde and $\sim 5 \mu\text{m/s}$ for retrograde transport), and images of multiple trains overlapped, precluding analysis (Video 4).

To find an appropriate compromise between sufficient resolution and fast acquisition, high-resolution imaging was performed using objectives with superior NA (1.49 NA for GFP::IFT52 [imaging performed at the Janelia Farm Research Campus], and 1.57 NA for mNG::IFT81 [imaging performed at the Institut Pasteur]; Li et al., 2015). In these conditions, the theoretical resolution for a green fluorescent molecule should be $\sim 160 \text{ nm}$, a value compatible with the discrimination of IFT trafficking on doublets separated by 190 nm . Remarkably, examination of cells expressing mNG::IFT81 (Video 5) or GFP::IFT52 (Video 6) with the high-NA objectives revealed the presence of trains on two parallel lines within the flagellum. This was clearly confirmed with time projections (Figs. 5 A and S3 A). Closer examination of IFT trafficking demonstrated that anterograde and retrograde IFT trafficking was taking place on each of these lines (Figs. 5 B and S3 B; and Videos 5 and 6). This was further supported by kymograph analysis that showed the presence of distinct anterograde and retrograde trains on each side of the axoneme (Figs. 5 C and S3 C). These results demonstrate that IFT takes place on two separate tracks in the trypanosome flagellum, presumably corresponding with doublets 3–4 and 7–8, and that anterograde

and retrograde trafficking occurs on each of them. This supports the hypothesis of bidirectional IFT on both sets of doublets and probably invalidates the model with one track for each direction. However, we cannot formally exclude that anterograde trafficking takes place on doublet 4 and retrograde on doublet 3 or the opposite, and similarly with doublets 7 and 8.

To be able to quantify and compare IFT train trafficking on each side of the axoneme, it was necessary to find a way to identify them. To do that, the cellular asymmetry of trypanosomes was exploited. Cells were orientated with the posterior end toward the top of the image and with the flagellum lying on the left-hand side, hence defining a left and a right side (Figs. 5 A and S3 A). Quantification of anterograde IFT train trafficking showed a similar frequency close to 0.5 anterograde trains/s on the left and right side for both fluorescent proteins (Figs. 5 D and S3 D; Table 1). There was no statistically significant difference between these two parameters in cells expressing mNG::IFT81 (one-way ANOVA test, $P = 0.29$) or GFP::IFT52 ($P = 0.14$). The anterograde speed was $\sim 2.5 \mu\text{m/s}$ on each side in both cell lines (Figs. 5 E and S3 E; and Table 1), although we noted a trend toward slower IFT speed by 10–15% on the right side ($P = 0.20$ for mNG::IFT81; $P = 0.067$ for GFP::IFT52). Trains trafficking simultaneously on each side might not be discriminated with conventional light microscopy. Hence, the anterograde IFT train frequency was compared using videos of mNG::IFT81 cells acquired in the same experiment but where two sides could not be discriminated (Fig. 5 E, Unresolved). The frequency calculated from the total of left and right kymographs in cells where the two sides could be detected was consistently higher (0.98 anterograde trains/s) compared with cells where only one line was visible

(0.76 anterograde trains/s; Table 1) with statistical confidence ($P = 0.02$). This result suggests that $\geq 15\%$ of trains could be missed when IFT was imaged at low resolution. By contrast, their average train speed was indistinguishable (Table 1; $P = 0.21$), suggesting that the “missed” trains are not a specific population at least in terms of speed.

Although retrograde transport was detected in almost all videos (Videos 5 and 6), the lower intensity of these trains made their quantification quite challenging, especially for the frequency. Nevertheless, it was possible to estimate the speed of the brightest retrograde trains, which was between 4 and 5 $\mu\text{m/s}$, in agreement with data obtained using conventional imaging (Buisson et al., 2013).

Although our live-cell imaging data reveal two separate paths for IFT, we wanted to confirm that the IFT motors that connect IFT particles to microtubules exhibit the same. Molecular motors of the kinesin and dynein family transport IFT proteins in the anterograde and retrograde directions, respectively. We investigated the movement of the dynein motor and monitored its association to the IFT proteins. First, we monitored the movement of dynein using the heavy chain 2.2 (DHC2.2) fused to GFP (Blisnick et al., 2014) using high-resolution imaging. As for IFT52 and IFT81, trafficking on two parallel lines on each side of the axoneme was detected (Fig. 6 A and Video 7; $n = 14$). Kymograph analysis confirmed independent movement in anterograde and retrograde directions on both sides (Fig. 6 B). We next set up dual-color imaging to visualize simultaneously mNG::IFT81 and DHC2.1 tagged in situ with TandemTomato (TdT) in live cells. Overall, both signals seemed to colocalize in moving and standing trains (Fig. 6 C and Video 8). Analysis of 10 cells revealed that 93% and 81% of the anterograde traces were positive for both mNG::IFT81 and TdT::DHC2.1 in the anterograde ($n = 273$ trains) and retrograde ($n = 41$) direction. Lower values for retrograde trains probably reflect the weaker fluorescent signal produced by the TdT::DHC2.1 compared with mNG::IFT81. This shows that dynein motors indeed transport cargoes on a limited set of microtubules. However, the TdT fluorescent protein emits at too high of a wavelength to allow sufficient resolution to discriminate the two sides of the axoneme, making it impossible to formally rule out that dynein could travel alone without cargo on other microtubules in the retrograde direction. The same experiment could not be done with IFT kinesins since tagging disrupted protein localization (not depicted). The hypothesis that IFT kinesins walk without cargo on other doublets than 3–4 and 7–8 therefore remains open.

Conversion of anterograde to retrograde train takes place on the same side of the axoneme

To visualize the conversion of anterograde to retrograde transport, we looked at the distal end of the flagellum of cells expressing mNG::IFT81 (Fig. S4 A and Video 9). On both left and right sides, the arrival of large anterograde trains at the distal end of the flagellum was clearly visible. This was followed by a lag phase (seen as vertical lines on the kymograph), where the fluorescent material remained at the distal end but its intensity progressively went down while multiple retrograde trains were released during a ~ 3 –4-s period (Fig. S4 B). It should be noted

Table 1. Speed and frequency of anterograde IFT trafficking

	Speed ($\mu\text{m/s}$)	Frequency (trains/s)	<i>n</i> trains
mNG::IFT81			
Left	2.43 \pm 0.68	0.52 \pm 0.22	284
Right	2.27 \pm 0.65	0.45 \pm 0.18	245
Left + right	2.35 \pm 0.62	0.98 \pm 0.33	529
Unresolved ^a	2.60 \pm 0.46	0.76 \pm 0.11	389
GFP::IFT52			
Left	2.56 \pm 0.26	0.43 \pm 0.10	138
Right	2.18 \pm 0.29	0.34 \pm 0.17	110
Left + right	2.37 \pm 0.26	0.77 \pm 0.15	248

Data were obtained from 18 and 10 cells for mNG::IFT81 and GFP::IFT52, respectively.

^aCorresponds with videos acquired in high-resolution conditions but where only one track could be visualized, presumably due to the orientation of the flagellum during the acquisition. Indeed, doublets 3–4 and 7–8 are on opposing sides of the axoneme. According to the orientation of the flagellum on the slide, they can be parallel to the glass slide, and two tracks are visible. However, if the flagellum is twisted by 90°, the two sets of doublets will be on top of each other and will not be resolved even when using high-resolution conditions.

that the anterograde trains do not all stop exactly at the same place (Fig. S4 B, merge). Data suggested that anterograde trains convert to retrograde trains on the same track and that no exchange of IFT-B material could be detected between the left and right sides of the axoneme. However, the high frequency of IFT in both directions and the relatively weak signal of retrograde trains make it difficult to reach a firm conclusion. We therefore used the GFP::IFT52-expressing cell line where the signal is brighter, hence facilitating the detection of retrograde transport. The distal end of the flagellum was bleached, and IFT was recorded in this portion (Fig. 7 and Video 10). This led to a significant improvement of the signal-to-noise ratio and helped the visualization of retrograde trains on videos and on kymographs. The arrival of several anterograde trains and their conversion to retrograde trains was tracked by carefully examining video images and performing kymograph analyses (Fig. 7 and Video 10). We could not see an exchange of sides scrutinizing 12 videos acquired in these conditions, following dozens of trains in each.

Overall, these results obtained with two different cell lines (expression of mNG::IFT81 and GFP::IFT52) at two different imaging centers (Janelia Farm, Ashburn, VA, and Institut Pasteur, Paris, France) using different techniques demonstrate that IFT takes place on two distinct sides of the flagellum and that anterograde and retrograde trafficking occur on each of them.

Discussion

T. brucei is only the second organism where IFT trains have been visualized in both light microscopy and EM. In this study, we reveal train distribution on doublets 3–4 and 7–8 using FIB-SEM (with possibly a preference for 4 and 7) and demonstrate bidirectional trafficking on two separate sides of the axoneme by

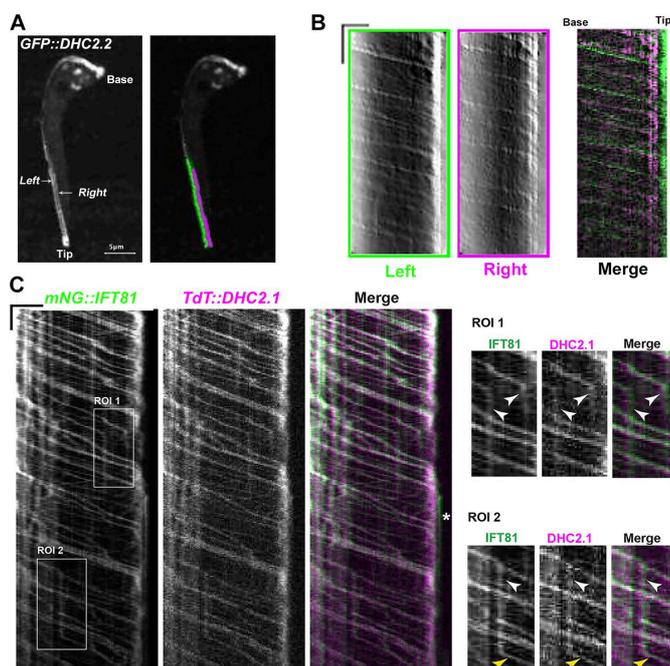


Figure 6. The IFT dynein travels on both sides of the axoneme in association with IFT proteins. (A) Temporal projection of the flagellum in a cell expressing GFP::DHC2.2. The region of interest (ROI) at the tip of the flagellum is indicated with left (green) and right (magenta) sides highlighted. (B) The kymographs are shown for the left and right side in the corresponding colors. Bars: 2.5 μm (horizontal bar); 5 s (vertical bar). (C) Kymograph analysis of a cell expressing mNG::IFT81 (left) and Tdt::DHC2.1 (middle). On the merged panels, mNG::IFT81 is shown in green, and Tdt::DHC2.1 is in magenta. Both proteins colocalized in moving but also in standing trains shown in the regions of interest. White arrowheads indicate arrested trains, while yellow arrowheads indicate an arrested train that started moving again. Even in these conditions, mNG::IFT81 and Tdt::DHC2.1 remained associated. The white asterisk on the merged panel indicates a rare example of mNG::IFT81 material that was not associated with Tdt::DHC2.1 and that remained immotile at the far distal end of the flagellum. However, the resolution was not sufficient to rule out the possibility that dynein could travel without cargo on other microtubules.

high-resolution live-cell imaging. These two sides presumably correspond with doublets 3–4 and 7–8, but definitive confirmation will require the identification of specific markers of each of these doublets at the axoneme level.

FIB-SEM detected two distinct populations of trains on each set of doublets. The first possibility is that long trains correspond with anterograde ones and short trains with retrograde ones as expected from the distinctive size on videos and kymographs (Buisson et al., 2013). The higher frequency of short trains (2.3 to 1.5-fold) is consistent with the higher abundance of retrograde trains detected during live imaging (Buisson et al., 2013). However, the total number of IFT trains seen in FIB-SEM (12.5 per flagellum) is lower compared with what was detected by live imaging (17.5). Moreover, the average length of long trains is close to 1 μm , and this is highly unusual for anterograde trains seen on kymographs, in contrast with arrested trains that look larger (Fig. S4). Intriguingly, two populations of IFT trains were also found using electron tomography analysis of *Chlamydomonas* flagella, with average lengths fairly close to what is reported in this study for trypanosomes (Pigino et al., 2009). Long trains were initially thought to correspond with anterograde trains because they accumulate in the *fla14* retrograde transport mutant, where small trains disappear. However, correlative light and electron microscopy (CLEM) revealed that long trains correspond with standing material and that short particles correspond with anterograde trains (Stepanek and Pigino, 2016). Based on this, we propose that short and long trains observed by FIB-SEM

in *T. brucei* flagella could correspond with anterograde trains and standing material, respectively. A total of 7.2 short trains was found per flagellum, which is close to the predicted number of 8.6 (Buisson et al., 2013). Observation of kymographs indicated the presence of standing trains that look larger than moving trains (Fig. S4 B, asterisks). It should be noted that this material does not remain stuck forever as it appears to be picked up by other anterograde trains after a few seconds (asterisks in Figs. S1 E and S4 B). In this scenario, retrograde trains would be missed either because they are too short or because their morphology is different and difficult to identify by FIB-SEM. In *Chlamydomonas*, retrograde trains appear less condensed and less regular compared with anterograde trains, and had been missed in conventional TEM until their identification by correlative techniques (Stepanek and Pigino, 2016).

The use of superior NA objectives appears to be an optimal compromise between speed of acquisition and spatial resolution. It revealed the existence of bidirectional IFT on two sides of the axoneme, but it also showed that the frequency of IFT measured with conventional microscopy might be slightly underestimated. Moreover, it revealed the transition of anterograde trains to retrograde trains, with IFT-B proteins spending up to 3–4 s at the distal end while being progressively associated to the emergence of several retrograde trains. This value is in agreement with previous low-resolution analysis based on photobleaching experiments (Buisson et al., 2013). In *Chlamydomonas* (Chien et al., 2017) and *Caenorhabditis elegans* (Mijalkovic et al., 2017), IFT-B

Bertiaux et al.
IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology
<https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

4290

Downloaded from <http://jcb.org/> by guest on 22 September 2020

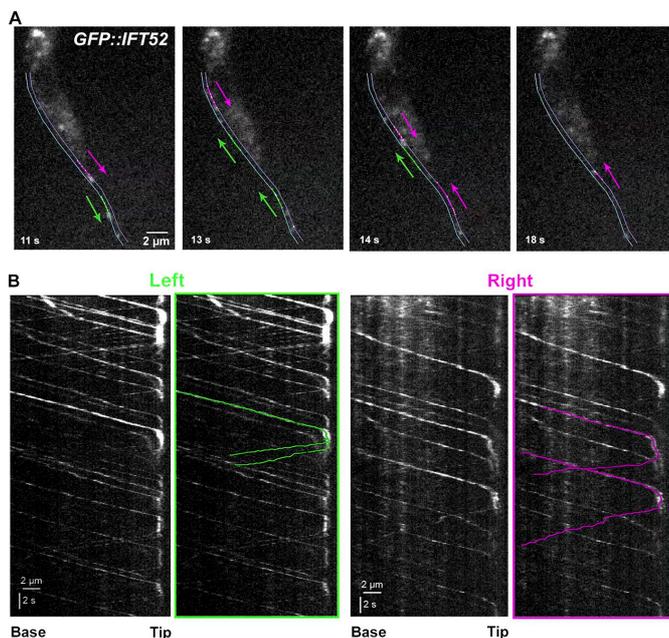


Figure 7. Anterograde trains are converted to retrograde trains while remaining on the same track. (A and B) IFT trafficking was analyzed in the GFP::*IFT52*-expressing cell line. The tip of the flagellum was bleached, and the arrival of new anterograde trains was monitored (see corresponding Video 10). For technical reasons, the bleaching event could not be recorded, and only the recovery phase can be presented. **(A)** Still images corresponding with the indicated times from Video 10. The thin green and magenta lines indicate the left and right sides of the axoneme, respectively. At 11 s, two anterograde trains were marked with a green (left side) or a magenta (right side) line, and the corresponding arrows indicate their direction. At 13 s, the left anterograde train converted to two retrograde ones that remained on the same left side of the flagellum. A second anterograde train arrived on the right side. At 14 s, the first left retrograde train left the field of view, and the second one progressed toward the base of the flagellum. The first anterograde train of the right side converted to a retrograde one that also remained on the right side. At 18 s, all retrograde trains on the left side were not in the field of view anymore as well as the first one on the right side. A new retrograde train was present on the right side and issued from the second anterograde train. Once again, conversion took place on the same side of the axoneme. **(B)** Kymograph analysis for the indicated left and right sides of the flagellum. The original kymograph is shown on the left of each panel, and the three annotated trains described above are marked in color.

proteins also spend a few seconds at the distal end of microtubules before returning toward the base as components of several retrograde trains.

The restriction of IFT to a limited set of doublets is different from the situation encountered in *Chlamydomonas*, where trains appear to be present on the majority of the doublets (Stepanek and Pigino, 2016). So far, IFT trains have only been visualized by EM in these two organisms. To understand the significance of IFT presence on all or only some doublets, it will be essential to determine which doublets are being used in different types of cilia in various organisms. This raises the question of why restrict IFT to some doublets. We propose a scenario where the restriction of IFT to some doublets would represent an evolutionary advantage by liberating the other doublets from constraints imposed by IFT train presence, thereby offering the opportunity for acquiring new structures or functions. In trypanosomes and related protists, the PFR is tightly associated to the axoneme (Koyfman et al., 2011; Hughes et al., 2012) and brings an essential contribution to flagellum motility (Santrich et al., 1997; Bastin et al., 1998). Restricting IFT to some doublets could allow the passage of other molecular motors on the remaining doublets. These could transport different cargoes, hence increasing the range of functions performed by cilia and flagella. In trypanosomes, an unusually large number of genes encoding for kinesins has been identified (Berriman et al., 2005), and several of the protein products have been localized to the flagellum (Demonchy et al., 2009; Chan and Ersfeld, 2010) or found in proteomic analyses of

purified flagella (Broadhead et al., 2006; Oberholzer et al., 2011; Subota et al., 2014).

The trypanosome flagellum is attached to the cell body for most of its length toward the PFR side. Doublets 1, 2, 3, 8, and 9 are toward the surface of the flagellum, and the absence of IFT could favor interactions with host tissues. For example, parasites interact with the epithelium of the salivary glands of the tsetse fly via their flagellum and the development of electron-dense material resembling hemidesmosomes (Tetley and Vickerman, 1985). In other organisms, the cilia of sensory neurons of *C. elegans* spring to mind. They are composed of a middle segment made of nine doublet microtubules and of a distal segment with only singlet microtubules. Bidirectional IFT was reported on both segments without collisions (Snow et al., 2004). If some microtubules were used only for anterograde IFT and others only for retrograde IFT, it would provide a way to avoid collisions (Kuhns and Blacque, 2016).

In this study, we show a striking functional difference between doublets 3–4 and 7–8 and the others that cannot sustain IFT. Although microtubule doublets look similar, discrete molecular and structural differences have been noted between them in several organisms (Heuser et al., 2012; Lin et al., 2012). This is also the case in trypanosomes, where doublets 4, 5, 6, and 7 are physically linked to the PFR by different structures (Sherwin and Gull, 1989; Hughes et al., 2012) that could contain unique proteins (Imboden et al., 1995). Other molecular differences between doublets start to be unveiled with the recent example of CFAP43

Bertiaux et al.
IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology
<https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

Downloaded from <http://www.jcb.org/jcb/article-pdf/217/12/4284/864980> by guest on 22 September 2020

4291

and CFAP44, two proteins required for motility that have been located to doublets 5 and 6 using superresolution microscopy (Coutton et al., 2018).

What could make doublets 3–4 and 7–8 different from the others, and why would they be used for IFT? One possibility is that they contain biochemical information that is preferentially recognized by the IFT molecular motors once they are associated to the IFT train. Promising candidates are posttranslational modifications of tubulin such as (poly)glycylation or (poly)glutamyl-ation. These are found at the surface of the tubulin dimer, where one would expect interactions with molecular motors (Konno et al., 2012; Sirajuddin et al., 2014). Insights into a potential molecular mechanism are provided by in vitro experiments using engineered tubulin with various posttranslational modifications. This revealed that recruitment and processivity of the IFT kinesin motor KIF17 was stimulated by polyglutamyl-ation (Sirajuddin et al., 2014). Polyglutamyl-ation and polyglycylation are overwhelmingly represented in cilia and flagella, and their alteration affected these organelles (Rogowski et al., 2009; Wloga et al., 2009; Pathak et al., 2011; Lee et al., 2012; Bosch Grau et al., 2013). Mass spectrometry showed that trypanosome tubulin is extensively polyglutamylated, with variable numbers of glutamate residues added to both cytoplasmic and flagellar microtubules (Schneider et al., 1997). Investigating the role of tubulin glutamyl-ation in the definition of microtubule heterogeneity will be an exciting but challenging future axis for research given the large number of enzymes involved in this process (Janke et al., 2005; van Dijk et al., 2007), including in *T. brucei* (Casanova et al., 2015).

Materials and methods

Trypanosome cell lines and cultures

Cell lines used for this work were derivatives of *T. brucei* strain 427 cultured at 27°C in SDM79 medium supplemented with hemin and 10% FCS (Brun and Schönenberger, 1979). Cell lines expressing GFP::DHC2.1 or GFP::DHC2.2 have been described previously (Blisnick et al., 2014). The cell line expressing GFP::IFT52 from the pH430 vector (Absalon et al., 2008) under the control of the tet repressor (produced by plasmid pH360; Wirtz and Clayton, 1995) was transformed to express a TdT::IFT81 fusion produced from its endogenous locus (Bhogaraju et al., 2013). For the generation of the mNG::IFT81-expressing cell line, the first 497 nucleotides of *IFT81* (Gene DB number Tb927.10.2640 without the ATG) were chemically synthesized (GeneCust) and cloned in frame with the *mNG* gene (Shaner et al., 2013) within the HindIII and ApaI sites of p2675 vector (Kelly et al., 2007). The construct was linearized within the *IFT81* sequence with the enzyme XcmI and nucleofected (Burkard et al., 2007) in the WT 427 cell line, leading to an integration by homologous recombination in the endogenous locus and to expression of the full-length coding sequence of IFT81 fused to mNG. The same procedure was used for endogenous tagging of the heavy chain DHC2.1 subunit of the dynein motor using the first 497 bp of the coding sequence (Gene DB number Tb927.4.560 without the ATG) cloned in the p2845 vector containing the *TdT* gene and linearized with CsiI. Transfectants were grown in media with the appropriate anti-

biotic concentration, and clonal populations were obtained by limited dilution.

FIB-SEM

Trypanosomes were fixed directly in medium with 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich), cells were spun down, the supernatant was discarded, and the pellet was incubated for 15 min in fixation buffer made of 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in cacodylate 0.1 M buffer, pH 7.4. Samples were washed three times with 0.1 M cacodylate buffer (5 min each) and postfixed with 1% osmium (EMS) and 1.5% potassium ferrocyanide (Sigma-Aldrich) in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h. Samples were treated for 30 min with 1% tannic acid (Sigma-Aldrich) and 1 h with 1% osmium tetroxide (EMS), rinsed in water, and dehydrated in an ethanol (Sigma-Aldrich) series of 25%, 50%, 75%, 90%, and 100% (15 min each). Cells were embedded in epoxy resin (EMS) after 48 h at 60°C of polymerization. Embedded samples were mounted on aluminum stubs. Blocks were trimmed with glass knives in such a way that exposure of vertical faces allowed lateral milling by FIB. Tomographic datasets were obtained using a field emission scanning electron microscope (FESEM) Zeiss Auriga microscope equipped with a CrossBeam workstation (ZEISS) and acquired using ATLAS 3D software (ZEISS). For milling with the focused Gallium-ion beam, the conditions were as follows: 0.5–1 nA milling current of the Gallium emitter leading to the removal of 10 nm at a time from the epoxy resin. Scanning EM 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 –1,000 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 brightfield. Two different people performed the manual annotation of IFT trains. These were defined as electron-dense structures sandwiched between the axoneme and the flagellum membrane and present on a minimum of three consecutive slices (30 nm). Densities associated to membrane distortions were excluded. Trains were defined as different when separated by a minimum of three slices (30 nm).

Data processing and 3D reconstruction

Alignment of image stacks was done with the open source software ImageJ for data alignment (National Institutes of Health; Schneider et al., 2012) and Amira Software for visualization (v6.0.1; FEI; Thermo Fisher Scientific). Segmentation and 3D reconstructions were performed semiautomatically using Amira software and were corrected manually.

Length measurement of IFT trains

Segmentations of flagella and IFT trains were first split according to their segmented colors and then skeletonized in ImageJ (Schneider et al., 2012) using the Skeletonize 3D plugin (Arganda-Carreras et al., 2010). The number of voxels composing the generated skeletons was computed in ImageJ using the Object Counter 3D plugin (Bolte and Cordelières, 2006). The length of analyzed biological structures (flagella and IFT trains) was calculated as the number of voxels constituting the skeletonized structure multiplied by the size of the voxel.

Bertiaux et al.

IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology
<https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

4292

Downloaded from http://jcb.rupress.org/ by guest on 22 September 2020

Distance measurement between IFT trains and individual doublets

IFT trains and doublets 3, 4, 7, and 8 were manually segmented on one flagellum to assess the distance between the IFT trains and the doublets. IFT train and doublet segmentations were skeletonized in ImageJ (Schneider et al., 2012) using the Skeletonize 3D plugin (Arganda-Carreras et al., 2010). We then computed in 3D the minimum distance between each voxel of the IFT train skeletons and the voxels of the doublet skeletons. This allowed to plot along the IFT train its distance with the various doublets in order to determine the closest one.

Statistical analyses

In absence of other indications, all errors correspond with the SD of the population. ANOVA tests were performed using the appropriate tool in Kaleidagraph (v4.5.2). Populations of IFT trains on doublets 4 and 7 were analyzed separately with the statistical analysis software R (R Core Team, 2014) using the normalMixEM algorithm of the Mixtools package (version 1.1.0; Benaglia et al., 2009) to check whether they were composed of subpopulations or not. This algorithm, based on expectation maximization, estimates the mean and SD values of Gaussian subpopulations and eventually converges to a solution if such subpopulations exist. Convergence was reached in 27 and 13 iterations for IFT trains on doublets 4 and 7, respectively.

SIM

Trypanosomes expressing the mNG::IFT81 fusion protein were spread on glass coverslips in medium, and SIM was performed on an LSM780 Elyra PS1 microscope (ZEISS) using 100×/1.46 NA oil Plan Apochromat objective and an electron-multiplying charge-coupled device (EMCCD) Andor IXon 887 1-K camera for the detection at Institut Pasteur. 15 images per plane per channel (five phases; three angles) were acquired to perform the SIM imaging. SIM imaging was processed with ZEN software (ZEISS). The SIMcheck plugin (Ball et al., 2015) in ImageJ (Schneider et al., 2012) was used to evaluate the acquisition and the processing parameters.

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 (Gustafsson, 2000; Gustafsson et al., 2008) based on an Axio-Observer D1 stand equipped with an UAPON10XOTIRF 1.49 NA objective (Olympus) and an Orca Flash 4.0 sCMOS camera (Hamamatsu Photonics). GFP fluorophores were excited with a 488-nm laser (500 mW; SAPPHERE 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 177 s. Kymographs of individual paths of IFT were extracted using Fiji (ImageJ; Schindelin et al., 2012). The two IFT tracks were manually annotated as segmented lines on the temporal maximum-intensity projection of the sequence. These two lines were then used to reslice the sequence data, generating the kymographs that were analyzed using Icy

(de Chaumont et al., 2012). Cell lines expressing mNG::IFT81 or GFP::DHC2.2 were grown in standard conditions, and samples were mounted between glass and quartz coverslips (cover glasses HI; 1787-996; ZEISS). For video acquisition, a spinning-disk confocal microscope (UltraView VOX; PerkinElmer) equipped with an oil-immersion objective Plan Apochromat 100×/1.57 NA oil HI differential interference contrast (ZEISS) was used. Videos were acquired using Volocity software with an EMCCD camera (C-9100; Hamamatsu Photonics) operating in streaming mode. The samples were kept at 27°C using a temperature-controlled chamber. Sequences of 30 s were acquired with an exposure time of 100 ms per frame. Kymographs were extracted and analyzed with Icy software (de Chaumont et al., 2012) using the plugin Kymograph Tracker 2 (Chenouard et al., 2010). The cells were positioned in the same orientation, with the posterior end on top and the flagellum on the left-hand side to define the left and right sides. The two traces left by IFT trains were manually defined as a region of interest using the temporal projection.

Dual-color acquisitions were performed with the cell line expressing mNG::IFT81 and TdT::DHC2.1 on a spinning-disk fluorescence microscope (UltraView VOX; PerkinElmer) equipped with confocal scanning head (CSU X1; Yokogawa) and a 100× 1.4 NA objective controlled by Volocity software. The CSU X1 incorporates a dichroic mirror that sends emitted light on two EMCCD cameras (ImageEM C9100; Hamamatsu Photonics) separately for wavelengths <550 nm and >550 nm. This allows for simultaneous dual-color imaging for red and green channels.

Immunofluorescence imaging

For paraformaldehyde-methanol fixation, cultured parasites were washed twice in SDM79 medium without serum and spread directly onto poly-L-lysine-coated slides (J2800AMMZ; Thermo Fisher Scientific). Cells were left for 10 min to settle before treatment with 1 vol 4% PFA solution in PBS, pH 7. After 5 min, slides were washed briefly in PBS before being fixed in pure methanol at a temperature of -20°C for 5 min, followed by a rehydration step in PBS for 15 min. For immunodetection, slides were incubated for 1 h at 37°C with the appropriate dilution of the first antibody in 0.1% BSA in PBS; mAb25 recognizes the axonemal protein TbSAXO1 (Pradel et al., 2006; Dacheux et al., 2012) and a monoclonal antibody against the IFT-B protein IFT172 (Absalon et al., 2008). After three consecutive 5-min washes in PBS, species and subclass-specific secondary antibodies coupled to the appropriate fluorochrome (Alexa Fluor 488; Cy3; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) were diluted 1:400 in PBS containing 0.1% BSA and were applied for 1 h at 37°C. After washing in PBS as indicated above, cells were stained with a 1-µg/ml solution of the DNA dye DAPI (Roche) and mounted with the Slowfade antifade reagent (Invitrogen). Slides were immediately observed at room temperature with a DMI4000 microscope (Leica Microsystems) with a high-contrast Plan Apochromat 100× 1.4 NA objective (Leica Microsystems) using an ORCA-03G camera (Hamamatsu Photonics) with an EL6000 (Leica Microsystems) as a light excitation source. Image acquisition was performed using Micromanager software, and images were analyzed using ImageJ.

Bertiaux et al.

IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology

https://doi.org/10.1083/jcb.201805030

4293

Downloaded from http://jcb.rupress.org/ by guest on 22 September 2020

Western blotting

Cells were washed once in PBS. Laemmli loading buffer was added to the cells, and samples were boiled for 5 min. 20 µg protein was loaded into each lane of a Criterion XT Bis-Tris precast gel 4–12% (Bio-Rad Laboratories) for SDS-PAGE separation. XT-MOPS (1×) diluted in deionized water was used as a running buffer. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes using the Trans-Blot Turbo blotting system (25 V over 7 min; Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked with 5% skimmed milk for 1 h and then incubated with the monoclonal anti-mNG (32F6) primary antibody (ChromoTek) diluted 1:1,000 in 0.05% PBS-Tween-20 (PBST). As a loading control, the anti-PFR L13D6 monoclonal antibody (Kohl et al., 1999) diluted 1:25 was used. After primary antibody incubation, three washes of 5 min each were performed in 0.05% PBST followed by secondary antibody incubation. Anti-mouse secondary antibody was coupled to HRP and diluted to 1:20,000 in 0.05% PBST containing 0.1% milk, and then the membrane was incubated with this for 1 h. The Amersham ECL Western blotting detection reagent kit (GE Healthcare) was used for final detection of proteins on the membrane.

Online supplemental material

Fig. S1 shows that endogenous tagging of IFT81 with mNG provides a clean marker for monitoring IFT, with validation of the fusion protein by Western blotting, evidence of bidirectional IFT trafficking, and presence of two lines upon immunofluorescence assay using the paraformaldehyde-methanol protocol. Fig. S2 uses SIM imaging in live cells to reveal IFT trafficking on two separate sides of the axoneme, but the temporal resolution is not sufficient to visualize individual IFT trains. Fig. S3 illustrates bidirectional IFT trafficking on two sides of the axoneme in live trypanosomes expressing GFP::IFT52 showing still images at high resolution and kymograph analysis depicting the left and the right parts of the axoneme, with quantification of the frequency and speed of anterograde IFT trains. Fig. S4 shows the conversion of anterograde trains to retrograde trains at the distal tip, with magnification of a region of interest at this position. Kymograph analysis reveals the fragmentation of individual anterograde trains in smaller retrograde trains that remain on the same side of the axoneme. No evidence for transfer between the left and right tracks could be observed. Video 1 shows the stack of original data of WT trypanosomes analyzed by FIB-SEM, where several cells are visible with all typical organelles including the flagellum. The position of three IFT trains present in the flagellum of the cell located in the center of the field is indicated. The same cell has been used for the segmentation analysis presented in Fig. 3. Video 2 is a reconstruction showing only individual flagella of the stack from Video 1 with IFT trains colored in red. The volume is then rotated in all dimensions to visualize the positioning of IFT trains. Video 3 shows live acquisition of a cell expressing mNG::IFT81 with robust bidirectional IFT. Video 4 is another live acquisition, this time by SIM of a cell expressing GFP::IFT52, showing the existence of two tracks for IFT trafficking. Videos 5 and 6 are live imaging by high-resolution microscopy using a 1.57 NA objective of a cell expressing mNG::IFT81 or using a 1.49 NA objective of a cell expressing GFP::IFT52, respectively. In both cases, bidirectional IFT trafficking is visible

on two distinct lines. Similarly, Video 7 shows live imaging by high-resolution microscopy using a 1.57 NA objective of a cell expressing GFP::DHC2.2, where bidirectional IFT trafficking is visible on two distinct lines. Video 8 represents live imaging by conventional microscopy using a 1.40 NA objective of a cell expressing mNG::IFT81 (green) and TdT::DHC2.1 (magenta), where the two proteins colocalize on moving and standing trains. The video is completed with the kymograph analysis at Fig. 6 C. Video 9 shows live imaging by high-resolution microscopy using a 1.57 NA objective of a cell expressing mNG::IFT81. Focusing on the distal tip reveals the transit and turnaround of IFT material during the conversion of anterograde to retrograde trains. Videos 9 and 10 show live imaging by high-resolution microscopy of cells expressing GFP::IFT52 focusing on the distal tip to reveal the conversion of anterograde to retrograde trains. Video 10 is further analyzed in Fig. 7.

Acknowledgments

We thank Sylvie Perrot for the preparation of samples for FIB-SEM, Audrey Salles for the SIM acquisition performed on the Elyra SP1 system, Derrick Robinson (Bordeaux University, Bordeaux, France) for providing the Mab25 antibody, and Linda Kohl for critical reading of the manuscript. We thank Adrien Vuillaume for support and interest for this project. We are grateful to the Photonic Bioimaging and Ultrastructural Bioimaging facilities for access to their equipment. Some SIM and high-resolution microscopy work was performed at the Advanced Imaging Centre, Janelia Research Campus, jointly sponsored by the Howard Hughes Medical Institute and the Gordon and Betty Moore Foundation. We are grateful to Lin Shao for training and advice. The generosity and reactivity of Jim Morris are warmly acknowledged for having made this project feasible.

E. Bertiaux is supported by fellowships from French National Ministry for Research and Technology (doctoral school CDV515) and from La Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20170436836). C. Fort was 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 Agence Nationale de la Recherche grants (11-BSV8-016 and 14-CE35-0009-01), by La Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20150734356), and by a French Government Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (ANR-10-LABX-62-IBEID). We are also grateful for support for FESEM Zeiss Auriga and Elyra PS1 equipment from the French Government Program Investissements d'Avenir France BioImaging (N° ANR-10-INSB-04-01) and from a DIM-Malinif grant from the Région Ile-de-France. Travel to the Advanced Imaging Center at Janelia Farm Research Campus was supported by the Centre d'Innovation et Recherche Technologique of the Institut Pasteur.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: E. Bertiaux segmented FIB-SEM data, conducted live-cell acquisition with the mNG::IFT81 or mNG::IFT81/TdT::DHC2.1 cell lines, extracted and analyzed the kymographs, performed the statistical analyses on IFT

Bertiaux et al.

IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology

<https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

4294

Downloaded from <http://jcb.rupress.org/jcb/article-pdf/217/12/4284/864980> by guest on 22 September 2020



trafficking, and contributed to figure preparation. A. Mallet acquired the FIB-SEM data, segmented them, and produced the corresponding videos as well as the analysis of kymographs and the acquisition of GFP::DHC2.2 images at high resolution. C. Fort prepared samples for FIB-SEM and carried out several segmentations, conducted the GFP::IFT52 acquisition, and performed kymograph analyses. T. Blisnick produced the cell line expressing GFP::IFT52, acquired the still images of mNG::IFT81 cell line, and assembled the figures. S. Bonnefoy developed the PFA/methanol fixation protocol and performed immunofluorescence data and acquisition. J. Jung characterized the mNG::IFT81-expressing cell line, performed several kymograph analyses, and contributed to setting up the high-NA microscopy in Institut Pasteur. M. Lemos acquired TEM images and was responsible for measurement of the diameter of the axoneme. S. Marco contributed to statistical analysis. S. Vaughan participated in the coordination of the 3D EM project. S. Trépot developed the scripts to perform the measurements of IFT trains (length and distance with the microtubule doublets) from FIB-SEM data and performed the corresponding statistical analysis to identify train subpopulations. J.-Y. Tinevez designed the live-imaging project performed at the Janelia Farm Research Campus and participated to the high-resolution video acquisition and quantification. P. Bastin conceived and coordinated the project and wrote the paper with contributions from all authors.

Submitted: 9 May 2018
 Revised: 6 August 2018
 Accepted: 21 September 2018

References

Absalon, S., T. Blisnick, L. Kohl, G. Toutirais, G. Doré, D. Julkowska, A. Tavenet, and P. Bastin. 2008. Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes. *Mol. Biol. Cell.* 19:929–944. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0749>

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.* 122:834–841. <https://doi.org/10.1242/jcs.040444>

Arganda-Carreras, I., R. Fernández-González, A. Muñoz-Barrutia, and C. Ortiz-De-Solorzano. 2010. 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc. Res. Tech.* 73:1019–1029. <https://doi.org/10.1002/jemt.20829>

Ball, G., J. Demmerle, R. Kaufmann, I. Davis, I.M. Dobbie, and L. Schermelleh. 2015. SIMcheck: a Toolbox for Successful Super-resolution Structured Illumination Microscopy. *Sci. Rep.* 5:15915. <https://doi.org/10.1038/srep15915>

Bastin, P., T. Sherwin, and K. Gull. 1998. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature.* 391:548. <https://doi.org/10.1038/35300>

Beales, P.L., E. Bland, J.L. Tobin, C. Bacchelli, B. Tuysuz, J. Hill, S. Rix, C.G. Pearson, M. Kai, J. Hartley, et al. 2007. IFT80, which encodes a conserved intraflagellar transport protein, is mutated in Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Nat. Genet.* 39:727–729. <https://doi.org/10.1038/ng2038>

Benaglia, T., D. Chauveau, D. Hunter, and D. Young. 2009. mixtools: An R Package for Analyzing Finite Mixture Models. *J. Stat. Softw.* 32:1–29. <https://doi.org/10.18637/jss.v032.i06>

Berriman, M., E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, G. Blandin, H. Renaud, D.C. Bartholomeu, N.J. Lennard, E. Caler, N.E. Hamlin, B. Haas, et al. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science.* 309:416–422. <https://doi.org/10.1126/science.1112642>

Besschetnova, T.Y., E. Kolpakova-Hart, Y. Guan, J. Zhou, B.R. Olsen, and J.V. Shah. 2010. Identification of signaling pathways regulating primary cilium length and flow-mediated adaptation. *Curr. Biol.* 20:182–187. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.072>

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.* 341:1009–1012. <https://doi.org/10.1126/science.1240985>

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.* 25:2620–2633. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-05-0961>

Bolte, S., and F.P. Cordelières. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224:213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>

Bonnefoy, S., C.M. Watson, K. Kernohan, M. Lemos, S. Hutchinson, J. Poulter, L. Crinnion, C. O’Callaghan, R. Hirst, A. Rutman, et al. 2018. Biallelic Mutations in LRRC56 encoding a protein associated with intraflagellar transport, cause mucociliary clearance and laterality defects. *bioRxiv.* (Preprint posted on March 27, 2018) <https://doi.org/10.1101/288852>

Bosch Grau, M., G. Gonzalez Curto, C. Rocha, M.M. Magiera, P. Marques Sousa, T. Giordano, N. Spassky, and C. Janke. 2013. Tubulin glycyloses and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia. *J. Cell Biol.* 202:441–451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305041>

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.* 119:3443–3455. <https://doi.org/10.1242/jcs.03078>

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.* 440:224–227. <https://doi.org/10.1038/nature04541>

Brooks, E.R., and J.B. Wallingford. 2012. Control of vertebrate intraflagellar transport by the planar cell polarity effector Fuz. *J. Cell Biol.* 198:37–45. <https://doi.org/10.1083/jcb.201204072>

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

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.* 126:327–338. <https://doi.org/10.1242/jcs.117069>

Burkard, G., C.M. Frago, and I. Roditi. 2007. Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 153:220–223. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.02.008>

Casanova, M., F. de Monbrison, J. van Dijk, C. Janke, M. Pagès, and P. Bastien. 2015. Characterisation of polyglutamylases in trypanosomatids. *Int. J. Parasitol.* 45:121–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.09.005>

Chan, K.Y., and K. Ersfeld. 2010. The role of the Kinesin-13 family protein TbKif13-2 in flagellar length control of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 174:137–140. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.08.001>

Chenouard, N., J. Buisson, I. Bloch, P. Bastin, and J.C. Olivo-Marin. 2010. Curvelet analysis of kymograph for tracking bi-directional particles in fluorescence microscopy images. *International Conference on Image Processing.* <https://doi.org/10.1109/ICIP.2010.5652479>

Chien, A., S.M. Shih, R. Bower, D. Tritschler, M.E. Porter, and A. Yildiz. 2017. Dynamics of the IFT machinery at the ciliary tip. *eLife.* 6:e28606. <https://doi.org/10.7554/eLife.28606>

Coutton, C., A.S. Vargas, A. Amiri-Yekta, Z.E. Kherraf, S.F. Ben Mustapha, P. Le Tanno, C. Wambergue-Légrand, T. Karaouzène, G. Martinez, S. Crouzy, et al. 2018. Mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility and flagellum defects in *Trypanosoma* and human. *Nat. Commun.* 9:686. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02792-7>

Craft, J.M., J.A. Harris, S. Hyman, P. Kner, and K.F. Lechtreck. 2015. Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism. *J. Cell Biol.* 208:223–237. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409036>

Dacheux, D., N. Landrein, M. Thonnus, G. Gilbert, A. Sahin, H. Wodrich, D.R. Robinson, and M. Bonhivers. 2012. A MAP6-related protein is present in protozoa and is involved in flagellum motility. *PLoS One.* 7:e31344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031344>

Dagoneau, N., M. Goulet, D. Geneviève, Y. Sznajer, J. Martinovic, S. Smithson, C. Huber, G. Baujat, E. Flori, L. Tecco, et al. 2009. DYNC2H1 mutations cause asphyxiating thoracic dystrophy and short rib-polydactyly syndrome, type III. *Am. J. Hum. Genet.* 84:706–711. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.016>

Bertiaux et al.
 IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology
<https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

Downloaded from http://www.jcb.org/jcb/article-pdf/217/12/4284/864980/jcb_201805030.pdf by guest on 22 September 2020



Dean, S., J.D. Sunter, and R.J. Wheeler. 2017. TrypTag.org: A Trypanosome Genome-wide Protein Localisation Resource. *Trends Parasitol.* 33:80–82. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.009>

de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, et al. 2012. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods.* 9:690–696. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2075>

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.* 187:615–622. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903139>

Gadelha, C., B. Wickstead, P.G. McKean, and K. Gull. 2006. Basal body and flagellum mutants reveal a rotational constraint of the central pair microtubules in the axonemes of trypanosomes. *J. Cell Sci.* 119:2405–2413. <https://doi.org/10.1242/jcs.02969>

Gustafsson, M.G. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* 198:82–87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>

Gustafsson, M.G., L. Shao, P.M. Carlton, C.J. Wang, I.N. Golubovskaya, W.Z. Cande, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 2008. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys. J.* 94:4957–4970. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120345>

Halbritter, J., A.A. Bizet, M. Schmidts, J.D. Porath, D.A. Braun, H.Y. Gee, A.M. McInerney-Leo, P. Krug, E. Filhol, E.E. Davis, et al. UK10K Consortium. 2013. Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 93:915–925. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.012>

Heuser, T., C.F. Barber, J. Lin, J. Krell, M. Rebesco, M.E. Porter, and D. Nicastro. 2012. Cryoelectron tomography reveals doublet-specific structures and unique interactions in the II dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:E2067–E2076. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120690109>

Höög, 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:e0004312. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004312>

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. <https://doi.org/10.7554/eLife.02419>

Hughes, L.C., K.S. Ralston, K.L. Hill, and Z.H. Zhou. 2012. Three-dimensional structure of the Trypanosome flagellum suggests that the paraflagellar rod functions as a biomechanical spring. *PLoS One.* 7:e25700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025700>

Hughes, L., S. Borrett, K. Towers, T. Starborg, and S. Vaughan. 2017. Patterns of organelle ontogeny through a cell cycle revealed by whole-cell reconstructions using 3D electron microscopy. *J. Cell Sci.* 130:637–647. <https://doi.org/10.1242/jcs.198887>

Imboden, M., N. Müller, A. Hemphill, R. Mattioli, and T. Seebeck. 1995. Repetitive proteins from the flagellar cytoskeleton of African trypanosomes are diagnostically useful antigens. *Parasitology.* 110:249–258. <https://doi.org/10.1017/S0033182000080835>

Iomini, C., V. Babaev-Khaimov, M. Sassaroli, and G. Piperno. 2001. Protein particles in Chlamydomonas flagella undergo a transport cycle consisting of four phases. *J. Cell Biol.* 153:13–24. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.13>

Janke, C., K. Rogowski, D. Wloga, C. Regnard, A.V. Kajava, J.M. Strub, N. Temurak, J. van Dijk, D. Boucher, A. van Dorsselaer, et al. 2005. Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science.* 308:1758–1762. <https://doi.org/10.1126/science.1113010>

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.* 154:103–109. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.03.012>

Kizilyaprak, C., J. Daraspe, and B.M. Humbel. 2014. Focused ion beam scanning electron microscopy in biology. *J. Microsc.* 254:109–114. <https://doi.org/10.1111/jmi.12127>

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.* 46:105–109. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04592.x>

Konno, A., M. Setou, and K. Ikegami. 2012. Ciliary and flagellar structure and function--their regulations by posttranslational modifications of axonemal tubulin. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 294:133–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394305-7.00003-3>

Koyfman, A.Y., M.F. Schmid, L. Gheiratmand, C.J. Fu, H.A. Khan, D. Huang, C.Y. He, and W. Chiu. 2011. Structure of Trypanosoma brucei flagellum accounts for its bihelical motion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:11105–11108. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103634108>

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. USA.* 90:5519–5523. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5519>

Kubo, T., J.M. Brown, K. Bellve, B. Craige, J.M. Craft, K. Fogarty, K.F. Lechtreck, and G.B. Witman. 2016. Together, the IFT81 and IFT74 N-termini form the main module for intraflagellar transport of tubulin. *J. Cell Sci.* 129:2106–2119. <https://doi.org/10.1242/jcs.187120>

Kuhns, S., and O.E. Blacque. 2016. Cilia Train Spotting. *Dev. Cell.* 37:395–396. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.05.016>

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.* 122:1081–1090. <https://doi.org/10.1242/jcs.045740>

Lee, J.E., J.L. Silhavy, M.S. Zaki, J. Schroth, S.L. Bielas, S.E. Marsh, J. Olvera, F. Brancati, M. Iannicelli, K. Ikegami, et al. 2012. CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. *Nat. Genet.* 44:193–199. <https://doi.org/10.1038/ng.1078>

Li, D., L. Shao, B.C. Chen, X. Zhang, M. Zhang, B. Moses, D.E. Milkie, J.R. Beach, J.A. Hammer III, M. Pasham, et al. 2015. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science.* 349:aab3500. <https://doi.org/10.1126/science.aab3500>

Lin, J., T. Heuser, K. Song, X. Fu, and D. Nicastro. 2012. One of the nine doublet microtubules of eukaryotic flagella exhibits unique and partially conserved structures. *PLoS One.* 7:e46494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046494>

Mijalkovic, J., B. Prevo, F. Oswald, P. Mangeol, and E.J. Peterman. 2017. Ensemble and single-molecule dynamics of IFT dynein in Caenorhabditis elegans cilia. *Nat. Commun.* 8:14591. <https://doi.org/10.1038/ncomms14591>

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.* <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010538>

Pathak, N., C.A. Austin, and I.A. Drummond. 2011. Tubulin tyrosine ligase-like genes tll3 and tll6 maintain zebrafish cilia structure and motility. *J. Biol. Chem.* 286:11685–11695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.209817>

Perrault, I., S. Saunier, S. Hanein, E. Filhol, A.A. Bizet, F. Collins, M.A. Salih, S. Gerber, N. Delphin, K. Bigot, et al. 2012. Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 90:864–870. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.006>

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.* 187:135–148. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905103>

Pradel, L.C., M. Bonhivers, N. Landrein, and D.R. Robinson. 2006. NIMA-related kinase Tbnrkc is involved in basal body separation in Trypanosoma brucei. *J. Cell Sci.* 119:1852–1863. <https://doi.org/10.1242/jcs.02900>

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.* 17:1536–1545. <https://doi.org/10.1038/ncb3263>

Prevo, B., J.M. Scholey, and E.J.G. Peterman. 2017. Intraflagellar transport: mechanisms of motor action, cooperation, and cargo delivery. *FEBS J.* 284:2905–2931. <https://doi.org/10.1111/febs.14068>

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.* 5:696–711. <https://doi.org/10.1128/EC.5.4.696-711.2006>

R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. See information at <https://stat.ethz.ch/pipermail/r-help/2014-October/422975.html>

Ringo, D.L. 1967. Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in Chlamydomonas. *J. Cell Biol.* 33:543–571. <https://doi.org/10.1083/jcb.33.3.543>

Rogowski, K., F. Juge, J. van Dijk, D. Wloga, J.M. Strub, N. Levilliers, D. Thomas, M.H. Bré, A. Van Dorsselaer, J. Gaertig, and C. Janke. 2009. Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. *Cell.* 137:1076–1087. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.020>

Downloaded from <http://www.jcb.org/jcb/article-pdf/171/12/4284/884980/jcb.201805030.pdf> by guest on 22 September 2020

Bertiaux et al.
IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology
<https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

4296

Supplemental material

Bertiaux et al., <https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

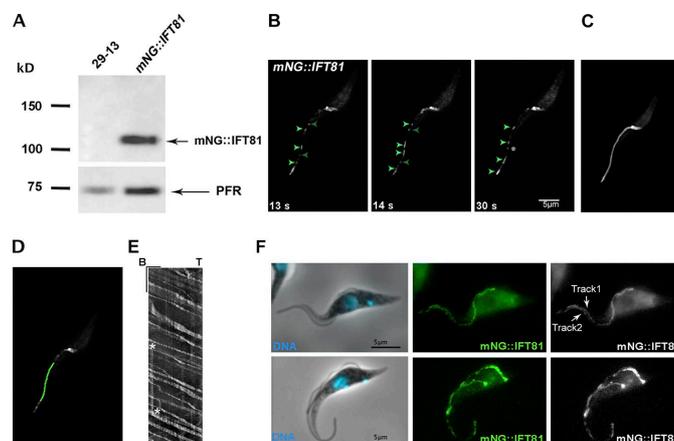


Figure S1. **Endogenous tagging of IFT81 with mNG provides a clean marker for monitoring IFT.** (A) Western blotting with an anti-mNG antibody reveals the expected mobility on SDS-PAGE. No signal is detected with the 29-13 (Wirtz et al., 1999) control cell line. The L13D6 monoclonal antibody recognizing the PFR proteins was used as loading control. (B) Still images of Video 3 showing anterograde (green arrowheads) and retrograde (dark green arrowheads) IFT trafficking in a uniflagellated cell using conventional light microscopy. Focusing was made on the flagellum, and the base of the flagellum is not in the same plane. This cell is growing a new flagellum that is very short and partially overlaps with the mature flagellum. The asterisk shows an arrested IFT train. (C) Temporal projection showing only one track in these imaging conditions. (D and E) A region of interest was drawn on the indicated position of the image (D), and the kymograph was extracted, showing typical robust anterograde and more discrete retrograde trains (E). B, base; T, tip. The position of the arrested train marked in B is highlighted with asterisks. Bars: 2.5 μ m (horizontal bar); 2.5 s (vertical bar). (F) Cells expressing mNG::IFT81 were fixed using the paraformaldehyde-methanol protocol, and direct imaging of mNG::IFT81 fluorescence was performed, revealing the existence of two parallel lines in mature and growing flagella. The base of both types of flagella is clearly visible on the bottom image.

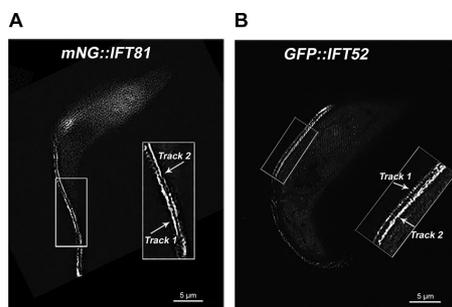


Figure S2. **SIM imaging in live cells reveals trafficking on two separate sides of the axoneme.** (A) SIM images showing the presence of IFT trains on two separate sides of the axoneme in cells expressing the mNG::IFT81 fusion protein. 15 images per plane per channel (five phases and three angles) were acquired to perform the SIM image. (B) Temporal projection of images coming from Video 4 in cells expressing the GFP::IFT52 fusion protein showing the presence of IFT trains on two sides of the axoneme. Areas in rectangles have been magnified to show the two tracks. However, temporal resolution is not sufficient to determine the orientation of trafficking.

Bertiaux et al.
IFT is restricted to a subset of microtubules

Journal of Cell Biology
<https://doi.org/10.1083/jcb.201805030>

S15

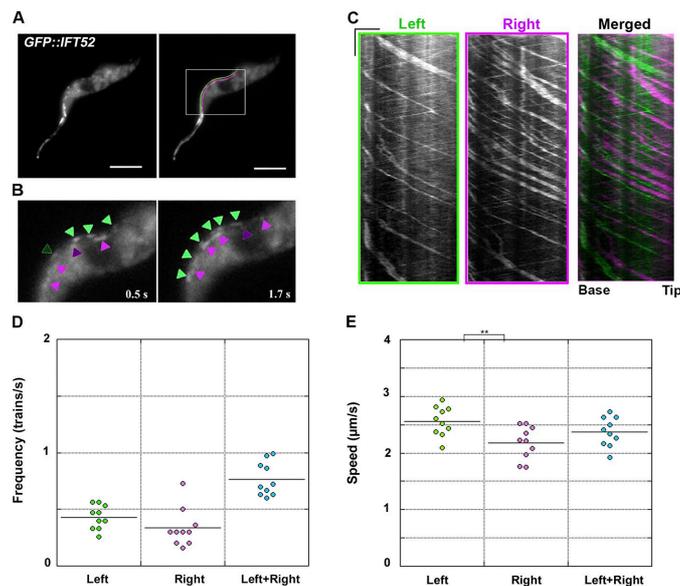


Figure S3. **Bidirectional IFT trafficking takes place on two sides of the axoneme in live trypanosomes expressing GFP::IFT52.** (A) Individual images from Video 6 showing the presence of two traces for IFT in the flagellum. The IFT pool at the base is out of the plane of focus. The left (green) and right (magenta) sides were defined after orientating the cell with the posterior end on top of the image and the flagellum on the left-hand side. Bars, 5 μm. (B) Still images from Video 6 of live trypanosomes expressing GFP::IFT52 imaged at high resolution. Green and magenta arrowheads indicate trains on the left and right tracks, with lighter arrowheads pointing at anterograde trains and darker arrowheads showing retrograde trains. (C) Kymograph analysis of the same cell showing the left (green), the right (magenta), and the merged images. Bars: 2 μm (horizontal bar); 2 s (vertical bar). (D) Dot plot of the frequency of anterograde IFT trains visible on the left (green) and the right (magenta) side and the sum of both (cyan). (E) Dot plot but for the speed of anterograde trains. Values are coming from 10 different cells containing 248 trains. Only statistically significant differences are shown (one-way ANOVA test). **, P = 0.0067.

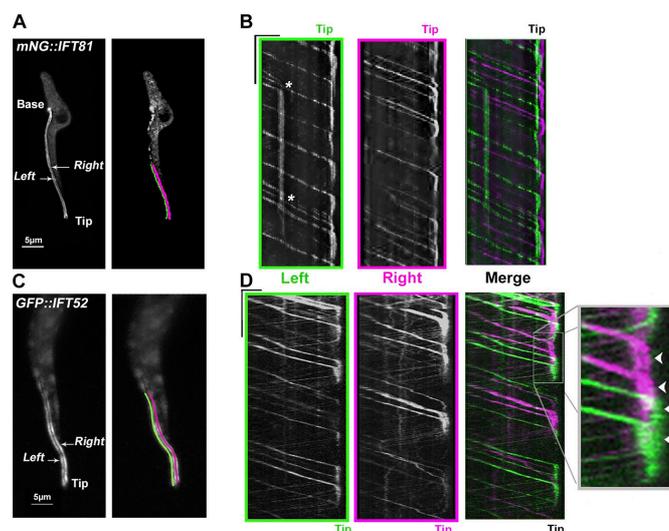
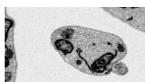


Figure S4. **Anterograde trains are converted to retrograde trains after a transition period at the distal tip.** (A) Temporal projection of the flagellum in a cell expressing mNG::IFT81. The region of interest at the tip of the flagellum is indicated with left (green) and right (magenta) sides of the axoneme. See corresponding Video 9. (B) Kymographs for each side shown in corresponding colors. At the distal end, IFT proteins present in anterograde trains transit for a few seconds before returning in smaller and less bright retrograde trains. Note the presence of an anterograde train that arrested for a few seconds before the material it contained was picked up by other anterograde trains (asterisks). (C) The distal tip of a cell expressing GFP::IFT52 was photobleached, and the transition from anterograde to retrograde trains was monitored in the indicated region of interest. (D) Kymographs are highlighted in green and magenta as above. Bars: 2.5 µm (horizontal bar); 5 s (vertical bar). The enlarged portion shows the distal end of the flagellum, where fluorescent proteins present in anterograde trains are seen transiting for a few seconds (white arrowheads) before leaving in association with multiple but discrete retrograde trains. No evidence for transfer between the left and rights tracks could be observed.

Video 1. **3D view of WT trypanosomes analyzed by FIB-SEM with the stack of original data where several cells are visible with all typical organelles including the flagellum.** The position of three IFT trains present in the flagellum of the cell located in the center of the field is indicated with arrowheads. The video pauses each time a new IFT train has been annotated. The same cell was used for the segmentation analysis presented in Fig. 3. The same reference numbers were used for these IFT trains (IFT2, IFT3, and IFT4). To reduce the size of the video, only a portion of the stack is shown. It does not contain the full flagellum explaining why the train labeled IFT1 is not visible.



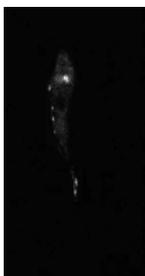
Video 2. **Individual flagella of the stack from Video 1 are shown in different colors, and the IFT trains are shown in red.** The volume is then rotated in all dimensions to visualize the positioning of IFT trains.



Video 3. **Live imaging of a cell expressing mNG::IFT81 showing robust bidirectional IFT.** Video is shot in real time.



Video 4. **Live imaging by SIM of a cell expressing GFP::IFT52 showing the existence of two tracks for IFT trafficking.** Time series were acquired for a total of 14 s. Although the spatial resolution allows the distinction of two tracks, the time resolution is not sufficient to discriminate individual IFT trains on them. Video is shot in real time.



Video 5. **Live imaging by high-resolution microscopy using a 1.57 NA objective of a cell expressing mNG::IFT81.** Bidirectional IFT trafficking is visible on two distinct lines. The spatial resolution allows the distinction of two sides of the axoneme, and the time resolution permits the discrimination of individual IFT trains on each of them. Video is shot in real time.



Video 6. **Live imaging by high-resolution microscopy using a 1.49 NA objective of a cell expressing GFP::IFT52.** Bidirectional IFT trafficking is visible on two distinct lines. The spatial resolution allows the distinction of two sides of the axoneme, and the time resolution permits the discrimination of individual IFT trains on each of them. Video is shot in real time.



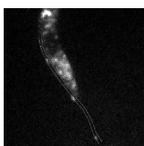
Video 7. **Live imaging by high-resolution microscopy using a 1.57 NA objective of a cell expressing GFP::DHC2.2.** Bidirectional IFT trafficking is visible on two distinct lines. The spatial resolution allows the distinction of two sides of the axoneme, and the time resolution permits the discrimination of individual IFT trains on each of them. Video is shot in real time.



Video 8. **Live imaging by conventional microscopy using a 1.40 NA objective of a cell expressing mNG::IFT81 (green) and Tdt::DHC2.1 (magenta).** The two proteins colocalize on moving and standing trains (see kymograph analysis in Fig. 6 C). Video is shot in real time.



Video 9. **Live imaging by high-resolution microscopy using a 1.57 NA objective of a cell expressing mNG::IFT81.** Focusing on the distal tip reveals the transit and turnaround of IFT material during the conversion of anterograde to retrograde trains. Video is shot in real time.



Video 10. **Live imaging by high-resolution microscopy using a 1.49 NA objective of a cell expressing GFP::IFT52.** Focusing on the distal tip reveals the transit and turnaround of IFT material during the conversion of anterograde to retrograde trains. For technical reasons, the bleaching event could not be recorded, and only the recovery phase can be presented. See Fig. 7 for a detailed legend. Video is shot in real time.

Intraflagellar transport during assembly of flagella of different length in *Typanosoma brucei* isolated from tsetse flies.

Bertiaux E, Mallet A, Rotureau B, Bastin P.

J Cell Sci. 2020 Aug 25;jcs.248989. doi: 10.1242/jcs.248989.

PMID: 32843573

Résumé :

Les organismes multicellulaires assemblent des cils et des flagelles de longueurs précises en fonction du type cellulaire. De même, les protistes assemblent des flagelles de longueur différente selon le stade de développement de leur cycle de vie. Par exemple, *Typanosoma brucei* construit successivement des flagelles de 3 à 30 µm de longueur, ce qui permet d'examiner comment les cellules modulent naturellement la longueur de ces organites. Les flagelles sont construits par l'ajout de nouveaux blocs à leur extrémité distale via le transport intraflagellaire (IFT). Une combinaison d'analyses d'immunofluorescence, de microscopie électronique 3D et d'imagerie sur cellules vivantes a révélé que l'IFT était détecté lors de tous les stades du cycle de vie. En plus d'un pool de protéines IFT concentré à la base, les trains IFT sont situés le long des doublets 3-4 et 7-8 et voyagent en direction antérograde et rétrograde dans le flagelle. La quantité totale de protéines IFT est en corrélation avec la longueur du flagelle à tous les stades, à l'exception du cas du flagelle le plus court qui présente une grande quantité de matériel IFT dynamique à son extrémité distale.

Contribution :

Le travail portant sur les parasites de la mouche a été initié et conduit par Eloïse Bertiaux, étudiante en thèse et premier auteur de la publication. Dans cet article, ma contribution a été de mettre au point une méthode d'analyse pour pouvoir observer en FIB-SEM les parasites à l'intérieur du cardia de la mouche et de déterminer le positionnement des trains IFT. En microscopie électronique tridimensionnelle, le principal facteur limitant est le repérage de la région d'intérêt dans l'échantillon. En effet, après la préparation d'échantillon, il est difficile de se localiser dans un organe. Une méthode corrélative entre la microscopie photonique sur coupe de cardia de mouche tsé-tsé et le FIB-SEM a été mise au point. Dans cette publication, cette méthode a permis de localiser la région d'intérêt sur une coupe semi-fine contrastée au bleu de toluidine avant une analyse en microscopie électronique en transmission, puis en FIB-SEM. Cette technique pourra être appliquée à d'autres projets sur tissus (par exemple pour les glandes salivaires où on rencontre différents stades de développement de *T. brucei*), mais aussi dans d'autres contextes. Un exemple pourrait être la recherche de cellules particulières dans un tissu ou un épithélium complexe, comme l'épithélium respiratoire.

RESEARCH ARTICLE

Intraflagellar transport during assembly of flagella of different length in *Trypanosoma brucei* isolated from tsetse flies

Eloïse Bertiaux^{1,2}, Adeline Mallet^{1,2,3}, Brice Rotureau¹ and Philippe Bastin^{1,*}

ABSTRACT

Multicellular organisms assemble cilia and flagella of precise lengths differing from one cell to another, yet little is known about the mechanisms governing these differences. Similarly, protists assemble flagella of different lengths according to the stage of their life cycle. *Trypanosoma brucei* assembles flagella of 3 to 30 µm during its development in the tsetse fly. This provides an opportunity to examine how cells naturally modulate organelle length. Flagella are constructed by addition of new blocks at their distal end via intraflagellar transport (IFT). Immunofluorescence assays, 3D electron microscopy and live-cell imaging revealed that IFT was present in all *T. brucei* life cycle stages. IFT proteins are concentrated at the base, and IFT trains are located along doublets 3–4 and 7–8 and travel bidirectionally in the flagellum. Quantitative analysis demonstrated that the total amount of flagellar IFT proteins correlates with the length of the flagellum. Surprisingly, the shortest flagellum exhibited a supplementary large amount of dynamic IFT material at its distal end. The contribution of IFT and other factors to the regulation of flagellum length is discussed.

KEY WORDS: Cilia, Flagella, Organelle length, Intraflagellar transport, Trypanosomes, Tsetse fly

INTRODUCTION

Cilia and flagella are typical eukaryotic organelles found in numerous organisms. They share a similar architecture based on a cylinder of nine doublet microtubules (with an additional central pair for most motile organelles) but their length varies substantially from one organism to the other and even from one cell type to another within the same organism. Several proteins involved in ciliary length control have been identified, but the actual mechanisms regulating this length are still debated (Broekhuis et al., 2013; Goehring and Hyman, 2012; Ishikawa and Marshall, 2017; Keeling et al., 2016; Lechtreck et al., 2017). These organelles are constructed by addition of new subunits at their distal end (Bastin et al., 1999; Johnson and Rosenbaum, 1992). Since flagella do not contain ribosomes, a transport process called intraflagellar transport (IFT) is required to bring precursors from the cytoplasm of the cell body to the assembly site (Craft et al., 2015; Kozminski

et al., 1993; Wren et al., 2013). IFT is the movement of large protein arrays (or trains) made of 20 IFT proteins driven by molecular motors – kinesin II for anterograde transport and cytoplasmic dynein 2 for retrograde transport (Prevo et al., 2017). This process is conserved in all organisms assembling cilia and flagella on a protrusion of the cell body (Avidor-Reiss and Leroux, 2015).

Because of its central function in flagellum construction, IFT is a prime candidate for flagellum length regulation. In *Chlamydomonas reinhardtii* and *Caenorhabditis elegans*, cilia and flagella undergo turnover of tubulin at their distal end, and their length has been proposed to be the result of a balance between assembly and disassembly rates (Hao et al., 2011; Marshall and Rosenbaum, 2001). These rates can be modulated by changes in train length (Engel et al., 2009) and frequency (Ludington et al., 2013), and/or by loading of flagellar precursors on trains (Craft et al., 2015; Wren et al., 2013). The molecular mechanisms controlling these parameters remain to be elucidated, with protein phosphorylation emerging as a potential candidate (Liang et al., 2018; Wang et al., 2019). The majority of these studies have been performed in the green algae *Chlamydomonas*, which is a powerful model for the study of flagellum assembly. It constructs two flagella of equivalent length that can be manipulated by various genetic and biochemical approaches (Dutcher, 2014).

Although these manipulations offer great tools to investigate the mechanisms involved in flagellum length control, they might not necessarily reflect the main pathways by which cells control the length of their organelle in natural conditions. In that context, protists are interesting organisms, as they can naturally assemble flagella of different lengths according to their stage of development. Some of them even possess several types of flagella in the same cell, implying the need to discriminate between them, both in terms of construction and function (Bertiaux and Bastin, 2020; Bertiaux et al., 2018b; McNally et al., 2019). *Trypanosoma brucei* is a typical example and exhibits multiple life cycle stages characterised by flagella ranging from 3 µm to more than 30 µm (Rotureau et al., 2011; Sharma et al., 2008; Van Den Abbeele et al., 1999) (Fig. 1). It therefore offers the possibility to investigate which parameters are modulated to build flagella of different length.

Trypanosomes are parasites infecting mammals via the bite of the tsetse fly. In mammals, they are found at the bloodstream form stage (Fig. 1). In the insect, they first develop in the midgut as the procyclic stage. Cells at this stage possess a single flagellum that is attached to the cell body and emerges from the posterior end of the cell. This configuration is termed trypomastigote (Fig. 1). This stage is proliferative and can be grown in culture. Trypanosomes then transform into the so-called mesocyclic stage (Rotureau et al., 2011; Sharma et al., 2008; Van Den Abbeele et al., 1999), which is defined by the presence of a longer flagellum. However, since there are no molecular markers and that these cells seem to be able to revert at the procyclic stage in certain conditions (Van Den Abbeele et al., 1999), we prefer to use the term long trypomastigote (Fig. 1). These parasites migrate to the cardia (proventriculus) and

¹Trypanosome Cell Biology Unit, INSERM U1201, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. ²Sorbonne Université école doctorale complexité du vivant, ED 515, 7, quai Saint-Bernard, case 32, 75252 Paris Cedex 05, France. ³Ultrastructural Bio Imaging Unit, C2RT, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

*Author for correspondence (pbastin@pasteur.fr)

© E.B., 0000-0001-6593-083X; B.R., 0000-0003-0671-8999; P.B., 0000-0002-3042-8679

Handling Editor: David Stephens
Received 14 May 2020; Accepted 10 August 2020

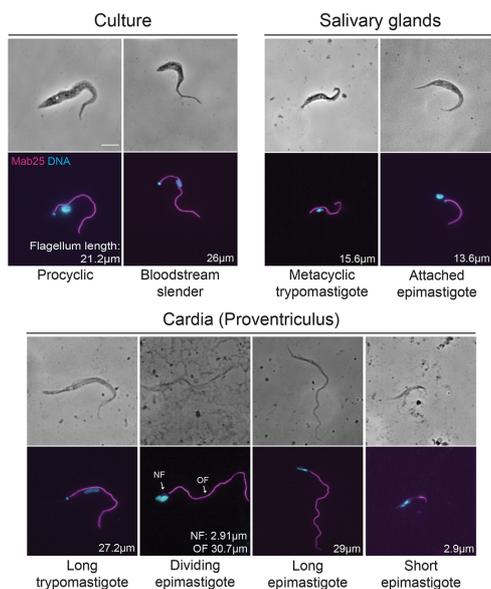


Fig. 1. Evolution of flagellum length during the parasite cycle. The main morphological stages of the *T. brucei* parasite cycle encountered in the tsetse fly vector are presented, as well as the two forms that can be grown in culture. Parasites were fixed with cold methanol and stained with DAPI (cyan) and the Mab25 antibody (magenta) that recognises an axoneme component (Dacheux et al., 2012). Flagellum length was measured using the Mab25 marker and is indicated for each stage. Data is from Rotureau et al. (2011), with the exception of dividing epimastigote cells that were specifically analysed in this study ($n=37$). Scale bar: 5 μ m.

concomitantly undergo exhaustive morphogenetic modifications to become epimastigote (Lemos et al., 2020; Sharma et al., 2008). The epimastigote configuration is defined by the emergence of the flagellum at the anterior part of the cell (Fig. 1). These cells divide asymmetrically, producing a long epimastigote daughter that inherits the old flagellum (~30 μ m) and a short epimastigote daughter with a tiny flagellum (~3 μ m) (Fig. 1). Once parasites have reached the salivary glands, they attach to the epithelium via large outgrowths of the flagellar membrane (Tetley and Vickerman, 1985), constituting the attached epimastigote stage, then switch to the trypanmastigote configuration during the emergence of the metacyclic stage (Fig. 1) that is released in the saliva and ready for transmission. The mechanisms governing the formation of these different types of flagella are unknown. Investigation has been complicated by the absence of cultivation system for most of these stages and therefore requires analysis of parasites extracted from infected tsetse flies.

All IFT-encoding genes are conserved in trypanosomes (Morga and Bastin, 2013), and functional investigation by means of RNAi knockdown has revealed that they are essential for flagellum construction (Absalon et al., 2008; Davidge et al., 2006; Franklin and Ullu, 2010; Kohl et al., 2003). IFT trafficking itself has been investigated exhaustively in the procyclic stage, which is amenable to cell culture and manipulation. The frequency and speed of anterograde (~1 train/s and ~2 μ m/s) and retrograde trafficking (~2–3 trains/s and ~5 μ m/s) have been determined using live analysis of the movement of various IFT proteins such as IFT22

(Adhiambo et al., 2009), IFT25 (Huet et al., 2019), IFT27 (Huet et al., 2014), IFT52 (Buisson et al., 2013) and IFT81 (Bhogaraju et al., 2013), as well as several subunits of the dynein motors (Blisnick et al., 2014).

Here, we investigated IFT in several natural life cycle stages of *T. brucei*, which exhibit flagella of different lengths. We mostly focused on trypanosomes present in the anterior midgut and the cardia of infected tsetse flies where the most extreme differences in flagellum length have been reported (Rotureau et al., 2011; Sharma et al., 2008; Van Den Abbeele et al., 1999). Conventional transmission electron microscopy and focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) revealed the presence of IFT trains in the flagellum of trypanosomes found in the cardia. Immunofluorescence assays using two different antibodies and monitoring of live trypanosomes expressing a fluorescent IFT protein showed the presence of IFT in all stages analysed, from procyclic in the midgut to metacyclic in the saliva. IFT trafficking was clearly visible in all cells observed; however, video recording turned out to be extremely challenging due to the high flagellum beating rate and the difficulty in immobilising cells without damage. Nevertheless, quantification of the IFT amount could be achieved in fixed cells for all stages and live IFT tracking was successful in certain stages. In both cases, the total amount of IFT material in the flagellum was directly correlated to flagellum length. By contrast, the IFT concentration per unit of flagellum length appeared constant. The only exception was the tiny flagellum of the short epimastigote form, which contained a supplementary and dynamic pool of IFT proteins at its distal end that could contribute to its elongation in the next developmental stage. Finally, several experiments were performed in an effort to understand why flagellum length is so short at that particular stage.

RESULTS

Different methods are available for probing IFT: visualisation by electron microscopy, detection of IFT proteins by immunofluorescence in fixed cells, and recording of IFT trafficking in live cells following expression of IFT proteins fused to fluorescent proteins. All these approaches were attempted here.

IFT trains are detected in trypanosomes developing in the tsetse fly

IFT trains were first identified by correlative light and electron microscopy (Kozminski et al., 1995) as electron-dense particles sandwiched between microtubule doublets and the flagellar membrane of *Chlamydomonas* (Ringo, 1967). In *T. brucei*, similar densities are visible in sections of bloodstream form trypanosomes isolated from rats (Vickerman, 1962) or of procyclic form parasites grown in culture (Sherwin and Gull, 1989).

To look for IFT trains in various stages of *T. brucei*, we infected tsetse flies with the AnTat 1.1E strain and dissected the cardia, where cells with the shortest and longest flagella are encountered (Fig. 1). The cardia is a relatively large organ (Fig. S1A) and, although parasites can be found at fairly high densities, it is essential to probe the sample for presence of trypanosomes before performing sections for electron microscopy. First, we made semi-thin sections (500 nm) and stained them with Toluidine Blue (Fig. S1B). Once regions with sufficient parasite density were detected, ultrathin sections were made. Observation at low magnification by transmission electron microscopy (TEM) revealed the presence of multiple parasites in various orientations (Fig. 2A,B). Classic trypanosome organelles were frequently observed, such as the nucleus, the mitochondrion and acidocalcisomes, as well as the characteristic subpellicular

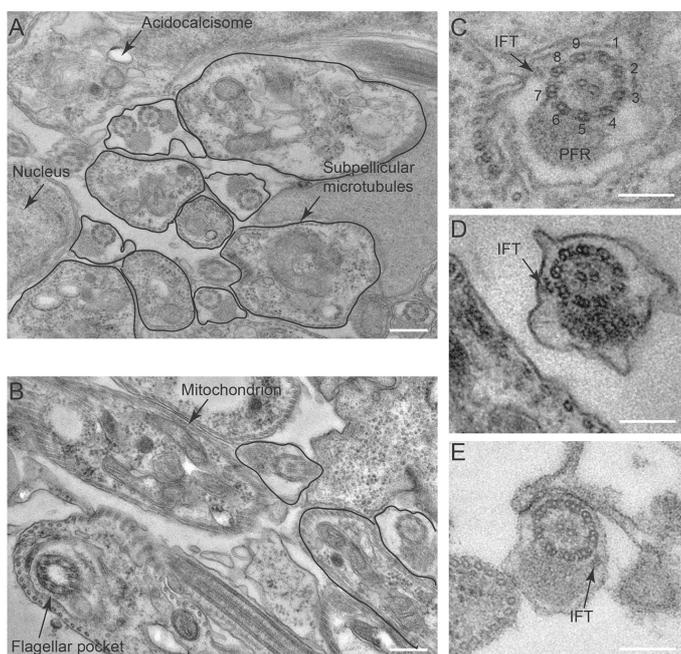


Fig. 2. IFT trains are present in the flagellum of parasites found in the cardia. (A,B) Sections at low magnification of fields showing tsetse fly cardia infected by *T. brucei* parasites. Typical organelles, such as the nucleus, an acidocalcisome, the subpellicular microtubules (A) and the flagellar pocket or the mitochondrion (B) are indicated. Multiple sections through flagella are visible. (C–E) Higher magnification of flagellum sections with IFT particles positioned close to doublets 7–8 (C and D) or doublet 4 (E). The numbering of doublets and the paraflagellar rod (PFR) are indicated on C. Scale bars: 200 nm (A,B); 100 nm (C–E).

microtubules (Fig. 2A,B). Sections through the base of the flagellum revealed the flagellar pocket and its collar, from which the flagellum emerges at the cell surface (Fig. 2A,B). Multiple flagellum sections were visible, with the presence of the canonical axoneme and of the associated paraflagellar rod (PFR). These images confirm that trypanosomes present in the cardia display the typical cytological organisation as reported in other stages. Examples of flagellum cross sections at higher magnification are presented at Fig. 2C–E. The nine doublets can be numbered unambiguously thanks to the fixed orientation of the central pair and the associated PFR (Fig. 2C). Densities equivalent to IFT trains were frequently observed between the membrane and the microtubules (Fig. 2C–E) and they were mostly encountered in proximity of doublets 3–4 (Fig. 2E) or 7–8 (Fig. 2C, D), as observed in procyclic cells (Absalon et al., 2008; Bertiaux et al., 2018a).

Thin sectioning does not allow the identification of the parasite stage and we therefore turned to FIB-SEM for further analysis. Using the same approach as above with semi-thin sectioning, we identified a region that was suitable for milling by FIB (Fig. S1). Several series were acquired with a 10 nm Z-resolution. In the volume presented, a total of 722 sections were performed (Movie 1; Fig. 3). On that sample, the epithelium of the cardia is present on the right-hand side, and trypanosomes can be found towards the bottom left. Three images corresponding to slices 225, 298 and 374 are presented (Fig. 3A). The flagellum highlighted at Fig. 3 is visible on 470 consecutive slices (Movie 1). The presence of the flagellum attachment zone (FAZ, Fig. 3B) allows the identification of the cell body it belongs to. Although the base of the flagellum is not in the volume, the nucleus is visible on the first ~200 slices with the attached flagellum, indicating that this cell is not at the

epimastigote stage. Based on the diameter of the cell body, this cell is likely to transit between the long trypomastigote and the epimastigote stage (Lemos et al., 2020; Sharma et al., 2008). Looking at that flagellum more closely, a train is visible in proximity of doublet 8 at image 114 and stretches until section 315 (Movie 1; Fig. 3B, left and central panels). A computational section revealing the whole IFT train in longitudinal section is shown in Fig. 3C. A second train is present on that same flagellum, but this time in vicinity of doublet 4 on image 359 until image 396 (Movie 1; Fig. 3B, right panel). This distribution is similar to that reported in procyclic trypanosomes grown in culture (Bertiaux et al., 2018a). Despite careful analysis, we could not find a short epimastigote in the two volumes analysed (Lemos et al., 2020). Although FIB-SEM offers excellent conditions to identify IFT trains and determine their positioning, finding all the stages of interest is like looking for a needle in a haystack, and we therefore turned towards light microscopy for quantitative analysis of IFT using immunofluorescence with anti-IFT antibodies and live-cell analysis upon expression of IFT fluorescent fusion proteins.

IFT protein amounts correlate with flagellum length at all stages of the parasite cycle

In procyclic trypanosomes in culture, IFT proteins are progressively recruited during flagellum elongation with a direct correlation between IFT total amounts and actual flagellum length, while the frequency of injection and the concentration of IFT proteins per unit of length remain unchanged (Bertiaux et al., 2018b). Similar features have been reported recently in the different pairs of flagella in *Giardia* (McInally et al., 2019). To evaluate the possible link between IFT amounts and flagellum length when trypanosomes

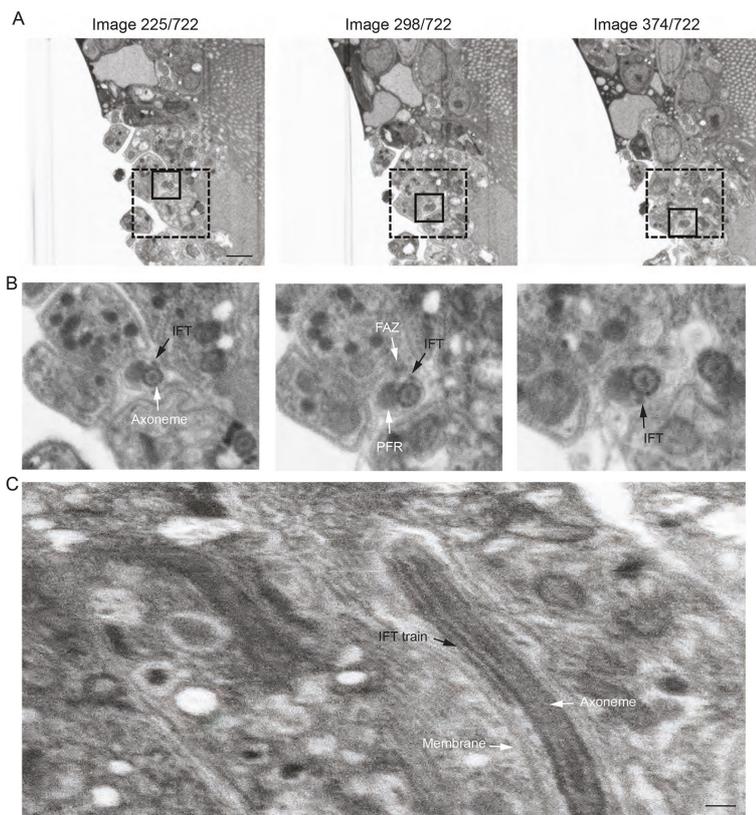


Fig. 3. IFT train distribution as revealed by 3D electron microscopy. (A) A portion of the cardia infected with trypanosomes was analysed by FIB-SEM. Three images extracted from Movie 1 are presented at low magnification (position in the stack is indicated on top of each image). Several trypanosomes are visible on the left-hand side while tsetse tissues are on the right-hand side. The dashed squares indicate the ROI that is shown in Movie 1. The square shown with solid lines indicates the portion that is shown at higher magnification in B. Scale bar: 800 nm (B) Each image comes from the field shown above. IFT particles are indicated, with a long train found on doublet 8 (left and centre images) and a shorter one present on doublet 4 (right image). The presence of the FAZ confirms which cell body the flagellum belongs to. The full sequence is presented in Movie 1. (C) Computational section showing the whole IFT train in longitudinal view. The IFT train is indicated, as well as the flagellum membrane and the axoneme (white arrows). Scale bar: 200 nm.

assemble different flagella during their life cycle, the distribution of IFT proteins was investigated in fixed cells coming either from infected flies or from cultured bloodstream and procyclic stages. Immunofluorescence assays (IFAs) with antibodies raised against IFT172 (Fig. 4A) (Absalon et al., 2008) or IFT22 (also known as RABL5) (Fig. S2) (Adhiambo et al., 2009) were performed in combination with the antibody Mab25, recognising TbSAXO1 a protein found all along the trypanosome axoneme (Dacheux et al., 2012; Pradel et al., 2006). For all parasite stages, IFT proteins were present as a succession of diffuse spots all along the length of the flagellum, with a brighter signal at the base present in almost all stages except in short epimastigote cells (Fig. 4A; Fig. S2).

To quantify the total amount of IFT22 or IFT172 protein per flagellum, a region of interest (ROI) was defined using the Mab25 axonemal marker (shown in magenta in the figures). The total amount of fluorescence, corresponding to the total amount of IFT proteins present in the flagellum, was plotted against flagellum length. For both IFT proteins, a direct correlation between the total amount of IFT proteins and the length of the corresponding flagellum was found (Fig. 4B; Fig. S1B). These data suggest that the total amount of IFT protein in the flagellum correlates with the length of the flagellum at all stages of the parasite cycle.

IFT trafficking displays similar rates and frequency during all of the parasite cycle

The methanol fixation classically used for IFAs could lead to the loss of some IFT material and therefore bias in the results. Moreover, IFAs only provide static information whereas IFT is a dynamic process. To circumvent these potential issues, the distribution of IFT proteins was examined in live trypanosomes expressing a fusion protein between the IFT-B protein IFT81 and the red fluorescent Tandem Tomato protein (TdT) (Bertiaux et al., 2018b). This fusion protein is expressed upon endogenous tagging under the control of the 3' untranslated region (UTR) of the *IFT81* gene (Bhogaraju et al., 2013). The cell line expressing this fusion protein was fed to tsetse flies that were dissected 1 month later. The TdT::IFT81 protein was detected in live trypanosomes at all the different stages of the parasite cycle: procyclic cells in the midgut; parasites at the long trypomastigote, dividing epimastigote, long and short epimastigote stages in the cardia; and attached epimastigote form and metacyclic form parasites in the salivary glands (Fig. 5A; Movies 2–4). In all cases, a higher concentration of IFT proteins was detected at the base of the flagellum, and IFT trafficking was visible without ambiguity (Fig. 5A; Movies 2–4). The only major difference in IFT protein distribution was noticed in short epimastigote cells (see below).

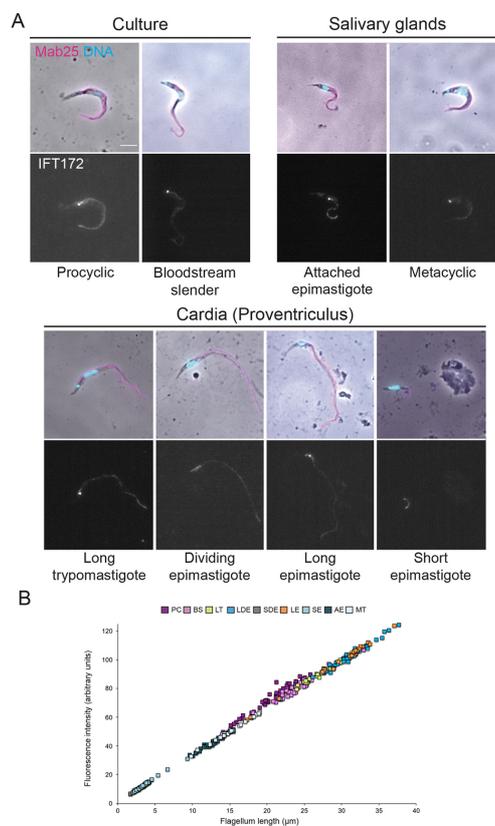


Fig. 4. IFT172 distribution during the *T. brucei* parasite cycle. (A) Parasites isolated from tsetse flies or grown in culture were fixed in cold methanol and stained with the Mab25 antibody to detect the axoneme (magenta) and the anti-IFT172 antibody (white). The top panels show the phase-contrast images merged with DAPI (cyan) and Mab25 signals (magenta). The bottom ones show the IFT172 fluorescence signal (white). Scale bar: 5 μm . (B) Quantification of the total amount of IFT172 fluorescence signal in the flagellum normalised to flagellum length for each stage of the parasite cycle. The ROI was defined by the axonemal marker and used to measure the flagellum length. The fluorescence intensity directly reflects the total amount of IFT172 proteins present in the flagellum compartment. $n=35$ cells per stage. BSF, slender bloodstream form; PC, procyclic form; LT, long trypomastigote; LDE, long dividing epimastigote; SDE, short dividing epimastigote; LE, long epimastigote; SE, short epimastigote; AE, attached epimastigote; MT, metacyclic trypomastigote.

IFT quantification requires visualisation of the full-length flagellum in the same plane of focus. To restrict flagellum beating, trypanosomes isolated from the cardia of infected flies were mixed with low-melting-point agar. This could immobilise most procyclic and some long trypomastigote or some short epimastigote cells. Unfortunately, long epimastigote or dividing epimastigote cells remained too motile in these conditions, and all other attempts to immobilise them were unsuccessful, precluding a quantitative analysis for these two stages. Live imaging was therefore only

feasible for long trypomastigote (flagellum length between 20 to 30 μm) and short epimastigote cells (flagellum length $\sim 5 \mu\text{m}$). The total amounts of TdT::IFT81 in the flagellum were quantified in live cells of these two stages by using the first image of each movie, and the results were plotted according to flagellum length (Fig. 5B). This demonstrated the direct correlation between these two parameters in live cells, in agreement with the IFA data (Fig. 4B; Fig. S1).

Although the total amount of IFT proteins appeared to be proportional to the length of the flagellum, modifications of IFT speed and frequency cannot be excluded and could have an impact on the flagellum growth rate (Bertiaux et al., 2018b). Therefore, TdT::IFT81 trafficking was investigated in details with kymograph analyses (Buisson et al., 2013) in cells with a short (short epimastigote) or a long flagellum (procyclic and long trypomastigote forms). In the flagellum of short epimastigote cells, anterograde trains travelled at $2.4 \pm 1.3 \mu\text{m s}^{-1}$ and retrograde trains at $5.6 \pm 3.1 \mu\text{m s}^{-1}$ (mean \pm s.d.; Fig. 5C,E, $n=13$). In the flagellum of long trypomastigote or procyclic cells, anterograde trains travelled at $2.1 \pm 0.7 \mu\text{m s}^{-1}$ and retrograde trains at $5.6 \pm 1.7 \mu\text{m s}^{-1}$ (Fig. 5C,E, $n=26$). Next, the IFT frequency was evaluated. In the short epimastigote flagellum, the frequency of anterograde IFT was 1.2 ± 0.4 trains per second and 2.0 ± 0.7 trains per second for retrograde IFT (Fig. 5D,F). In the long trypomastigote/procyclic flagellum, the anterograde IFT frequency was similar, with 1.22 ± 0.3 trains/s while the retrograde IFT frequency was 2.1 ± 0.1 trains/s (Fig. 5D,F). There were no statistical differences of speed and frequency between the two stages based on a Student's *t*-test. It should be noted that these speed and frequency values are slightly higher compared to the movement of the same TdT::IFT81 protein measured previously in cultured procyclic parasites (Bertiaux et al., 2018b). This is possibly a consequence of the temperature increase likely to occur after mixing the cell suspension with warm liquid agar. Indeed, temperature can affect IFT rates and frequency as reported in trypanosomes (Buisson et al., 2013) and *Caenorhabditis elegans* (Jensen et al., 2018).

In conclusion, these results show that IFT speeds and frequencies are equivalent in cells with long and short flagella. Modulation of these parameters can therefore not explain the changes in flagellum length observed during *T. brucei* development.

Unique IFT protein distribution in short epimastigote flagella

Immunofluorescence and live-cell studies showed that IFT proteins were found in discrete spots along the flagellum and concentrated at the base of the flagellum in all trypanosome cell types. However, methanol fixation showed a lower abundance of the IFT pool at the flagellum base of short epimastigotes compared to that in the other stages (Fig. 4A; Fig. S1A). To understand whether it was real or if it was the mere consequence of fixation, live cells expressing the TdT::IFT81 were examined more closely. By eye, the IFT signal at the base indeed looked less intense but, surprisingly, a rather large IFT pool was detected at the distal end of these short flagella (Fig. 6A; Movie 4). This was investigated by quantitative analysis of the TdT::IFT81 fluorescence signal at the base, along the flagellum and at the distal tip in short epimastigote cells ($n=17$), using midgut trypomastigote cells as controls ($n=22$). While the tip of the flagellum in control cells contained a reduced amount of IFT proteins (Fig. 6A,B), a really large IFT pool was detected at the distal tip of the short epimastigote flagellum (Fig. 6C) that turned out to be twice as abundant as the pool found at the base (Fig. 6D). This is in contrast to control midgut cells where the IFT signal at the tip was 4- to 5-fold lower compared to the base (Fig. 6B). This large amount of material could be engaged in IFT or simply be inactive,

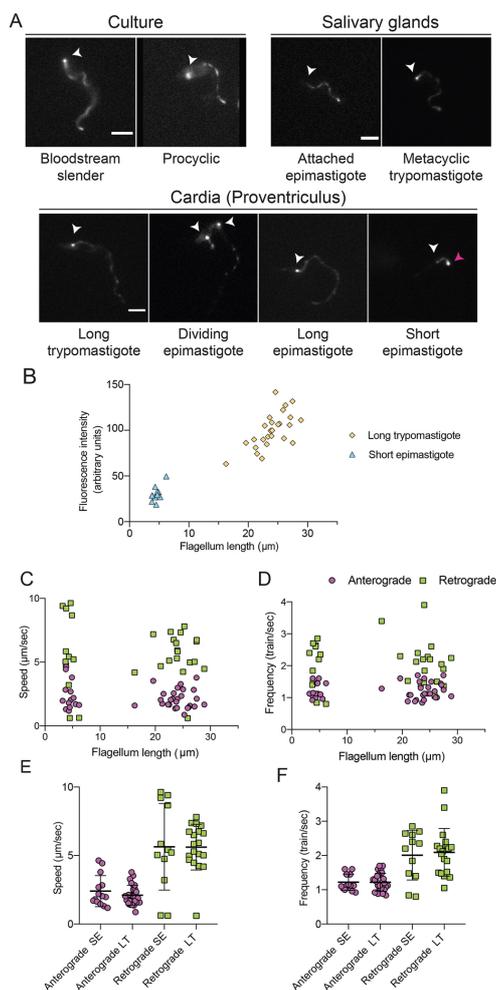


Fig. 5. Variation of IFT81 trafficking during the *T. brucei* parasite cycle. (A) Still images extracted from movies of trypanosomes expressing a TdTomato::IFT81 from the endogenous locus at the indicated stages of the parasite cycle either from cultured forms or extracted from infected tsetse flies. White arrowheads indicate the base of the flagellum and the magenta arrowhead points at the flagellum tip of a short epimastigote cell. Corresponding videos are presented as Movie 2 (culture stages), Movie 3 (parasites from the salivary glands) and Movie 4 (parasites from the cardia). Scale bars: 5 μ m. (B) The total TdTomato::IFT81 fluorescence intensity in flagella of short epimastigote (blue triangles) and long trypomastigote cells (yellow diamonds) was calculated and plotted according to the length of the corresponding flagella. (C) IFT speeds (anterograde transport, magenta circles; retrograde transport, green squares) in the flagella of short epimastigote and long trypomastigote cells were calculated and plotted according to the respective length of the flagella. Retrograde transport is more difficult to detect, and data were therefore only incorporated when the signal was sufficiently intense and reliable. (D) IFT particle frequencies (anterograde transport, magenta circles; retrograde transport, green squares) in the flagellum of short epimastigote cells and long trypomastigote cells were calculated and plotted according to the respective length of the flagella. (E) IFT particle speeds (anterograde transport, magenta circles; retrograde transport, green squares) in the flagella of short epimastigote (SE) and long trypomastigote (LT) cells were determined using kymograph analysis. (F) IFT particle frequencies (anterograde transport, magenta circles; retrograde transport, green squares) in the flagellum of short epimastigote (SE) cells and long trypomastigote (LT) cells were calculated using kymograph analysis. Error bars show mean \pm s.d.

(Movie 5). Such fluorescence recovery was observed at the distal tip of all the short flagella ($n=7$) that could be analysed.

The length of the flagellum of short epimastigote cells does not increase after inhibition of cell division

In trypanosomes, the new flagellum is assembled while the existing one is maintained (Sherwin and Gull, 1989). This mature flagellum does not undergo turnover of its major axonemal components such as dynein arms or PFR components (Vincensini et al., 2018). This led us to propose a grow-and-lock model where the mature flagellum would be locked, preventing further elongation (Bertiaux and Bastin, 2020; Bertiaux et al., 2018b). In this context, two parameters cooperate to regulate length: the rate of elongation and the timing of the locking event that is linked to that of cell division. Manipulating one of these parameters resulted in the formation of flagella of different lengths (Bertiaux et al., 2018b).

Since IFT rate and frequency are equivalent in short and long flagella, one could consider that the short epimastigote cells have a tiny flagellum because of premature cell division, such that it takes place before the flagellum can fully elongate. This was observed in procyclic cells where the amount of IFT kinesin had been knocked down by RNA interference – the number of IFT trains that were too short at the time of cell division. However, inhibition of cell division resulted in the construction of a flagellum that ultimately reached the same length as the parental flagellum (Bertiaux et al., 2018b). To address whether a modification of the timing of cell division could explain the production of flagella with different length in the context of the natural cyclical development of trypanosomes, cell division was chemically inhibited in parasites isolated from infected tsetse cardia. Cells were maintained for 24 h in the presence of 10 mM teniposide, a drug that interferes with mitochondrial DNA segregation but not with basal body duplication nor with flagellum elongation (Robinson and Gull, 1991). In these conditions, cells cannot divide anymore. This arrests cell division and the impact on flagellum length can be analysed by IFAs using DAPI to stain DNA and the axonemal marker Mab25 to measure flagellum length (Fig. 7). First, long trypomastigote parasites were

for example serving as a rapidly mobilisable pool to facilitate flagellum elongation in the salivary glands when these cells differentiate to produce the attached epimastigote stage with a longer flagellum (~14 μ m) (Rotureau et al., 2011).

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was used to evaluate whether this pool was dynamic. Short epimastigote cells were recovered from infected tsetse flies and an ROI was drawn around the IFT signal at the distal tip for bleaching with a brief laser pulse in order to extinguish the fluorescence signal (Fig. 6E, second panel). Fresh anterograde trains were then detected, emerging from the basal pool and travelling towards the tip of the flagellum (two examples are presented in Movie 5). Within seconds, these trains reached the tip and progressively replenished the distal pool (Fig. 6E, bottom panels). Retrograde trains were frequently seen starting from this distal pool, demonstrating that this material is actively participating in IFT

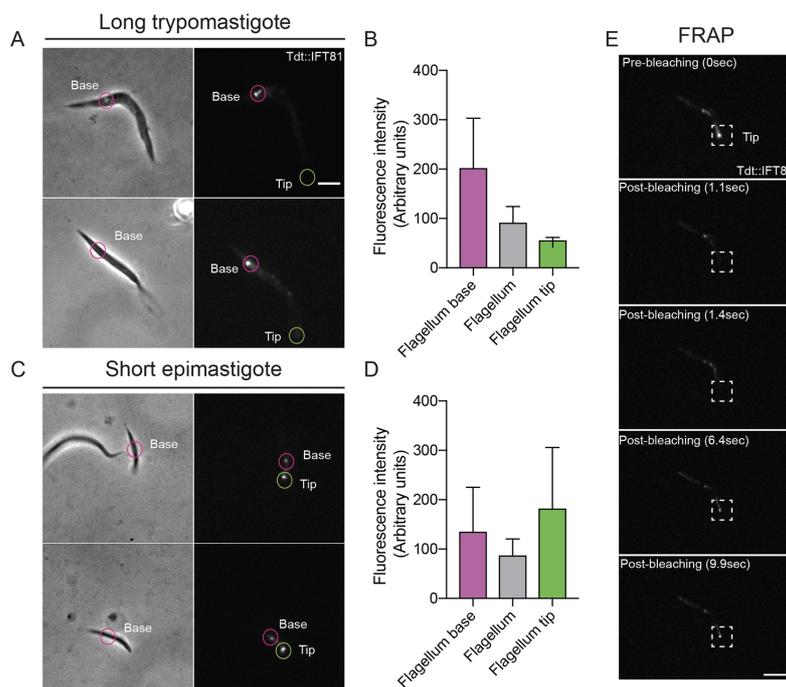


Fig. 6. An IFT81 pool is present at the distal tip of short epimastigote flagella. Images of cells expressing a TdTomato-tagged version of IFT81 isolated from the tsetse fly cardia at the long trypomastigote stage (A) or at the short epimastigote stage (C). The phase-contrast is shown on the right and the fluorescence signal is on the left. The base of the flagellum is indicated with a magenta circle and the tip with a green circle. The existence of an IFT pool at the tip is only detected in short epimastigote cells (also see Movie 4 for live cells). Scale bar: 5 μ m. (B,D) Quantification of the TdTomato::IFT81 mean fluorescence intensities at the base (magenta), in the middle region (grey) and the tip (green) of flagella in long trypomastigote (B, $n=22$) or in short epimastigote (D) cells ($n=17$). Results are mean \pm s.d. (E) FRAP analysis in a short epimastigote trypanosome expressing the TdTomato::IFT81 fusion protein. The distal end of the flagellum was bleached with a brief laser pulse and the fluorescence recovery was monitored during 20 s. In the pre-bleach situation, the IFT pool is present at the distal tip; in the post-bleach situation, the signal becomes negative but rapid recovery was detected at the distal tip. The fluorescence signal is shown for the indicated times. The dotted square indicates the region around the distal tip. Scale bar: 3 μ m.

analysed. These cells assemble a tiny flagellum before nucleus migration and transformation in epimastigote cells (Lemos et al., 2020). Remarkably, the flagellum elongated from $\sim 1 \mu$ m to an average of $6.2 \pm 2.8 \mu$ m (mean \pm s.d. $n=24$) (Fig. 7, bottom left panels), a value that is even higher than the average flagellum length in short epimastigote cells (Rotureau et al., 2011). Surprisingly, the length of the old flagellum was shorter ($21.4 \pm 4.5 \mu$ m) than that of untreated cells ($\sim 28 \mu$ m), suggesting possible remodelling. We then turned our attention to dividing epimastigote cells treated with teniposide. The new flagellum retained a length of $3.2 \pm 1.2 \mu$ m and the old one of $27.9 \pm 3.54 \mu$ m ($n=17$) (Fig. 7, right panels). These values are comparable to those of untreated cells observed in this and other experiments (Fig. 1) and from previous *in vivo* studies (Rotureau et al., 2011; Sharma et al., 2008; Van Den Abbeele et al., 1999). Therefore, the short flagellum failed to elongate further, suggesting that its length is restricted.

DISCUSSION

IFT has been well studied in the procyclic stage of *T. brucei* in culture with a combination of functional and imaging studies. Here, transmission electron microscopy, FIB-SEM, IFAs and live-cell

analysis revealed that IFT is present and active in all accessible parasite stages in the midgut, cardia and salivary glands of infected tsetse flies. The total amount of flagellar IFT proteins directly correlated with the length of each flagellum from 3 to 30 μ m. A direct relationship between total amounts of IFT and final flagellum length was reported for the two equivalent flagella of *Chlamydomonas* (Marshall and Rosenbaum, 2001) and recently for the four pairs of flagella of different length in *Giardia lamblia* (McInally et al., 2019). There is, however, a significant difference between *Chlamydomonas* and *T. brucei*; in the first species, all of the IFT proteins are injected at once and train size progressively scales down leading to a reduction of the IFT concentration during elongation (Engel et al., 2009; Vannuccini et al., 2016) whereas in the *T. brucei* one, IFT protein recruitment to the flagellum progressively increases with length to maintain a constant concentration per unit of length (Bertiaux et al., 2018b).

Is there a causal relationship between amount of IFT and flagellum length? Reduction of IFT train frequency following knockdown of the IFT kinesins using RNAi leads to the formation of shorter flagella (Bertiaux et al., 2018b), supporting the causal relationship. In *Chlamydomonas*, shifting the temperature-sensitive

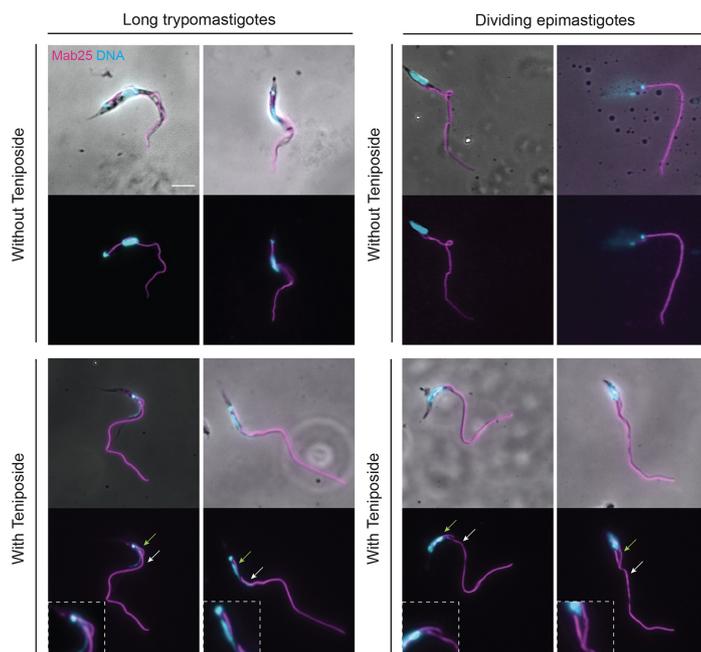


Fig. 7. Inhibition of cell division has different impacts on flagellum length according to the trypanosome stage. Parasites isolated from tsetse cardia were treated (bottom panels) or not (top panels) with teniposide for 24 h, fixed in methanol and stained with the Mab25 antibody to detect the axoneme (magenta) and DAPI to stain DNA (cyan). Top and bottom panels show untreated and treated cells, respectively. Two examples are shown for each situation. Green and white arrows show the new flagellum and the old flagellum, respectively. A substantial increase of the length of the new flagellum is obvious in long trypomastigote cells whereas no visible impact could be detected for dividing epimastigote cells. Insets show higher magnification of the region with the new flagellum. Scale bar: 5 μ m.

fla10 kinesin mutant to intermediate temperature conditions results in a reduction in the number of IFT trains and in the formation of shorter flagella (Marshall and Rosenbaum, 2001). A simple model would be to postulate that flagellum length is controlled by the production of adequate amounts of IFT proteins. In this context, short and long epimastigote cells would synthesise less or more IFT proteins, respectively. Inhibition of cell division in kinesin RNAi conditions allowed trypanosomes to grow flagella twice as long without an increase in IFT trafficking (Bertiaux et al., 2018b). This model is further complicated by the existence of a large soluble pool of IFT proteins in the cytoplasm, reaching up to 50-fold the amount of IFT in the flagellum, at least in the case of *Chlamydomonas* (Ahmed et al., 2008; Wang et al., 2009). Because of the inherent difficulty in purifying intact flagella in wild-type trypanosomes, this could not be quantified directly but IFAs and observation of live cells expressing fluorescent IFT proteins indicate the presence of a substantial amount of IFT proteins in the cell body (Absalon et al., 2008).

Treatment of asymmetrically dividing epimastigote trypanosomes with teniposide showed that the short flagellum did not elongate further, which is in contrast with what was observed in the same experiment for long trypomastigote parasites coming from flies (Fig. 7) or procyclic trypanosomes in culture (Bertiaux et al., 2018b). Several possibilities could explain this result. First, this flagellum could be locked prematurely. Addition of a cap, modification of microtubules or presence of a barrier at the base of the flagellum are potential mechanisms for such a locking model (Bertiaux and Bastin, 2020). Second, this flagellum could be constructed on the principle of the balance between assembly and disassembly, but with a marked disassembly rate as proposed in *Giardia* where increasing amounts of the microtubule-depolymerising kinesin 13 are associated with

shorter flagellum length (McInally et al., 2019). The genome of *T. brucei* contains five kinesin 13 genes and KIN13-2 is the only one to be localised at the distal tip of both mature and growing flagella (Chan et al., 2010). KIN13-2 could therefore be a candidate to limit elongation at the short epimastigote stage. However, functional investigation in procyclic cells in culture has previously shown that the involvement of KIN13-2 on the control of flagellum length is marginal (Chan and Ersfeld, 2010). Third, the pool of cytoplasmic tubulin could be restricted as proposed in the limited soluble pool model (Goehring and Hyman, 2012). Intriguingly, the volume of the cytoplasm shrinks significantly at that stage (Rotureau et al., 2011) and a general reduction in cell activity has been observed (Natesan et al., 2007). In these conditions, IFT could remain active but if there is no or little tubulin transport, elongation could not continue further (Craft et al., 2015).

In the fly, it is commonly accepted that the short epimastigote cell is the one that establishes the infection in the salivary glands and that transforms in the attached epimastigote stage (Van Den Abbeele et al., 1999). This stage is characterised by a longer flagellum (14 μ m) that forms multiple membrane protrusions for adhesion to the epithelium of the salivary glands (Tetley and Vickerman, 1985). This means that the mechanisms restricting flagellum length must be abolished to allow further elongation. Based on the models proposed above, the flagellum could be unlocked, the activity of a depolymerising kinesin could be inhibited or the synthesis of tubulin and other flagellar precursors could resume. Finally, given the difficulty of visualising the establishment of the infection by a single parasite in the salivary glands of the tsetse fly, construction of a new, longer, flagellum followed by an asymmetric division cannot be formally excluded. Such a situation has been observed for the differentiation of the attached epimastigote to the trypomastigote

stage preceding the transformation in metacyclic parasites that are released in the saliva (Rotureau et al., 2012).

What processes could govern the formation of a longer flagellum? This is observed during the differentiation from the trypomastigote procyclic stage to the epimastigote stage in the cardia (Rotureau et al., 2011; Sharma et al., 2008; Van Den Abbeele et al., 1999). We propose that the new flagellum inherited from the last division of the procyclic stage is not locked and therefore can elongate further, giving rise to the long trypomastigote cells encountered in the cardia. If this flagellum is not locked, it must be more dynamic, meaning this could explain its unexpected shortening following inhibition of cell division while the new flagellum elongates from 1 to 6 μm (Fig. 7). This suggests that the total amount of tubulin might be limiting, giving support to the soluble pool model as a possible mode of control of flagellum length. Further experimentation could address these models but would be greatly helped by an *in vitro* cultivation system. The overexpression of the RNA-binding protein 6 (RBP6) recapitulates some aspects of trypanosome development in the tsetse fly, including the production of metacyclic cells that are responsible for infection of mammalian hosts (Kolev et al., 2012). Unfortunately, it bypasses most intermediate stages, including the asymmetrically dividing epimastigote stage, and cells with short or long flagella have not been reported (Kolev et al., 2012).

Like multicellular organisms, trypanosomes have the ability to assemble flagella of different length. This is likely to be achieved by different mechanisms – if the grow-and-lock model can explain the situation encountered in procyclic trypanosomes, it does not seem to apply to the situation of dividing epimastigote cells, where a different process could be involved. Shortening of existing flagella has been reported (Peacock et al., 2018) or suspected (Ooi et al., 2016) in the related parasites *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax*. In the monogenic parasite *Leptomonas*, the older flagellum undergoes rapid shortening prior to cell division (He et al., 2019). This feature had so far not been reported for the life cycle of *T. brucei*. However, it could be triggered here in experimental conditions for long trypomastigote cells present in the cardia, suggesting that there might be more hidden features in the control of flagellum length in trypanosomes. Overall, these results highlight the importance of studying different flagellated organisms as it can bring findings reflecting the diversity of cilia across evolution but also within single organisms such as humans.

MATERIALS AND METHODS

Trypanosome cell lines and cultures

Derivatives of the *T. brucei brucei* strain AnTat 1.1E Paris procyclic strain (Le Ray et al., 1977) were cultured at 27°C in SDM79 medium supplemented with hemin, 8 mM of glycerol and 10% fetal calf serum (FCS; Brun and Schonenberger, 1979). For bloodstream form trypanosomes, strain 427 was cultured in complete HMI-11 medium at 37°C in 5% CO₂ (Hirumi and Hirumi, 1989). IFT imaging in live cells was carried out with a cell line expressing a TdTomato::IFT81 fusion produced from its endogenous locus in AnTat1.1E PCF cells. The first 500 nucleotides of the *IFT81* gene (Gene DB number Tb927.10.2640) were chemically synthesised (GeneCust, Luxembourg) and cloned in frame with the TdTomato gene within the HindIII and ApaI sites of the p2675 vector (Bertiaux et al., 2018b; Kelly et al., 2007). The construct was linearised within the *IFT81* sequence with the enzyme XcmI, and nucleofected in the AnTat1.1E PCF cell line, leading to integration by homologous recombination in the *IFT81* endogenous locus and to the expression of the full-length coding sequence of IFT81 fused to TdTomato.

Tsetse fly maintenance, infection and dissection

Tsetse flies (*Glossina morsitans morsitans*) were maintained, infected and dissected at the Institut Pasteur as previously described (Rotureau et al., 2011). Teneral males were collected 24 to 48 h post-eclosion and fed

through a silicone membrane with 6×10^6 – 9×10^6 parasites/ml in SDM-79 medium supplemented with 10% FCS, 8 mM glycerol and 10 mM glutathione for their first meal (MacLeod et al., 2007). Flies were infected with the *T. brucei brucei* AnTat 1.1E Paris wild-type (Le Ray et al., 1977) and AnTat 1.1E IFT81::TdT strains. Flies were then maintained in Roubaud cages for 1 month at 27°C and 50% humidity and fed three times a week with mechanically defibrinated sheep blood. Flies were starved for at least 48 h before being individually dissected 28 days after ingestion of the infected meal. In our colony conditions, the average midgut infection rates usually obtained with AnTat 1.1E Paris wild-type strain are 50–60% in the midgut and 10–15% in the salivary glands. Salivary glands were first rapidly dissected into a drop of PBS or culture medium. The whole tsetse alimentary tract was then dissected and arranged lengthways for assessing the parasite presence. The cardia and anterior midgut were physically separated from the posterior midgut in a distinct PBS drop. Tissues were dilacerated to allow parasites to spread in PBS; parasites were recovered and treated for further experiments no more than 15 min after dissection.

Electron microscopy

For electron microscopy sample preparation, the entire digestive tracts of 11 flies were placed in a drop of 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and fixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) and 4% paraformaldehyde. Entire cardia were then separated from the digestive tract and transferred to 1.5 ml Eppendorf tubes containing 500 μl of 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 1 or 2 h at 4°C. Fixed samples were washed three times by the addition of fresh 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) buffer and post-fixed in 1% osmium (EMS) in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) enriched with 1.5% potassium ferrocyanide (Sigma-Aldrich) for 50 min in the dark under agitation. Samples were gradually dehydrated in an acetone (Sigma-Aldrich) series from 50% to 100%. Cardia were oriented along longitudinal or transversal axes and embedded in PolyBed812 resin (EMS) according to the 'hard' protocol (Luft, 1961), followed by polymerisation for 48 h at 60°C. After embedding, 500 nm semi-thin sectioning was performed and sections stained with Toluidine Blue to find the ROI containing trypanosomes. Semi-thin sections were used like a map to mill the sample precisely in the ROI by FIB. For TEM analysis, ultra-thin sections (70 nm) were obtained using an ultramicrotome (Leica EM UC7). Sections were post-stained for 40 min with 4% uranyl acetate and 10 min with 3% lead citrate and observed using a FEI Tecnai T12 120 kV. For FIB-SEM, the embedded sample was coated with 20 nm of Au/Pd and directly placed in the chamber of a FESEM Zeiss Auriga microscope equipped with a CrossBeam workstation (Zeiss) and acquired using ATLAS 3D software (Zeiss) as described previously (Bertiaux et al., 2018a).

Immunofluorescence

Cultured parasites were washed twice in PBS and spread directly into poly-L-lysine-coated slides. The slides with cultured parasites or parasites isolated from tsetse flies were air-dried for 10 min, fixed in methanol at –20°C for 30 s and rehydrated for 10 min in PBS. For immuno-detection, slides were incubated with primary antibodies diluted in PBS with 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at 37°C in a humid chamber. The antibodies used were the Mab25 mouse monoclonal antibody recognising TbSAXO1 (a gift from Derrick Robinson, University of Bordeaux, France), a protein found all along the trypanosome axoneme at 1:10 (Dacheux et al., 2012; Pradel et al., 2006), an anti-IFT172 mouse monoclonal antibody diluted at 1:200 (Absalon et al., 2008), an anti-IFT22 mouse polyclonal antiserum diluted at 1:200 (Adhiambo et al., 2009), an anti-FLAM8 rabbit polyclonal antibody diluted at 1:500 (a kind gift of Paul McKean, Lancaster University, UK). Three washes of 10 min were performed and the secondary antibody diluted in PBS with 0.1% BSA was added on the slides. Subclass-specific secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488 and Cy3 (1:400; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) were used for double labelling. After an incubation of 45 min, slides were washed three times in PBS for 10 min and DAPI (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) was added to stain DNA. Slides were mounted with coverslips using ProLong antifade reagent (Invitrogen). Sample observation was performed using a DMI4000 microscope equipped with a 100 \times NA 1.4 objective (Leica, Wetzlar, Germany) and images were captured with an ORCA-03G Hamamatsu camera. Pictures were analysed

using the ImageJ 1.47g13 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). For presentation purposes and only after analysis, images were merged using Photoshop CS6 (Adobe). To quantify fluorescence intensity associated with the IFT signal (IFT22 or IFT172), the Mab25 signal was used to draw the ROI encompassing the length of the axoneme excluding the flagellum base (Dacheux et al., 2012). Using ImageJ, the total amount of IFT fluorescence was measured using the fluorescence associated with each pixel of the ROI and removing the background associated with the minimum of fluorescence detected in that ROI.

Live imaging of parasites isolated from tsetse fly

Fly dissections were performed in SDM-79 medium. The midgut, cardia and salivary glands were rapidly separated in different drops. After a visual inspection to confirm the presence of parasite, each organ was kept in 15 µl of SDM-79 medium supplemented with serum in Eppendorf tubes. To increase parasite density, six organs were pooled in each tube and dilacerated. A SDM-79 solution containing 4% agar was heat-liquefied and progressively cooled for being mixed with the medium containing the freshly isolated parasites (1:1). For live video microscopy, the solution was spread on a slide, covered with a coverslip and rapidly observed at room temperature under the DMI4000 microscope. Videos were acquired using an Evolve 512 EMCCD Camera (Photometrics, Tucson, AZ) driven by the Metaview acquisition software (Molecular Probes, Sunnyvale, CA). IFT trafficking was recorded at 100 ms per frame during 30 s. Kymographs were extracted and analysed using Quia software as described previously (Buisson et al., 2013; Chenouard et al., 2010).

FRAP analysis

For FRAP analysis of cells expressing Tdt::IFT81, an Axiovert 200 inverted microscope (Zeiss) equipped with an oil immersion objective (magnification ×100 with 1.4 numerical aperture) and a spinning disc confocal head (CSU22, Yokogawa) was used (Buisson et al., 2013). Movies were acquired using Velocity software with an EMCCD camera (C-9100, Hamamatsu) operating in streaming mode. The samples were kept at 27°C using a thermo-controlled chamber. Sequences of 30 s were acquired at an exposure time of 0.1 s per frame.

Inhibition of cell division

Flies were dissected in SDM-79 medium and, after visual inspection, three positive proventriculi were pooled and resuspended in 500 µl of SDM-79 supplemented with hemin, 10% fetal bovine serum and 10 mM glycerol in 24-well plates. For inhibiting cell division, teniposide (Sigma SML0609), a topoisomerase II inhibitor, was dissolved in DMSO and added to isolated parasites from tsetse flies at a final concentration of 10 mM for 24 h (Bertiaux et al., 2018b; Robinson and Gull, 1991). In the control wells, the same volume of DMSO alone was added (6.3 µl). Parasites were spread on poly-L-lysine-coated slides and allowed to sediment for 30 min at 27°C before being fixed and processed for immunofluorescence.

Acknowledgements

We thank Aline Crouzols and Christelle Travaillé for help with tsetse fly infection and dissection; Moara Lemos for help with sample preparation and Derrick Robinson (University of Bordeaux) for providing the Mab25 antibody. We are grateful to the Photonic Bioimaging and Ultrastructural Bioimaging facilities for access to their equipment, and to Gérard Pehaud-Arnaudet for training in electron microscopy.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: E.B., B.R., P.B.; Methodology: E.B., A.M.; Formal analysis: E.B., A.M.; Writing - original draft: E.B., P.B.; Writing - review & editing: E.B., A.M., B.R., P.B.; Supervision: B.R., P.B.; Funding acquisition: P.B.

Funding

E.B. was supported by fellowships from French National Ministry for Research and Technology (doctoral school CDV515) and from La Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20170436836). This work was funded by La Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20150734356) and by a French

Government (Agence Nationale de la Recherche) Investissement d'Avenir programme, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (ANR-10-LABX-62-IBEID). We are also grateful for support from FESEM Zeiss Auriga and Elyra PS1 equipment from the French Government Programme Investissements d'Avenir France Bioluminescence (FBI, N° ANR-10-INSB-04-01) and from a DIM-Malinf grant from the Région Ile-de-France.

Supplementary information

Supplementary information available online at <https://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.248989.supplemental>

Peer review history

The peer review history is available online at <https://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.248989.reviewer-comments.pdf>

References

Absalon, S., Blisnick, T., Kohl, L., Toutirais, G., Doré, 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. doi:10.1091/mbc.e07-08-0749

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. doi:10.1242/jcs.040444

Ahmed, N. T., Gao, C., Lucker, B. F., Cole, D. G. and Mitchell, D. R. (2008). ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery. *J. Cell Biol.* **183**, 313-322. doi:10.1083/jcb.200802025

Avidor-Reiss, T. and Leroux, M. R. (2015). Shared and distinct mechanisms of compartmentalized and cytosolic ciliogenesis. *Curr. Biol.* **25**, R1143-R1150. doi:10.1016/j.cub.2015.11.001

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. doi:10.1128/MCB.19.12.8191

Bertiaux, E. and Bastin, P. (2020). Dealing with several flagella in the same cell. *Cell Microbiol.* **22**, e13162. doi:10.1111/cmi.13162

Bertiaux, E., Mallet, A., Fort, C., Blisnick, T., Bonnefoy, S., Jung, J., Lemos, M., Marco, S., Vaughan, S., Trépout, S. et al. (2018a). Bidirectional intraflagellar transport is restricted to two sets of microtubule doublets in the trypanosome flagellum. *J. Cell Biol.* **217**, 4284-4297. doi:10.1083/jcb.201805030

Bertiaux, E., Morga, B., Blisnick, T., Rotureau, B. and Bastin, P. (2018b). A grow-and-lock model for the control of flagellum length in trypanosomes. *Curr. Biol.* **28**, 3802-3814.e3. doi:10.1016/j.cub.2018.10.031

Bhogaraju, S., Cajanek, L., Fort, C., Blisnick, T., Weber, K., Taschner, M., Mizuno, N., Laml, 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. doi:10.1126/science.1240985

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. doi:10.1091/mbc.e14-05-0961

Broekhuis, J. R., Leong, W. Y. and Jansen, G. (2013). Regulation of cilium length and intraflagellar transport. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **303**, 101-138. doi:10.1016/B978-0-12-407697-6.00003-9

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. doi:10.1242/jcs.117069

Chan, K. Y. and Ersfeld, K. (2010). The role of the Kinesin-13 family protein TbKif13-2 in flagellar length control of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **174**, 137-140. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.08.001

Chan, K. Y., Matthews, K. R. and Ersfeld, K. (2010). Functional characterisation and drug target validation of a mitotic kinesin-13 in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* **6**, e1001050. doi:10.1371/journal.ppat.1001050

Chenouard, N., Buisson, J., Bloch, I., Bastin, P. and Olivo-Marin, J. C. (2010). Curvelet analysis of kymograph for tracking bi-directional particles in fluorescence microscopy images. *IEEE International Conference on Image Processing*, pp. 3657-3660. doi:10.1109/ICIP.2010.5652479

Craft, J. M., Harris, J. A., Hyman, S., Kner, P. and Lehtreck, K. F. (2015). Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism. *J. Cell Biol.* **208**, 223-237. doi:10.1083/jcb.201409036

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. doi:10.1371/journal.pone.0031344

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. doi:10.1242/jcs.03203
- Dutcher, S. K.** (2014). The awesome power of dikaryons for studying flagella and basal bodies in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cytoskeleton (Hoboken)* **71**, 79-94. doi:10.1002/cm.21157
- Engel, B. D., Ludington, W. B. and Marshall, W. F.** (2009). Intraflagellar transport particle size scales inversely with flagellar length: revisiting the balance-point length control model. *J. Cell Biol.* **187**, 81-89. doi:10.1083/jcb.200812084
- Franklin, J. B. and Ullu, E.** (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**, 173-186. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07322.x
- Goehring, N. W. and Hyman, A. A.** (2012). Organelle growth control through limiting pools of cytoplasmic components. *Curr. Biol.* **22**, R330-R339. doi:10.1016/j.cub.2012.03.046
- Hao, L., Thein, M., Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G., Lu, Y., Acar, S., Prevo, B., Shaham, S. and Scholey, J. M.** (2011). Intraflagellar transport delivers tubulin isotypes to sensory cilium middle and distal segments. *Nat. Cell Biol.* **13**, 790-798. doi:10.1038/ncb2268
- He, C. Y., Singh, A. and Yurchenko, V.** (2019). Cell cycle-dependent flagellar disassembly in a firebug trypanosomatid *Leptomonas pyrrocoris*. *mBio* **10**, e02424-19. doi:10.1128/mBio.02424-19
- Hirumi, H. and Hirumi, K.** (1989). Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J. Parasitol.* **75**, 985-989. doi:10.2307/3282883
- 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. doi:10.7554/eLife.02419
- Huet, D., Blisnick, T., Perrot, S. and Bastin, P.** (2019). IFT25 is required for the construction of the trypanosome flagellum. *J. Cell Sci.* **132**, jcs228296. doi:10.1242/jcs.228296
- Ishikawa, H. and Marshall, W. F.** (2017). Intraflagellar transport and ciliary dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a021998. doi:10.1101/cshperspect.a021998
- Jensen, V. L., Lambacher, N. J., Li, C., Mohan, S., Williams, C. L., Inglis, P. N., Yoder, B. K., Blacque, O. E. and Leroux, M. R.** (2018). Role for intraflagellar transport in building a functional transition zone. *EMBO Rep.* **19**, e45862. doi:10.15252/embr.201845862
- Johnson, K. A. and Rosenbaum, J. L.** (1992). Polarity of flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* **119**, 1605-1611. doi:10.1083/jcb.119.6.1605
- Keeling, J., Tsiokas, L. and Maskey, D.** (2016). Cellular mechanisms of ciliary length control. *Cells* **5**, 6. doi:10.3390/cells5010006
- 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. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.03.012
- 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. doi:10.1093/emboj/cdg518
- Kolev, N. G., Ramey-Butler, K., Cross, G. A. M., Ullu, E. and Tschudi, C.** (2012). Developmental progression to infectivity in *Trypanosoma brucei* triggered by an RNA-binding protein. *Science* **338**, 1352-1353. doi:10.1126/science.1229641
- 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. doi:10.1073/pnas.90.12.5519
- 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. doi:10.1083/jcb.131.6.1517
- Le Ray, D., Barry, J. D., Easton, C. and Vickerman, K.** (1977). First tsetse fly transmission of the "AnTat" serodeme of *Trypanosoma brucei*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **57**, 369-381.
- Lechtreck, K. F., Van De Weghe, J. C., Harris, J. A. and Liu, P.** (2017). Protein transport in growing and steady-state cilia. *Traffic* **18**, 277-286. doi:10.1111/tra.12474
- Lemos, M., Mallet, A., Bertiaux, E., Imbert, A., Rotureau, B. and Bastin, P.** (2020). Timing and original features of flagellum assembly in trypanosomes during development in the tsetse fly. *Parasit. Vectors* **13**, 169. doi:10.1186/s13071-020-04026-0
- Liang, Y., Zhu, X., Wu, Q. and Pan, J.** (2018). Ciliary length sensing regulates IFT entry via changes in FLA8/KIF3B phosphorylation to control ciliary assembly. *Curr. Biol.* **28**, 2429-2435.e3. doi:10.1016/j.cub.2018.05.069
- Ludington, W. B., Wemmer, K. A., Lechtreck, K. F., Witman, G. B. and Marshall, W. F.** (2013). Avalanche-like behavior in ciliary import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 3925-3930. doi:10.1073/pnas.1217354110
- Luft, J. H.** (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 409-414. doi:10.1083/jcb.9.2.409
- MacLeod, E. T., Maudlin, I., Darby, A. C. and Welburn, S. C.** (2007). Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse. *Parasitology* **134**, 827-831. doi:10.1017/S0031182007002247
- 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. doi:10.1083/jcb.200106141
- McInally, S. G., Kondev, J. and Dawson, S. C.** (2019). Length-dependent disassembly maintains four different flagellar lengths in *Giardia*. *Elife* **8**, e48694. doi:10.7554/eLife.48694.sa2
- 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. doi:10.1186/2046-2530-2-16
- Natesan, S. K. A., Peacock, L., Matthews, K., Gibson, W. and Field, M. C.** (2007). Activation of endocytosis as an adaptation to the mammalian host by trypanosomes. *Eukaryot. Cell* **6**, 2029-2037. doi:10.1128/EC.00213-07
- Ooi, C. P., Schuster, S., Cren-Travaile, C., Bertiaux, E., Cosson, A., Goyard, S., Perrot, S. and Rotureau, B.** (2016). The cyclical development of *Trypanosoma vivax* in the tsetse fly involves an asymmetric division. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **6**, 115. doi:10.3389/fcimb.2016.00115
- Peacock, L., Kay, C., Bailey, M. and Gibson, W.** (2018). Shape-shifting trypanosomes: Flagellar shortening followed by asymmetric division in *Trypanosoma congolense* from the tsetse proventriculus. *PLoS Pathog.* **14**, e1007043. doi:10.1371/journal.ppat.1007043
- 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. doi:10.1242/jcs.02900
- Prevo, B., Scholey, J. M. and Peterman, E. J. G.** (2017). Intraflagellar transport: mechanisms of motor action, cooperation, and cargo delivery. *FEBS J.* **284**, 2905-2931. doi:10.1111/febs.14068
- Ringo, D. L.** (1967). Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* **33**, 543-571. doi:10.1083/jcb.33.3.543
- 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. doi:10.1038/352731a0
- Rotureau, B., Subota, I. and Bastin, P.** (2011). Molecular bases of cytoskeleton plasticity during the *Trypanosoma brucei* parasite cycle. *Cell. Microbiol.* **13**, 705-716. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01566.x
- 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. doi:10.1242/dev.072611
- 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. doi:10.1016/j.protis.2007.07.004
- Sherwin, T. and Gull, K.** (1989). The cell division cycle of *Trypanosoma brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **323**, 573-588. doi:10.1098/rstb.1989.0037
- 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.
- Van Den Abbeele, J., Claes, Y., van Bockstaele, D., Le Ray, D. and Coosemans, M.** (1999). *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* **118**, 469-478. doi:10.1017/S0031182099004217
- Vannuccini, E., Paccagnini, E., Cantele, F., Gentile, M., Dini, D., Fino, F., Diener, D., Mencarelli, C. and Lupetti, P.** (2016). Two classes of short intraflagellar transport train with different 3D structures are present in *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Sci.* **129**, 2064-2074. doi:10.1242/jcs.183244
- Vickerman, K.** (1962). The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: an hypothesis based on ultrastructural observations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **56**, 487-495. doi:10.1016/0035-9203(62)90072-X
- Vincensini, L., Blisnick, T., Bertiaux, E., Hutchinson, S., Georgikou, C., Ooi, C.-P. and Bastin, P.** (2018). Flagellar incorporation of proteins follows at least two different routes in trypanosomes. *Biol. Cell* **110**, 33-47. doi:10.1111/boc.201700052
- Wang, Y., Ren, Y. and Pan, J.** (2019). Regulation of flagellar assembly and length in *Chlamydomonas* by LF4, a MAPK-related kinase. *FASEB J.* **33**, 6431-6441. doi:10.1096/fj.201802375RR
- Wang, Z., Fan, Z.-C., Williamson, S. M. and Qin, H.** (2009). Intraflagellar transport (IFT) protein IFT25 is a phosphoprotein component of IFT complex B and physically interacts with IFT27 in *Chlamydomonas*. *PLoS ONE* **4**, e5384. doi:10.1371/journal.pone.0005384
- 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. doi:10.1016/j.cub.2013.10.044

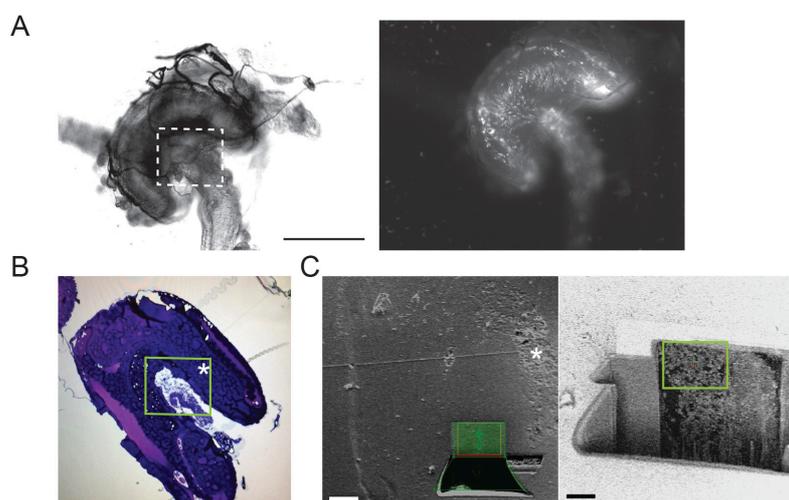


Fig. S1. Use of a correlative light and electron microscopy approach to detect trypanosomes in infected tsetse cardia. (A) Entire cardia isolated from a tsetse fly infected with trypanosomes expressing a TandemTomato fluorescent reporter (Calvo-Alvarez et al., 2018). Left panel: Brightfield image showing the general morphology of the cardia. The square indicates the region of interest for electron microscopy. Right panel: The same cardia viewed by fluorescence microscopy reveals the presence of trypanosomes in various positions within the organ. (B) A semi-thin section of the cardia stained with toluidine blue. Parasites are visible in the green square. The same region of interest was observed on the semi-thin section and on the block surface by scanning electron microscopy (white stars on B and C). (C) Different views of the bloc surface of the sample analysed by FIB-SEM after a cross-sectioning and a polishing by FIB. Parasites are visible on the side view (green squares). Scale bars: 20 μm (left) and 10 μm (right).

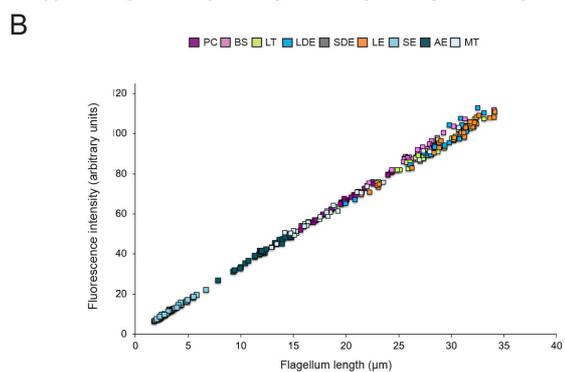
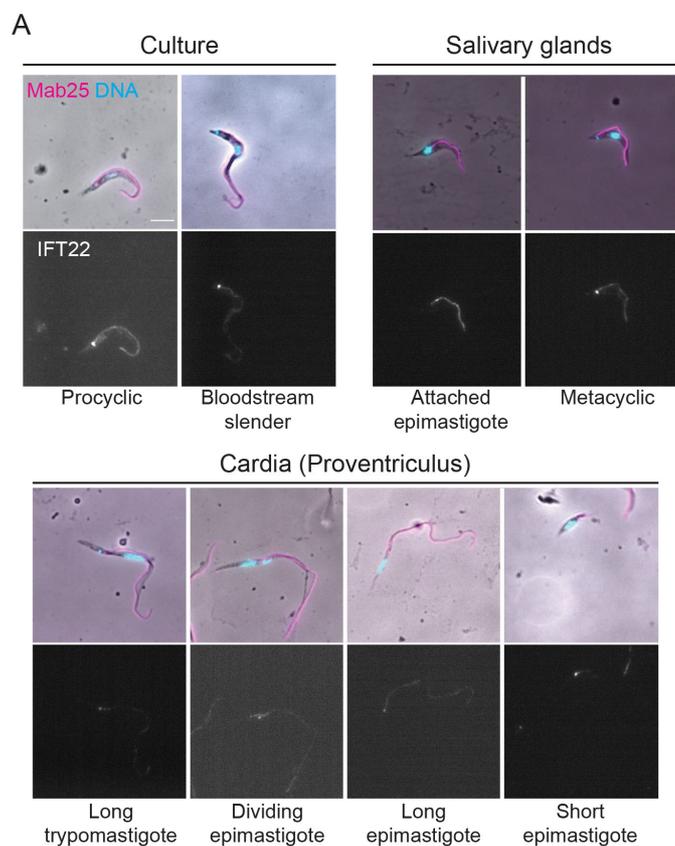
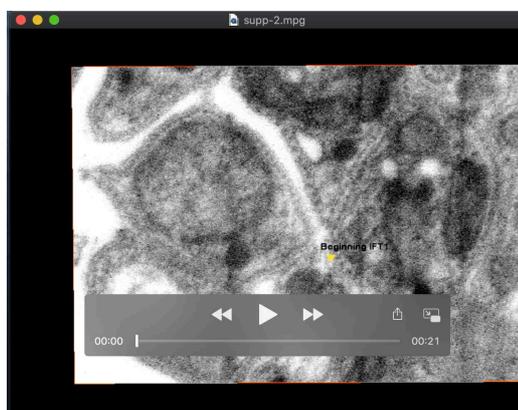


Fig. S2. IFT22 distribution during the *T. brucei* parasite cycle. (A) Parasites isolated from tsetse flies or grown in culture were fixed in cold methanol and stained with the Mab25 antibody to detect the axoneme (magenta) and the anti-IFT22 antibody (white). The top panels show the phase-contrast images merged with DAPI (cyan) and Mab25 signals (magenta). The bottom ones show the IFT22 fluorescent signal (white). Scale bar: 5µm. (B) Quantification of the total amount of IFT22 fluorescent signal in the flagellum normalized to flagellum length for each stage of the parasite cycle. The ROI was defined by the axonemal marker and used to measure the flagellum length. The fluorescence intensity directly reflects the total amount of IFT22 proteins present in the flagellum compartment. n=35 cells per stage. BSF: Slender bloodstream form, PC: Procyclic form, LT: Long trypomastigote, LDE: Long dividing epimastigote, SDE: Short dividing epimastigote, LE: Long epimastigote, SE: Short epimastigote, AE: Attached epimastigote, MT: Metacyclic trypomastigote.



Movie 1. FIB-SEM analysis of parasites in the cardia. The region shown corresponds to that indicated by black squares at Figure 3. Two IFT particles are indicated by arrowhead: the first one (IFT1) is a long train found on doublet 8 and the second one is present on doublet 4 (IFT2). This video is related to Figure 3.



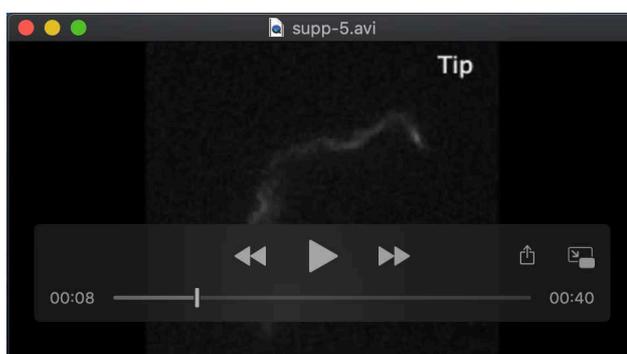
Movie 2. IFT trafficking in bloodstream (first in sequence) and procyclic cells grown in culture. Cells are expressing TdT::IFT81 following *in situ* tagging and display IFT trafficking. The bright signal at the base of the flagellum is clearly visible. The base and the tip of each flagellum are indicated. The video plays at real time. This video is related to Figure 5.

J. Cell Sci.: doi:10.1242/jcs.248989: Supplementary information



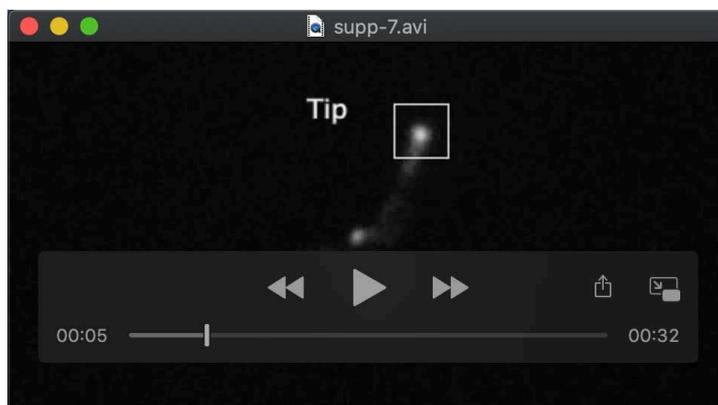
Movie 3. IFT trafficking in parasites isolated from the salivary glands showing first an attached epimastigote and then a metacyclic cell. Trypanosomes are expressing TdT::IFT81 following *in situ* tagging and display IFT trafficking. The bright signal at the base of the flagellum is clearly visible. The base and the tip of each flagellum are indicated. The video plays at real time. This video is related to Figure 5.

J. Cell Sci.: doi:10.1242/jcs.248989: Supplementary information



Movie 4. IFT trafficking in parasites isolated from the cardia of an infected tsetse fly. The sequence shows successively a long trypomastigote, a dividing epimastigote (trafficking visible in both old and new flagella), a long epimastigote (retrograde trains are nicely visible at the end of this sequence) and a short epimastigote with the typical accumulation of IFT proteins at the tip of the short flagellum. Cells are expressing TdT::IFT81 following *in situ* tagging and display IFT trafficking. The bright signal at the base of the flagellum is clearly visible. The base and the tip of each flagellum are indicated. The video plays at real time. This video is related to Figure 5.

J. Cell Sci.: doi:10.1242/jcs.248989: Supplementary information



Movie 5. Two examples of FRAP analysis of short epimastigote cells expressing TdT::IFT81. The distal portion of the flagellum was bleached with a brief laser pulse. Entry of new anterograde IFT trains in the flagellum can be monitored, they reach the distal tip where signal progressively comes back before smaller, less bright, retrograde trains can be detected. The base and the tip of each flagellum are indicated. The square shows the portion of the flagellum that was photobleached. This video is related to Figure 6. The first cell goes briefly out of the plane of focus.

La construction des trains IFT

La deuxième partie de ma thèse vise à comprendre comment les trains antérogrades sont construits.

I. Composition moléculaires des trains antérogrades

Dans l'introduction, nous avons vu que dans certaines conditions, les IFT-A ou les IFT-B peuvent voyager indépendamment avec les kinésines hétérotrimériques ou homodimériques (Ou et al., 2005).

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si, chez le trypanosome, les protéines de l'IFT-A voyageaient toujours avec celles de l'IFT-B ou s'il existe des trains antérogrades contenant seulement l'un ou l'autre complexe. Nous avons développé un moyen d'observer l'IFT-A et l'IFT-B simultanément dans des conditions contrôles et nous verrons dans les sections suivantes ce qu'il en est lorsqu'on réduit progressivement la quantité d'une protéine de l'un ou de l'autre complexe dans les lignées *IFT88^{RNAi}* et *IFT140^{RNAi}*. La stratégie utilisée a été de construire une souche *IFT88^{RNAi}* et une souche *IFT140^{RNAi}* exprimant en même temps une protéine IFT-A et une protéine IFT-B marquées avec des fluorochromes différents. L'IFT88 et l'IFT140 ont été choisies car ce sont deux protéines des cœurs du complexe B et A. Les souches *IFT88^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* et *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* ont été construites par Thierry Blisnick. Ces souches ont été observées à l'aide d'un microscope de type *spinning disk* avec un objectif 100x et équipé de deux caméras permettant des acquisitions simultanées. Sur les vidéos obtenues, les signaux fluorescents correspondant à la mNG::IFT140 et la Tdt::IFT81 sont visibles (Figure_Résultat 1).

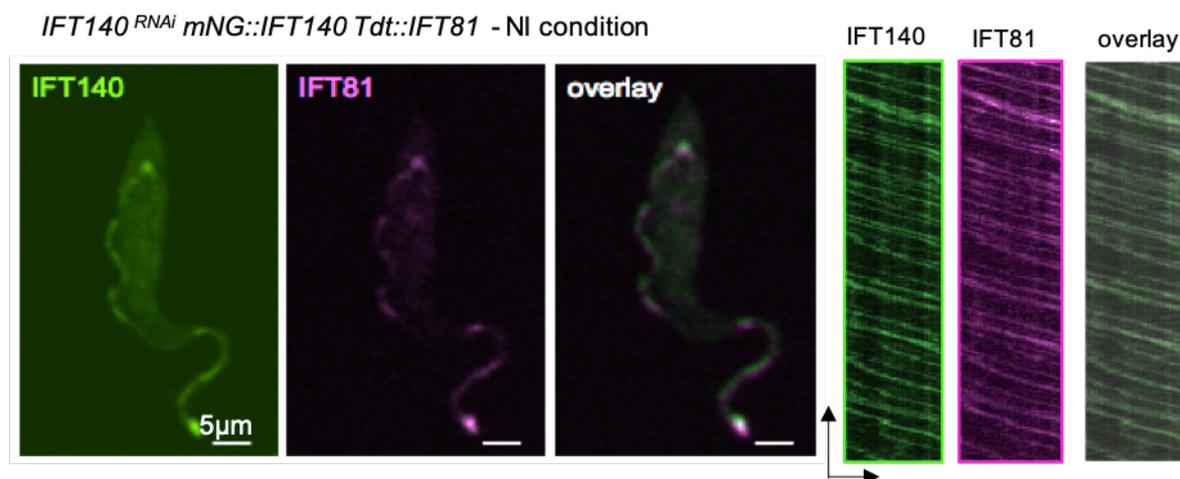
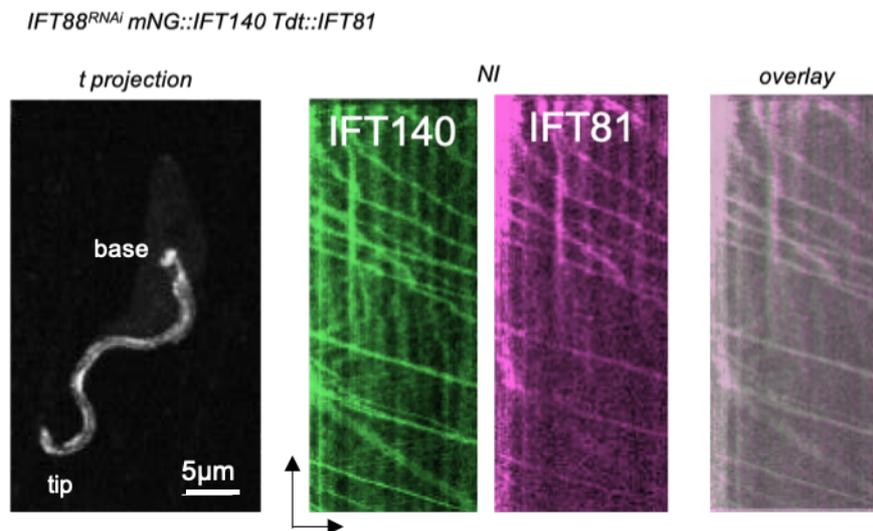


Figure Résultat 1 : l'IFT-A et l'IFT-B colocalisent dans *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81*

Images extraites des vidéos faites sur cellules vivantes de la souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* en absence d'induction de l'ARNi. IFT140 et IFT81 exprimées en fusion avec la mNeonGreen (vert) et la TandemTomato (rose) sont observées avec un objectif 100X d'une ouverture numérique à 1.4 en acquisition simultanée. Une projection temporelle (t projection) permet de définir la région d'intérêt pour extraire les kymographes. Les kymographes correspondant à chaque vidéo sont présentés : la mNG::IFT140 en vert, la Tdt::IFT81 en rose et la superposition des deux canaux (overlay) est également représentée à droite.

Dans les 2 canaux, un signal est visible à la base du flagelle. Les mouvements des protéines fluorescentes sont visibles dans les deux canaux : vert et rose. En condition contrôle, sur des cellules *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* et *IFT88^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* non induites (*Figure_Résultat 1 et 2*), les signaux fluorescents pour la mNeonGreen et la TandemTomato corrént, aussi bien à la base du flagelle et que pour les spots en mouvement le long de l'organite. La corrélation est visible sur les films directement et se confirme sur les kymographes extraits pour chaque canal (*Figure_Résultat 1 et 2*). La quantification du nombre de trains antérogrades observés pour la mNG::IFT140 et pour la Tdt::IFT81 révèle une colocalisation de 98 %. A notre connaissance, c'est la première description de colocalisation entre des protéines de l'IFT-A et de l'IFT-B en cellules vivantes chez *Trypanosoma brucei*, et seulement la deuxième dans n'importe quelle espèce après le cas de *Chlamydomonas* (Picariello et al., 2019).

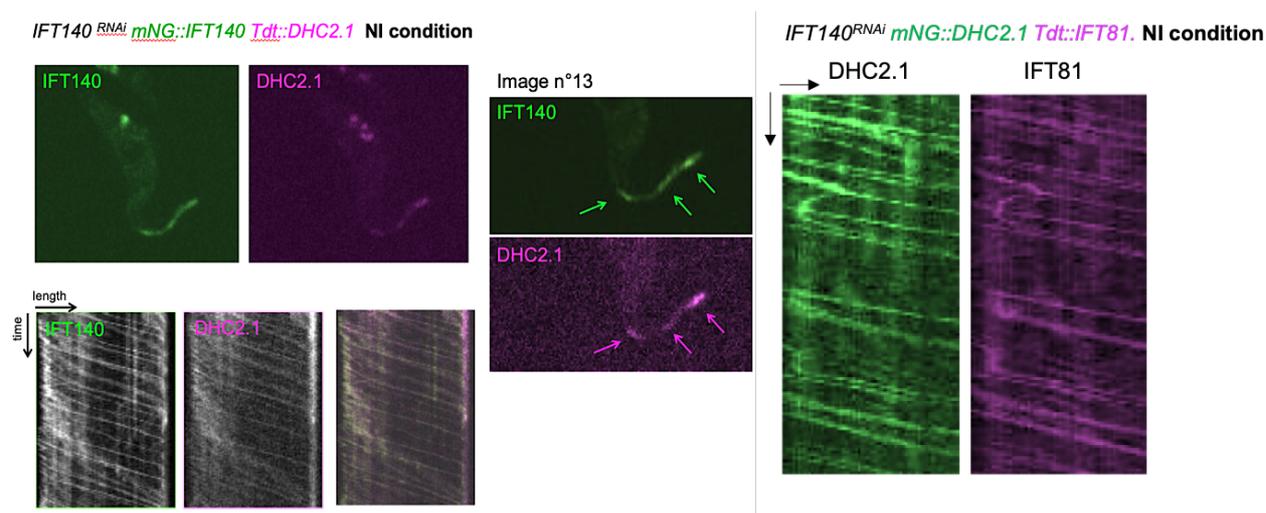


Figure_Résultat 2 : IFT-A et IFT-B colocalisent dans *IFT88^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81*

Souche *IFT88^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* non induite étudiée en microscopie en fluorescence sur cellules vivantes. Les kymographes sont représentés en vert pour la mNG::IFT140 et en rose pour la Tdt::IFT81. La superposition (overlay) de la mNG::IFT140 et de la Tdt::IFT81 est présentée à droite et révèle une colocalisation quasi parfaite.

Dans la littérature, la dynéine est décrite comme un cargo des trains antérogrades (Lehtreck et al., 2017). Après avoir démontré que tous les trains contiennent de l'IFT-A et de l'IFT-B, nous avons voulu vérifier si tous ces trains transportaient de la dynéine. Est-ce que la dynéine colocalise aussi avec l'IFT-A et l'IFT-B ? Pour cela nous avons utilisé une souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1* et une souche *IFT140^{RNAi} mNG::DHC2.1 Tdt::IFT81*. Dans ces deux souches en absence d'induction de l'ARNi, les signaux mNG::IFT140 et Tdt::DHC2.1 ou mNG::DHC2.1 et Tdt::IFT81 sont toujours ensemble. Dans les conditions non induites, l'analyse des kymographes révèle que mNG::IFT140 / Tdt::DHC2.1 et mNG::DHC2.1 / Tdt::IFT81 voyagent ensemble sur le trajet antérograde, avec une colocalisation à 98% pour chacune des deux souches. Une image exemple a été extraite d'une vidéo pour montrer cette localisation comparable des signaux

fluorescents pour la mNG::IFT140 et la Tdt::DHC2.1 (Figure_Résultat 3, panneau de gauche), ainsi que pour la mNG::DHC2.1 et la Tdt::IFT81 (Figure_Résultat 3, panneau de droite).



Figure_Résultat 3 : IFT-A , IFT-B et dynéine 2 dans la construction des trains IFT

Images extraites des vidéos de microscopie photonique et les kymographes correspondants. Panneaux de gauche : la souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1* en condition non induite (NI). La mNG::IFT140 (en vert) et la Tdt::DHC2.1 (en rose) colocalisent. Panneaux de droite : *IFT140^{RNAi} mNG::DHC2.1 Tdt::IFT81* non induite, les signaux colocalisent entre mNG::DHC2.1 (en vert) et Tdt::IFT81 (en rose).

Notons toutefois que la résolution n'est pas suffisante pour discriminer des micro-domaines discrets, par exemple au niveau de la zone de transition ou des fibres de transition. Il est donc possible que ces deux protéines soient proches mais pas associées à la base du flagelle. Ces données suggèrent néanmoins que la dynéine voyage toujours avec l'IFT-A et avec l'IFT-B. Cumulé avec les précédentes conclusions, nous avons prouvé, pour la première fois chez le trypanosome, que l'IFT-A, l'IFT-B et la dynéine sont toujours transportés ensemble en condition contrôle.

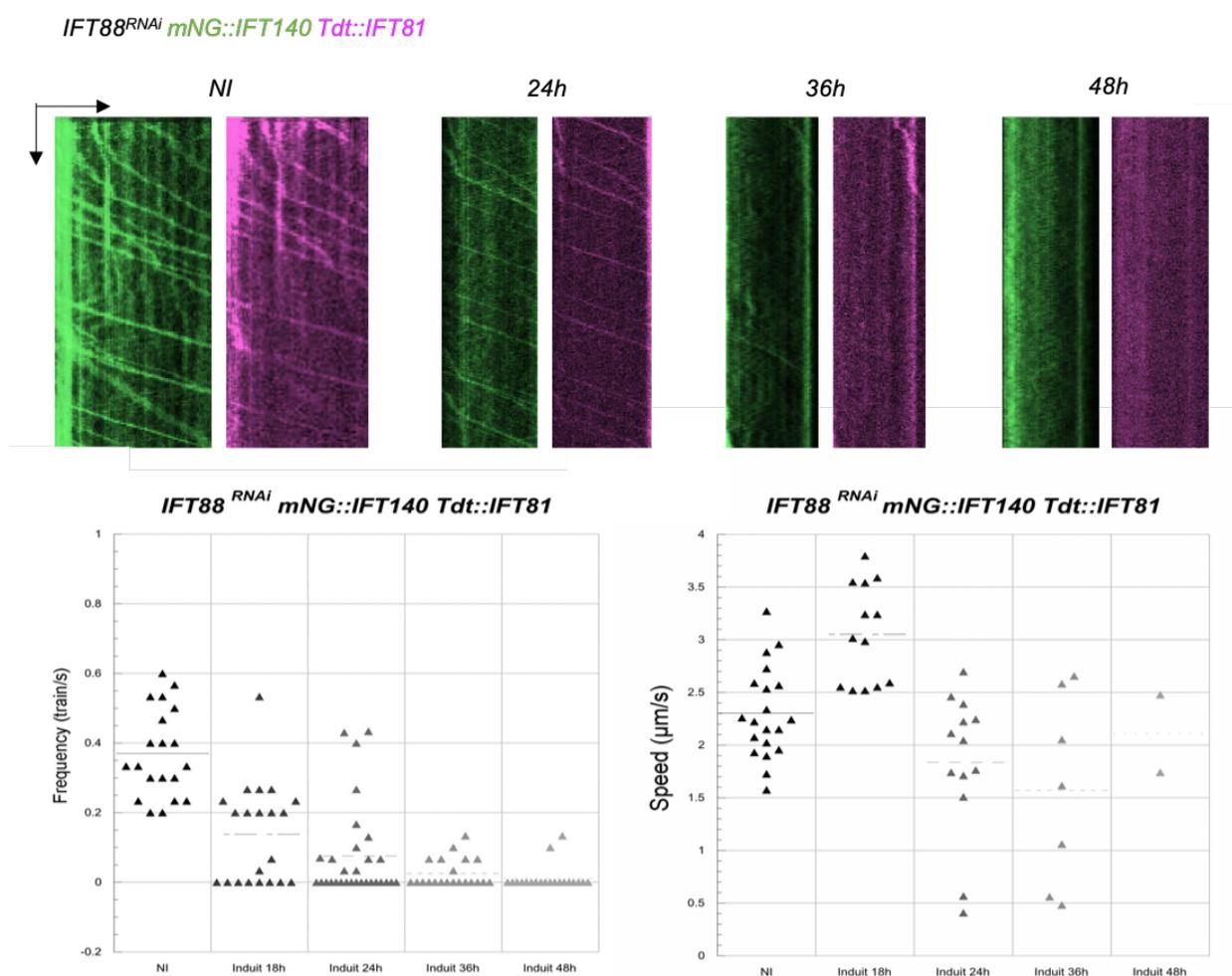
II. Rôle de l'IFT-B dans la formation des trains antérogrades

Les trains antérogrades sont donc composés d'IFT-A, d'IFT-B et de dynéine. L'IFT-B étant le composant majoritaire, nous avons recherché l'impact de la réduction de son abondance sur le comportement de l'IFT-A et sur la formation des trains (aspect structural et longueur des trains IFT).

2.1 L'extinction d'IFT88 affecte sévèrement le transport antérograde

Pour comprendre le rôle de l'IFT-B dans la construction des trains IFT, nous avons étudié la souche *IFT88^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81*. Quatre temps d'induction ont été effectués : T0, 24h, 36h et 48h (Figure_Résultat 4). En condition non induite nous avons vu que les signaux fluorescents pour la mNeonGreen et la TandemTomato étaient colocalisés. Après induction de l'ARNi par addition de tétracycline, nous observons le phénotype attendu : inhibition de la formation des nouveaux flagelles, et émergence de petites cellules non flagellées, (Kohl et al., 2003). Nous avons examiné

les vieux flagelles dont la longueur est maintenue, comme observé précédemment (Fort et al., 2016). Nous avons observé l'impact de la réduction de l'abondance d'IFT88 dans ces flagelles. La fréquence d'événements de transport de mNG::IFT140 et de la Tdt::IFT81 diminue dès 24h. A 36h d'induction, très peu de trains en mouvement sont observés. 35% des cellules présentent des mouvements de protéines fluorescentes correspondant au signal mNG::IFT140, puis seulement 10% après 48h (Figure_Résultat 4)). Les mêmes observations ont été faites avec la Tdt::IFT81. Sur la base des kymographes, dans le sens antérograde, la mNG::IFT140 et la Tdt::IFT81 colocalisent à 98% et ce quel que soit le temps d'induction. La vitesse moyenne des trains observés en condition non induite est de 2,6 $\mu\text{m/s}$ et varie en fonction des temps d'induction mais en restant dans des valeurs comprises entre 3 et 1,5 $\mu\text{m/s}$. Après 48h d'induction, la fréquence des trains est donc fortement impactée contrairement à leur vitesse qui n'est que légèrement diminuée. Ces résultats montrent que l'IFT-B est bien essentiel à la construction des trains.



Figure_Résultat 4 : Rôle de l'IFT-B

Souche *IFT88^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* étudiée en microscopie à fluorescence sur cellules vivantes. Les kymographes pour chaque condition d'induction sont représentés en vert pour la mNG::IFT140 et en rose pour la Tdt::IFT81. Les graphiques représentant les fréquences et les vitesses des trains antérogrades par temps d'induction sont présentés.

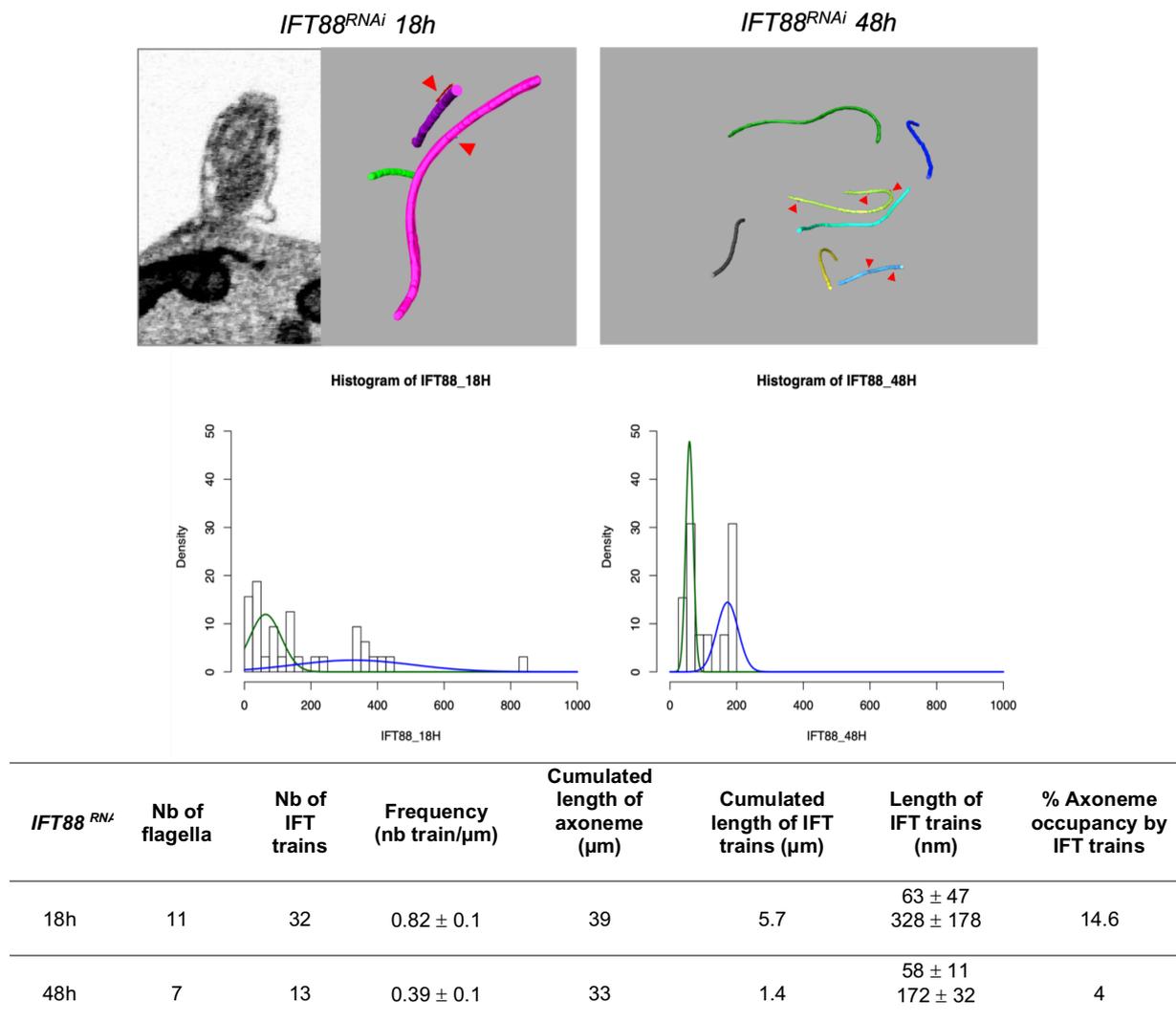
2.2. La structure et la longueur des trains dépendent de la présence d'IFT88

Lorsque l'expression d'IFT88 est inhibée par ARNi, nous n'observons plus de mouvement, mais est-ce qu'il reste des trains arrêtés ou des trains qui ne contiendraient ni IFT140 et ni IFT81 ? Ces trains pourraient correspondre à des assemblages minimaux qui pourraient se déplacer quand même, comme ce qui avait été observé chez *C. elegans* ou chez le xénope (Ou et al., 2005) (Toriyama et al., 2016).

Afin de voir les trains IFT dans les flagelles nous avons utilisé la microscopie électronique 3D via FIB-SEM pour observer les trains IFT en condition non induite puis lorsque l'IFT-B est diminuée par ARNi. En absence de volume IFT88^{RNAi}, les données obtenues sur la souche IFT140^{RNAi} serviront de référence. Les cellules IFT88^{RNAi} ont été induites pendant 18h et 48h. Elles ont été fixées avant d'être déshydratées et incluses en résine, puis imagées en FIB-SEM. Les volumes obtenus avaient une résolution isotopique de 10nm. De 11 à 16 flagelles ont été analysés par condition. Les particules denses aux électrons situées entre la membrane flagellaire et les doublets de microtubules ont été observées. L'aspect dense de ces trains est semblable aux trains observés sur la souche sauvage (voir premier chapitre des résultats). Ils sont denses et compacts. Ils ont été segmentés puis quantifiés et mesurés. Toutes les analyses quantitatives ont été faites par Sylvain Tréput. Tous les trains sont localisés à proximité des doublets de microtubules 3-4 et 7-8.

Deux populations de trains ont été mises en évidence en fonction de leurs longueurs ($\cong 200\text{nm}$ pour la première population et $\cong 900\text{nm}$ pour la seconde). (Bertiaux et al., 2018a). La longueur moyenne de la première population est de $63\pm 47\text{ nm}$ à 18h et $58\pm 11\text{ nm}$ à 48h et la longueur moyenne des trains de la seconde population est de $328\pm 178\text{ nm}$ à 18h et $172\pm 32\text{ nm}$ à 48h. (Figure_Résultat 5) La fréquence des trains IFT diminue fortement en fonction des temps d'induction. Après 18h, la fréquence des trains est de $0,82\pm 0,1\text{ trains}/\mu\text{m}$ ce qui représente 14,6% de la longueur total des axonèmes. Après 48h, la fréquence diminue de moitié, $0,39\pm 0,1\text{ train}/\mu\text{m}$ ce qui représente 4% des axonèmes. Ces résultats montrent qu'en condition ARNi, lorsque la quantité d'IFT-B est réduite, la longueur des trains IFT diminue ainsi que leur fréquence.

Cette diminution de la fréquence des trains dans les flagelles confirme nos résultats précédents, obtenus en microscopie photonique sur les cellules vivantes. L'ensemble de ces observations montrent que l'IFT-B est un composant essentiel à l'IFT et que la construction et la longueur des trains dépend de la présence de l'IFT-B.

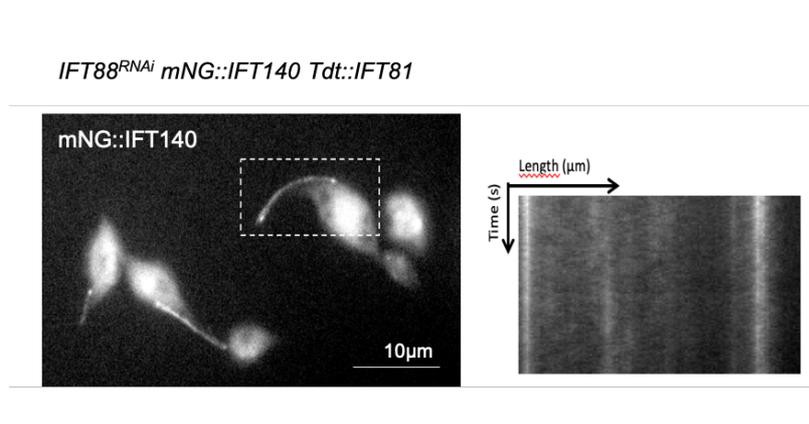


Figure_Résultat 5 : L'IFT-B dans la régulation de la longueur des trains IFT

Image et reconstructions obtenues par FIB-SEM à partir de souche *IFT88^{RNAi}*. Les flèches rouges montrent les trains IFT. Les deux populations (vert / bleu) de longueurs des trains IFT ont été représentées sous forme de graphiques et les données sont détaillées dans le tableau.

2.3. Une localisation inattendue de l'IFT-A

Après 48h d'induction contre *IFT88*, on n'observe plus de trafic ni de *mNG::IFT140*, ni de *Tdt::IFT81* (Figure_Résultat 4). Nous avons cependant été surpris d'observer un signal *mNG::IFT140* diffus dans les flagelles (Figure_Résultat 6). Le signal diffus est visible sur les vidéos et se confirme sur les kymographes où aucune trace de déplacement directionnel n'est visible. Ce résultat prouve qu'en absence d'IFT-B, la *mNG::IFT140* n'est pas transportée dans le flagelle sous forme de trains IFT mais peut tout de même rentrer dans le flagelle.



Figure_Résultat 6 : Localisation de mNG ::IFT140 dans IFT88^{RNAi}

Image de microscopie photonique représentative du signal fluorescent de la mNG::IFT140 dans la souche *IFT88^{RNAi}* après 48h d'induction (objectif 100X). Le kymographe du flagelle encadré est montré à droite.

III. Contribution de l'IFT-A à la formation des trains antérogrades

3.1. Les 6 genes *IFT-A* sont conservés chez *Trypanosoma brucei*

Chez le trypanosome, les 6 gènes *IFT-A* sont bien conservés (Morga and Bastin, 2013) mais ils ont été beaucoup moins étudiés que ceux du complexe B. Les seules données disponibles indiquent un rôle dans le transport rétrograde pour IFT122, IFT140 et IFT144 suite à leur extinction par ARNi (Absalon et al., 2008b). Les données référencées montrent des cellules avec des flagelles très courts, dont l'extrémité distale est dilatée et contient une forte quantité d'IFT172, un composant de l'IFT-B, ou plus de flagelle du tout (Absalon et al., 2008a). La localisation des 6 protéines IFT-A a été rapportée dans TrypTag (<http://tryptag.org/>), un projet visant à déterminer où chaque protéine exprimée du génome de *T. brucei* se localise dans la cellule au stade procyclique (Dean et al., 2017). Les 6 protéines présentent une localisation compatible avec une association à l'IFT (Tableau 1). Pour chaque protéine IFT déjà étudiée, TrypTag recense les amorces utilisées et la localisation des marquages en microscopie.

IFT-A	Other names	TriTryp reference	MW	id with human	TrypTag N-	TrypTag C-	Experimental	Approach	Peptides	Peptide/kDa
IFT144	DYF2/OSEG6/WDR19	Tb927.11.260	149 kDa	32	heterogeneous	IFT profile	IFT trafficking	in situ (C-ter)	8	0.05
IFT140	CHE11	Tb927.10.14470	187 kDa	30	IFT profile	failed	IFT trafficking	in situ (N-ter)	9	0.05
IFT139	TTC21B	Tb927.9.7720	152 kDa	30	IFT profile	IFT profile	IFT trafficking	in situ (N-ter)	13	0.08
IFT122	DAF10/WDR10	Tb927.10.5380	139 kDa	34	cytoplasmic	IFT profile	IFT trafficking	in situ (C-ter)	6	0.04
IFT121	PIFTD4/OSEG4/WDR35	Tb927.5.3030	141 kDa	39	IFT profile	failed	IFT trafficking	in situ (N-ter)	6	0.04
IFT43	C14orf179	Tb927.2.4530	26 kDa	18	heterogeneous	mislocalisation	IFT trafficking	overexpression	4	0.15

Predicted core
Predicted periphery

Staining at base and along flagellum

Flagellum proteome data
from Subota et al., MCP 2014

Tableau 1 : Les 6 gènes encodant les protéines de l'IFT-A sont conservés chez *T. brucei*

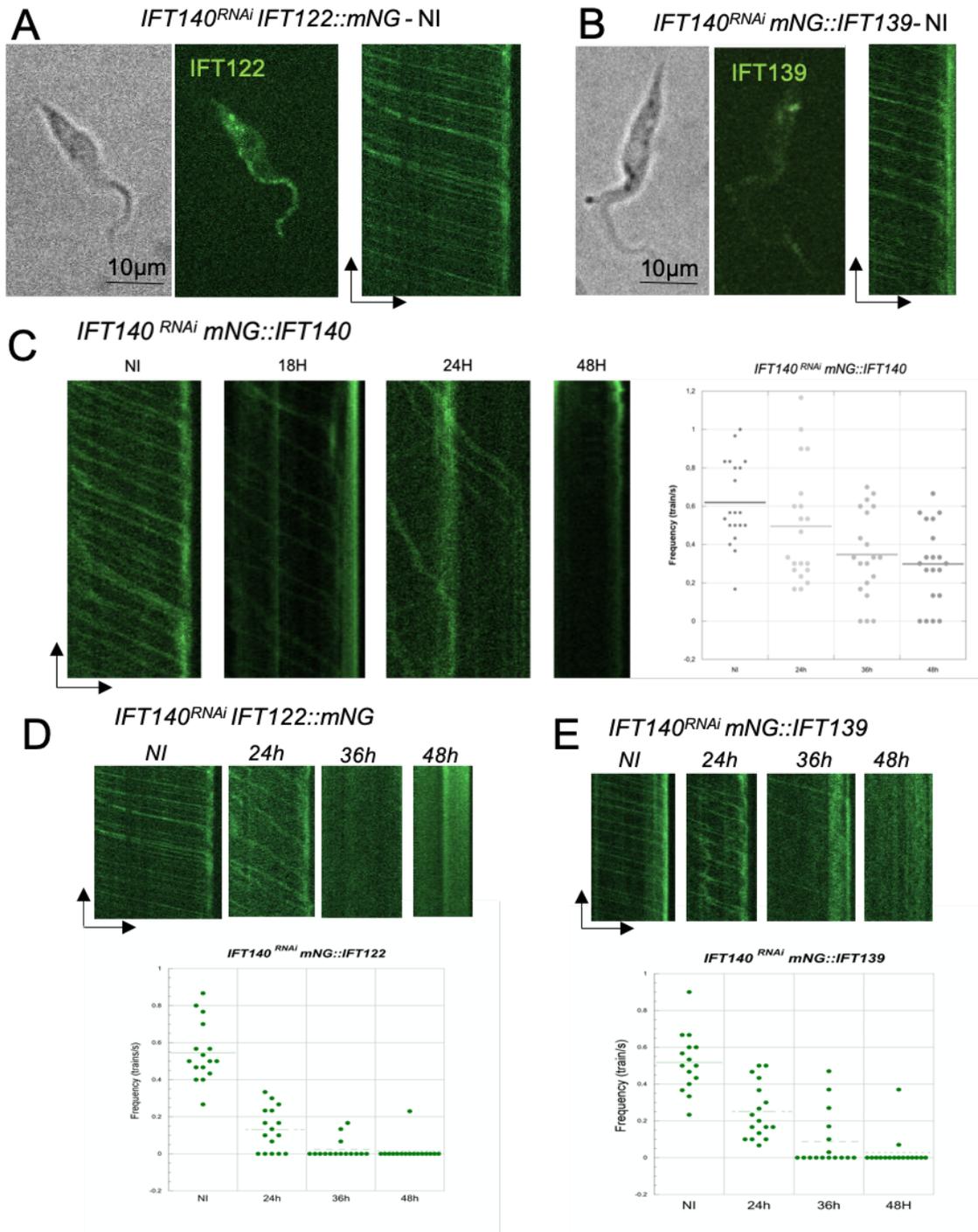
Les 6 gènes *IFT-A* sont listés, le poids moléculaire de la protéine, les différents marquages observés sur TrypTag sont notamment indiqués. La spectrométrie de masse a été utilisée pour quantifier l'abondance de ces protéines dans des flagelles purifiés de trypanosome (Subota et al., 2014).

3.2. Localisation d'IFT140, IFT122 et IFT139

L'IFT peut être observé en microscopie photonique grâce à des marquages endogènes au moyen de protéines fluorescentes. Plusieurs de mes collègues ont déjà observé des protéines IFT-A dans le flagelle du trypanosome grâce à des marqueurs fluorescents tel que la GFP::IFT43 (Jamin Jung), l'IFT144::YFP (Thierry Blisnick), l'IFT122::mNeonGreen ou la mNeonGreen::IFT139 (Ramiro Tomasina et Serge Bonnefoy), ou encore la TandemTomato::IFT140 (Benjamin Morga). Toutes ces protéines IFT-A étaient concentrées à la base des flagelles et se déplaçaient dans les sens antérograde et rétrograde.

Des analyses de protéomique ont été effectuées sur des flagelles intacts isolés par Inès Subota et Daria Julkowska (Subota et al., 2014). L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier un total de 751 protéines avec un degré de confiance élevé, y compris 88% des composants flagellaires connus. On y retrouve la quasi-totalité des protéines IFT, dont les 6 protéines IFT-A. Il est à noter que leur abondance est deux fois moindre que celle des protéines du complexe IFT-B (Tableau 1), comme observé précédemment chez *Chlamydomonas* (Lechtreck et al., 2009). Ces données confirment que les 6 protéines IFT-A du trypanosome sont bien associées au transport intraflagellaire mais aucune étude quantitative ou fonctionnelle plus poussée n'a été effectuée.

Nous avons dès lors décidé de quantifier plus précisément le mouvement des protéines du complexe A. Nous avons choisi d'introduire des marqueurs fluorescents pour observer deux protéines du cœur/noyau du complexe A (IFT122 et IFT140) et une protéine périphérique (IFT139), avec l'objectif de voir si toutes les protéines de l'IFT-A se déplacent à la même fréquence et à la même vitesse que les protéines du complexe IFT-B ou de façon indépendante. Dans TrypTag, les marquages en amino-terminal pour IFT139 et IFT140 fonctionnent bien mais les marquages pour IFT122 ne fonctionnent qu'en carboxy-terminal. Le marquage en amino-terminal est en général privilégié car il permet le contrôle de l'expression par le 3' non traduit du gène ciblé (Clayton, 2002). Pour permettre des études fonctionnelles, ces expériences ont été reproduites dans une souche où l'expression de la protéine IFT140 peut être éteinte de façon inductible par ARNi (Figure_Résultat 7).



Figure_Résultat 7 : Transport des protéines IFT-A

Observations au microscope photonique (spinning disk) des souches de trypanosomes *IFT140^{RNAi}* exprimant l'IFT122 (A), l'IFT139 (B) ou l'IFT140 (C) couplées à la mNeon Green. Les cellules ont été observées entre lame et lamelle avec un objectif 100X. En (A) et (B), l'image de la cellule en contraste de phase et la première image de la vidéo faite en fluorescence sont présentées, ainsi que le kymographe de la vidéo associée (temps en fonction de la longueur des flagelles). Les kymographes et les graphiques (D, E) représentent les fréquences des trains antérogrades analysés en fonction des temps d'induction de l'ARNi allant de 0 à 48h par condition. L'extinction d'IFT140 s'accompagne de la perte de trafic de l'IFT122 et de l'IFT139.

Il est possible de suivre la localisation et le mouvement de l'IFT140, l'IFT122 ou l'IFT139 dans les flagelles des trypanosomes grâce au marquage de ces protéines par la mNeon Green suite au « tagging » du gène *in situ* (Dean et al., 2015). Pour chacune de ces trois conditions contrôles, plus de 200 trains antérogrades ont été analysés (Figure_Résultats 7). Dans les trois cas, un marquage fluorescent à la base du flagelle est visible et un mouvement de trains fluorescents est observé. Au moins 20 vidéos de 30s ont été réalisées pour extraire les kymographes pour chaque condition. Les vitesses et les fréquences des trains antérogrades marqués par IFT122::mNG, mNG::IFT140 et mNG::IFT139 sont similaires (Tableau 2), les trains vont de la base au bout distal du flagelle à une vitesse moyenne de 2-3 $\mu\text{m/s}$ et à une fréquence de 0,5 train/s en condition contrôle (en absence d'induction de l'expression d'ARN double brin). L'intensité du signal est plus faible que celle observée pour des protéines de l'IFT-B comme mNG::IFT81. Ce phénomène est peut-être dû à une plus faible concentration de protéines du complexe A dans le flagelle comme observé lors des analyses protéomiques (Tableau 1).

3.3. Le trafic intraflagellaire d'IFT122 et IFT139 dépend d'IFT140

En induisant l'extinction d'IFT140 dans la souche *IFT140^{RNAi}*, nous avons étudié le comportement des trois protéines de fusion IFT140, IFT122 et IFT139. Pour prouver l'efficacité de l'ARNi, nous avons tout d'abord suivi la quantité d'IFT140. En l'absence d'anticorps spécifique contre l'IFT140 de *T. brucei* (ou de la mNeon Green) fiables en western blot, nous avons pensé à ajouter un Ty-1 Tag dans la construction de la souche permettant la fusion mNG::IFT140 mais la quantité de Ty-1 Tag était malheureusement trop faible pour être détectable. Nous avons donc suivi le niveau de fluorescence de la protéine de fusion mNG::IFT140 pour prouver l'efficacité de l'ARNi. Après 48h d'induction, il n'y a quasiment plus de mouvement observé par microscopie (fréquence = 0,05 trains/s, contre 0.5 trains/s pour le non-induit), ce qui prouve l'efficacité de l'extinction par ARNi. A des temps d'induction intermédiaires, lorsque la quantité d'IFT140 diminue mais que le signal fluorescent de la mNeonGreen est toujours détecté, la fréquence des trains antérogrades marqués diminue progressivement jusqu'à 48h (Tableau 2).

La vitesse des trains en condition non induite est de 2,2 $\mu\text{m/s}$ et après induction, la vitesse des trains est comprise entre 1,6 et 1,9 $\mu\text{m/s}$. Si la fréquence des trains restants est réduite, leur vitesse n'est donc que peu impactée par la réduction de l'abondance de l'IFT140. Autrement dit, la diminution de la quantité d'IFT140 entraîne une réduction de la fréquence des trains antérogrades dans le flagelle mais leur vitesse n'est affectée que partiellement.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'effet de la diminution de l'abondance de l'IFT140 sur l'IFT122::mNG et la mNG::IFT139. Après induction de l'ARNi dans les souches respectives, la fréquence de transport antérograde de l'IFT122::mNG et de la mNG::IFT139 diminue de façon drastique. Après 24h d'induction, la fréquence des trains est divisée par deux. Aux temps intermédiaires de la cinétique d'ARNi, la vitesse des trains marqués par IFT122::mNG est nettement plus basse que celle observée pour mNG::IFT139 et mNG::IFT140 (Tableau 2).

Après 48h d'induction, il n'y a virtuellement plus de mouvement de signaux fluorescents détectés dans les flagelles des trypanosomes. L'ensemble de ces résultats montrent que le transport de IFT122 et de IFT139 dépend de la présence d'IFT140. Nous supposons que le complexe A ne se forme plus ; bien que nous n'en ayons pas la preuve formelle. On ne peut pas exclure qu'un morceau du complexe se

forme mais qu'il n'est pas compétent pour entrer dans le flagelle ou pour assembler un train fonctionnel.

Il est important de pointer le fait que les fréquences et les vitesses de déplacement des protéines IFT-A marquées sont comparables aux données déjà observées dans le passé pour les IFT-B (principalement IFT81) dans un contexte génétique équivalent (Bhogaraju et al., 2013) (Bertiaux et al., 2018b), et donc en accord avec la colocalisation observée entre mNG ::IFT140 et TdT ::IFT81 dans le premier chapitre des résultats (Figures_Résultat 1 et 2).

<i>IFT140^{RNAi} mNG::IFT140</i>	Frequency (trains/s)	Speed ($\mu\text{m/s}$)	n trains
NI	0.53 \pm 0.2	2.198 \pm 0.45	353
24h	0.36 \pm 0.12	1.90 \pm 0.53	296
36h	0.31 \pm 0.14	1.58 \pm 0.58	141
48h	0.05 \pm 0.15	1.78 \pm 0.46	17

<i>IFT140^{RNAi} mNG::IFT139</i>	Frequency (trains/s)	Speed ($\mu\text{m/s}$)	n trains
NI	0.52 \pm 0.16	2.82 \pm 0,81	235
24h	0.25 \pm 0.15	2.06 \pm 0.79	128
36h	0.09 \pm 0.15	1.74 \pm 0.57	63
48h	0.03 \pm 0.09	2.03 \pm 0.55	22

<i>IFT140^{RNAi} IFT122::mNG</i>	Frequency (trains/s)	Speed ($\mu\text{m/s}$)	n trains
NI	0.54 \pm 0.16	3,10 \pm 0,81	262
24h	0.13 \pm 0.12	1,30 \pm 0.61	65
36h	0.02 \pm 0.05	1.24 \pm 0.75	11
48h	0.01 \pm 0.06	1.65 \pm 0.31	7

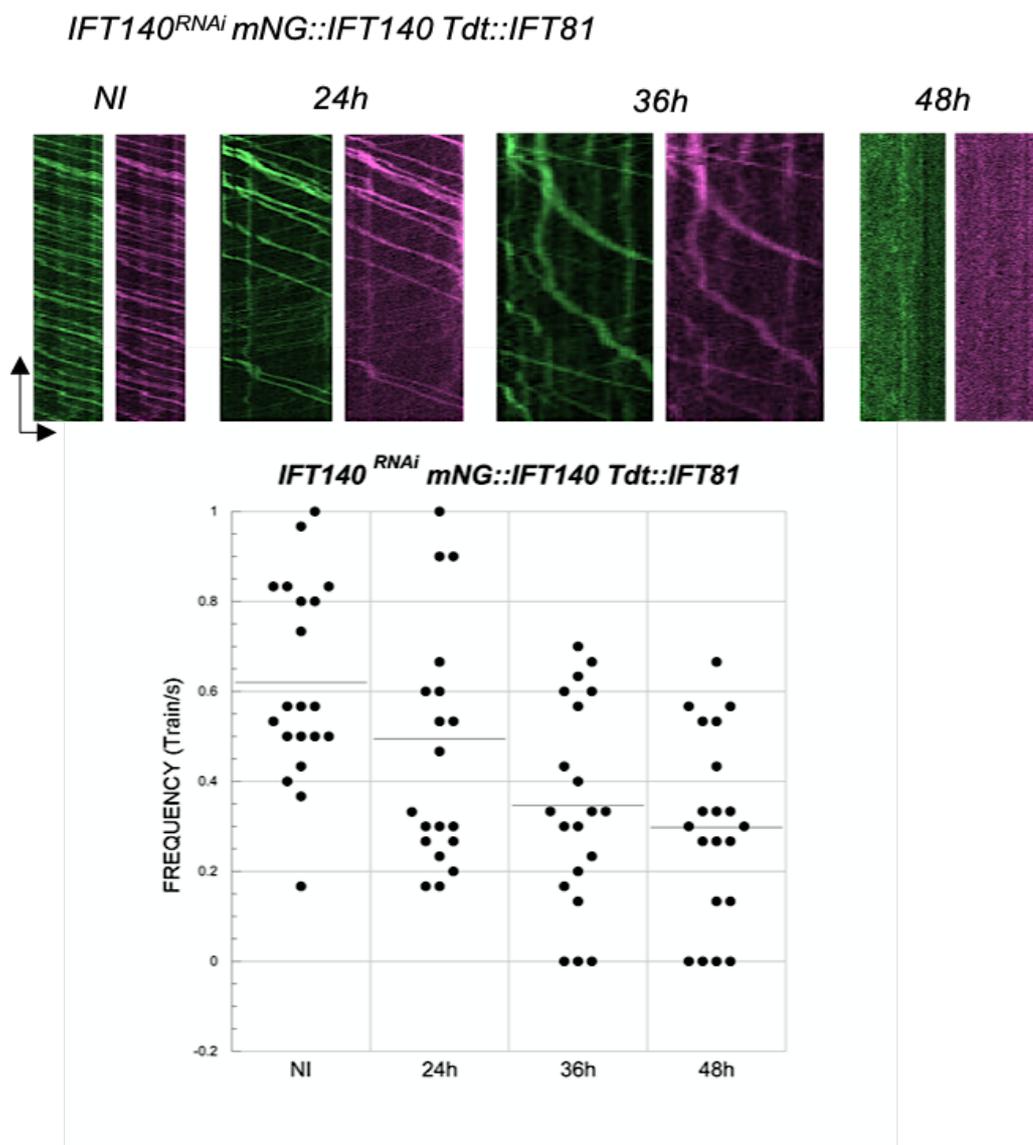
Tableau 2 : Fréquences et vitesses des trains IFT antérogrades

Tableau récapitulatif des résultats obtenus après analyse de 20 films par condition dans les lignées indiquées. Les informations de fréquence et les vitesses des trains ont été extraites des vidéos de 30s à l'aide du logiciel Icy et du plugin Kymograph Tracker 2

3.4. IFT140 est indispensable à la formation des trains antérogrades

Nous avons déjà montré que la formation des trains dépend de la présence d'IFT88, une protéine centrale du complexe IFT-B. Mais les IFT-B sont-elles suffisantes pour construire des trains IFT ? Dans certains cas, les protéines du complexe A peuvent

former des trains indépendamment de la présence d'IFT-B (Ou et al., 2005) (Toriyama et al., 2016). Pour évaluer la contribution de l'IFT-A dans la formation des trains antérogrades, nous avons induit l'ARNi contre IFT140 dans nos souches *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* et *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1*. Nous avons recherché l'impact de l'inhibition de l'abondance d'IFT140 (1) sur le transport de la TdT::IFT81 et (2) de la Tdt::DHC2.1. Une cinétique d'induction par ARNi allant de 0 à 48h a été réalisée pour les deux souches (Figure_Résultat 8). Comme attendu, la quantité de trains en mouvement marqués par mNG::IFT140 diminue au fur et à mesure des temps d'induction, ce qui est clairement visible sur les kymographes. C'est logique vu que c'est la protéine ciblée par l'ARNi. Mais à tous les temps d'induction, on observe la même réduction de la fréquence des événements de transport de la TdT::IFT81. Celle-ci n'est pas détectée en train de voyager seule comme on aurait pu le supposer si le complexe A n'était pas requis pour la construction des trains. En effet, il y a 98% de colocalisation des signaux mNG::IFT140 et TdT::IFT81 aux temps 24h et 36h. L'IFT-B est donc toujours transporté avec l'IFT-A dans le transport antérograde lorsqu'on réduit la dose d'IFT140. Entre 24h et 48h d'induction, la fréquence de TdT::IFT81 diminue progressivement. Après 48h d'induction, il n'y a presque plus de mouvement de TdT::IFT81 (Figure_Résultat 8).

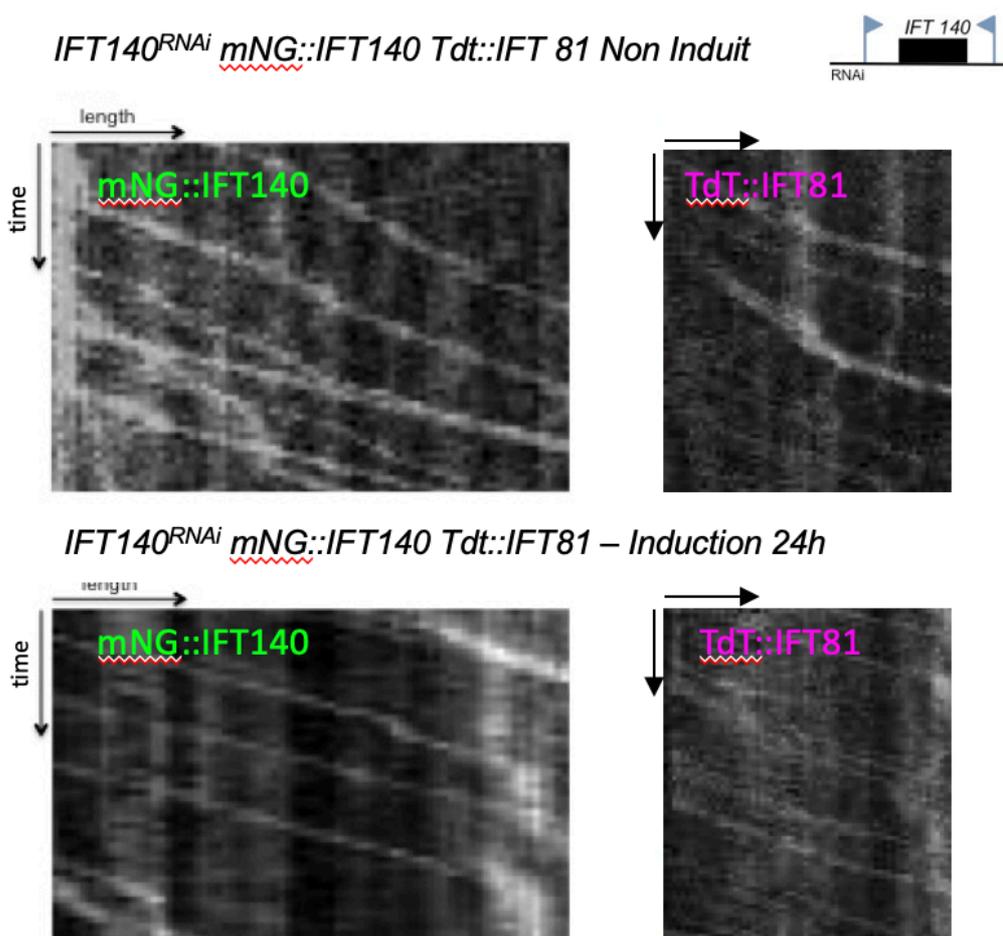


Figure_Résultat 8: Relation entre IFT-A et IFT-B

Kymographes extraits à partir de vidéos de cellules de la souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* non induite et aux différents temps d'induction indiqués. Les kymographes sont représentés en vert pour la mNG::IFT140 et en rose pour la Tdt::IFT81. Les mesures de fréquence des trains sur le canal vert sont représentées sur le graphe.

En regardant attentivement les signaux fluorescents de la mNG::IFT140 et de la Tdt::IFT81 sur les kymographes obtenus sur la souche *IFT140^{RNAi}*, nous avons remarqué que les traces des signaux mNG::IFT140 apparaissent plus fines et moins brillantes après 24h d'induction (Figure_Résultat 9). Est-ce que la quantité d'IFT-B et d'IFT-A par train serait réduite ? Est-ce que la longueur des trains IFT serait plus petite ?

Nous ne pouvons pas répondre avec précision à ces questions sur la base d'images en microscopie photonique dont la résolution est limitée à 200nm.



Figure_Résultat 9 : Comparaison des trains marqués à la mNG::IFT140 et la Tdt::IFT81 en conditions contrôles ou après initiation de l'extinction d'IFT140

Détails des kymographes d'une cellule de la souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81* non induite ou après 24h d'induction. Les traces apparaissent moins brillantes et plus fines pour les deux protéines de fusion fluorescentes.

3.5 IFT140 régule la longueur des trains antérogrades

Nous avons choisi d'utiliser le FIB-SEM pour mesurer la longueur des trains IFT lors d'une cinétique d'extinction de l'expression d'IFT140. Pour des raisons historiques, ces expériences ont été réalisées dans la souche *IFT140^{RNAi}* sans marqueur fluorescent (Absalon et al., 2008b). Trois échantillons ont été préparés : condition non induite puis après 18h et 48h d'induction. Ils ont été fixés chimiquement, puis inclus en résine avant analyse par la microscopie électronique tridimensionnelle FIB-SEM.

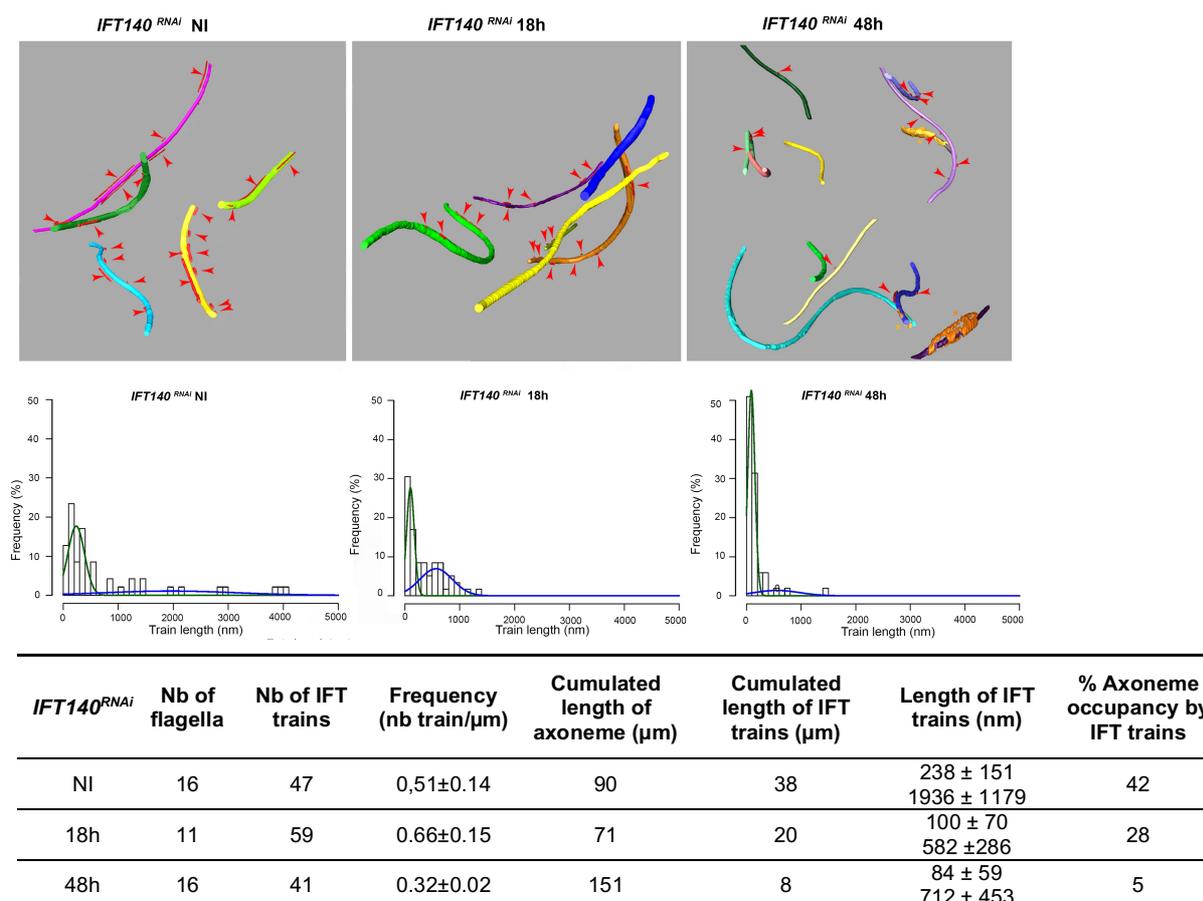
Les trains IFT sont détectables en microscopie électronique car ils sont denses aux électrons et situés précisément entre les doublets de microtubules et la membrane flagellaire. Les flagelles ont été segmentés et les trains IFT ont été annotés manuellement avec le logiciel Amira. J'ai ensuite extrait les données qui ont été analysées par Sylvain Trépot au moyen de MatLab et du logiciel R.

Les trains IFT observés sont moins nombreux et plus petits après 18h et 48h d'induction (Figure_Résultat 10). On remarquera visuellement que la fréquence des

trains ne paraît guère modifiée après 18h d'induction de l'ARNi mais que leur longueur est réduite (Figure 10, image du milieu). Après 48h d'induction de l'ARNi, on détecte beaucoup moins de trains et leur taille est encore plus petite (image de droite).

Nous avons calculé le pourcentage d'occupation cumulé des trains IFT sur la longueur totale d'axonème. Sur la souche non induite, les trains IFT occupent 42% de la longueur total des axonèmes, en accord leur fréquence de détection lors de coupes en microscopie électronique classique (Absalon et al., 2008b) (Fort et al., 2016). Au contraire, ils n'occupent plus que 28% après 18h d'induction et seulement 5% après 48h d'induction. Cette diminution drastique s'explique davantage par la diminution de la longueur des trains plutôt qu'à la diminution de la fréquence des trains et est comparable à celle observée dans la souche *IFT88^{RNAi}* où l'IFT-B était ciblé. Nous avons pu séparer les données de longueur de trains par doublet 3-4 ou 7-8. En condition contrôle, il y a quasiment autant de trains IFT sur les doublets 3-4 (47% des trains) et 7- 8 (53% des trains). A 18h, il y a 44% des trains sur les doublets 3-4 et 56% sur les doublets 7-8. Cette différence est prononcée davantage à 48h d'induction, il n'y a plus que 31% des trains sur les doublets 3-4 mais 69% sur les doublets 7-8. Ces données suggèrent qu'une voie de transport serait peut-être privilégiée par rapport à l'autre.

L'ensemble de nos données montre que l'IFT-A est essentiel à la construction des trains puisque la réduction de l'abondance d'IFT140 affecte la quantité et la longueur des trains de manière très semblable à ce qui a été observé pour *IFT88^{RNAi}*.



Figure_Résultat 10 : Taille de trains IFT analysés en microscopie électronique FIB-SEM.

Analyse par microscopie électronique en 3D FIB-SEM des flagelles de la souche *IFT140^{RNAi}*. Les trains IFT ont été représentés en rouge et sont indiqués par des flèches rouges. Chaque axonème est coloré de façon différente. Les graphiques représentent la répartition des trains IFT en fonction de leur

longueur en conditions non induites, après 18h d'induction et après 48h. Pour chaque condition, deux populations de trains sont détectées et représentées par les courbes vertes et bleues. L'ensemble des données est détaillé dans le tableau.

3.6. Rôle d'IFT140 dans le transport antérograde de la dynéine DHC2.1

Les trains étant plus petits, nous nous sommes posé la question suivante : est-ce que la dynéine peut être chargée sur ces petits trains IFT ? En effet, le modèle structural propose que la dynéine repose sur le train antérograde, ce qui nécessite une longueur suffisante (4 copies d'IFT-B et 2 copies d'IFT-A pour un complexe dynéine ; (Jordan et al., 2018). On pourrait imaginer qu'un train constitué de 2 copies d'IFT-B et d'une seule copie d'IFT-A serait trop petit pour transporter la dynéine.

Dans la première partie des résultats, j'avais utilisé une souche exprimant la mNG::IFT81 et la Tdt::DHC2.1 pour évaluer l'interaction entre le complexe B et le moteur dynéine IFT (Bertiaux et al., 2018a). Au moyen de cette souche, nous avons montré que la mNG::IFT81 et la Tdt::DHC2.1 colocalisaient lors des mouvements intraflagellaires. Pour comprendre le rôle d'IFT140 et du complexe A dans le transport de la dynéine, nous avons développé une souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1*.

IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1 - NI condition

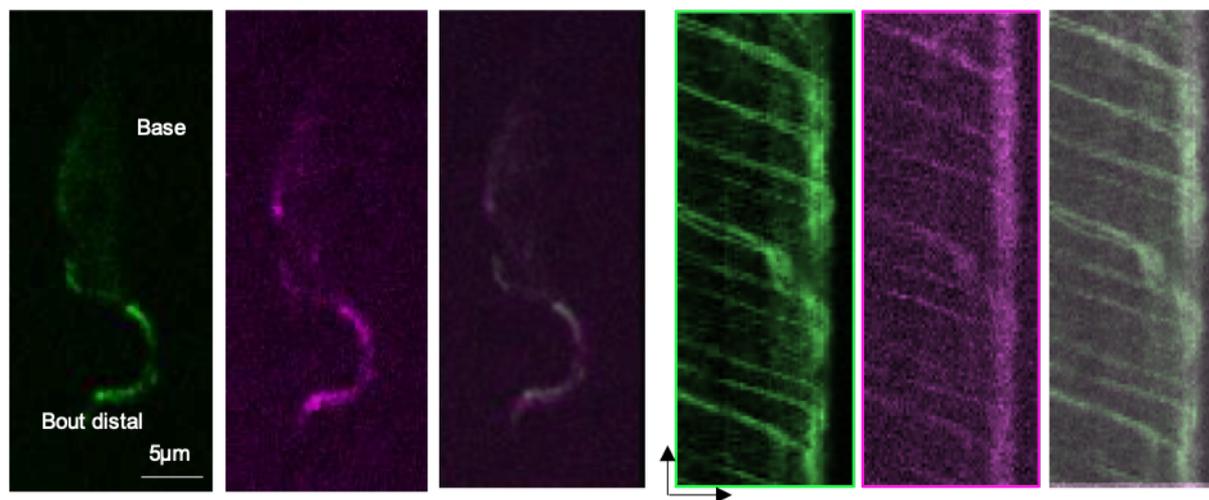


Figure Résultat 11 : Colocalisation de l'IFT-140 et DHC2.1 dans le transport antérograde.

L'IFT140 et la chaîne lourde de la dynéine DHC2.1 ont été marquées par deux protéines fluorescentes différentes, la mNeonGreen (vert) et la TandemTomato (rose) puis les cellules vivantes ont été observées par microscopie photonique avec un objectif 100X d'ouverture numérique de 1.4. La mise au point est faite sur le flagelle, ce qui explique pourquoi la base n'est pas visible. Une image extraite des vidéos est présentée pour la mNeonGreen, la Tandem Tomato et la combinaison des deux ainsi que les kymographes associés. Barre d'échelles= 5µm

Nous avons vu dans la première partie des résultats que l'IFT-A, l'IFT-B et la dynéine sont toujours transportés ensemble en condition contrôle.

Nous avons étudié le comportement de la dynéine lorsque l'IFT-A est affecté après extinction d'IFT140. Nous avons étudié dans un premier temps une souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1* pour pouvoir suivre l'IFT140 et la dynéine 2 dans une même cellule. Dans la souche non induite, nous avons déjà vu que les signaux mNG::IFT140 et Tdt::DHC2.1 sont toujours ensemble (Figure_Résultats 3 et 11). Après 24h d'induction, les signaux mNG::IFT140 et Tdt::DHC2.1 colocalisent mais après 36h d'induction, les signaux divergent. Alors que l'IFT140 trafique toujours dans le flagelle, la dynéine n'est que rarement détectée (Figure_Résultat 12). Les kymographes révèlent que des trains IFT contenant mNG::IFT140 peuvent voyager sans la dynéine (Figure 12).

IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1 after 36h of induction

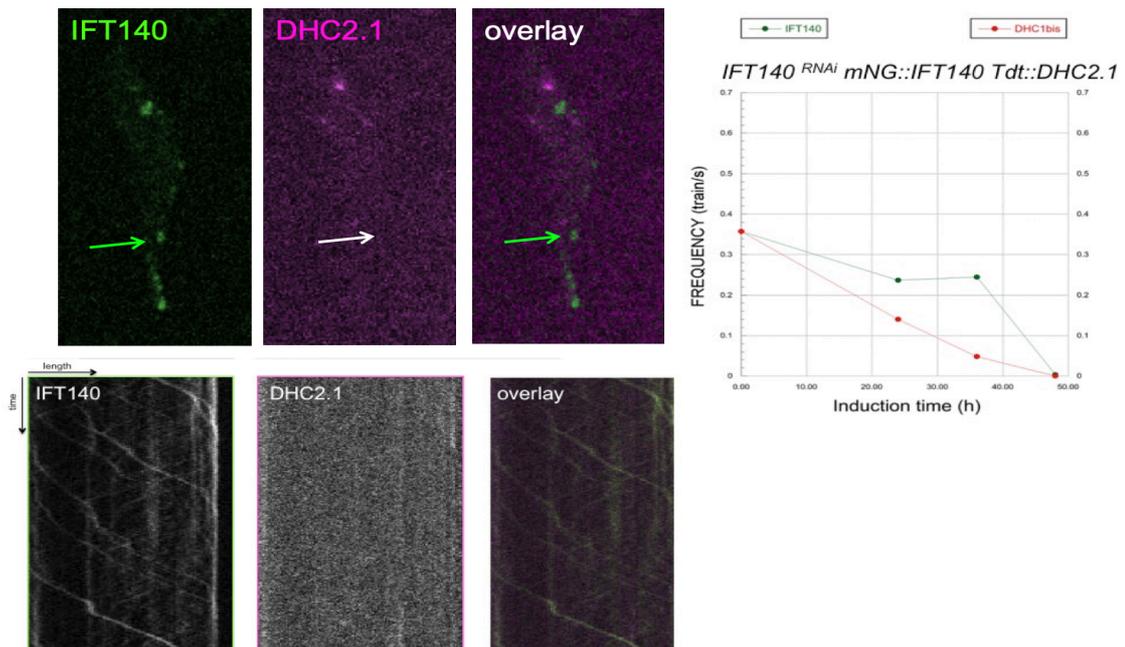


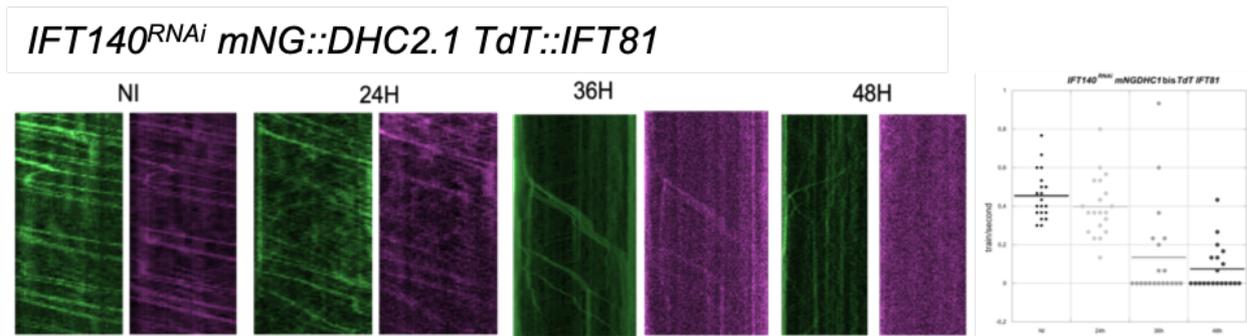
Figure Résultat 12 : La quantité d'IFT-A régule le chargement de la dynéine

Dans la souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1*, après 36h d'induction de l'extinction d'IFT140, les signaux de la mNG::IFT140 et de la Tdt::DHC2.1 se distinguent. La mNG::IFT140 trafique seule et la Tdt::DHC2.1 n'est pas visible sur les trains. Droite : graphique quantifiant la fréquence d'événements de transport positifs pour mNG::IFT140 (vert) ou Tdt::DHC2.1 (rose).

La mNeonGreen est une protéine fluorescente plus brillante et plus stable que la Tandem Tomato. Pour vérifier notre résultat, nous avons donc produit une nouvelle souche *IFT140^{RNAi}* mais en marquant la dynéine avec la mNeonGreen et l'IFT81 par la Tandem Tomato.

Dans cette souche, la mNG::DHC2.1 et la Tdt::IFT81 ont toujours été observées voyageant ensemble, même aux temps intermédiaires d'induction de l'ARNi contre IFT140 (Figure_Résultat 13). Ce résultat contredit notre première observation vu que Tdt::IFT81 est toujours associée à mNG::IFT140 dans des conditions équivalentes. On se serait donc attendu à trouver des trains positifs pour Tdt::IFT81 et pas pour mNG::DHC2.1. Ceci suggère que le signal dans le rouge était peut-être trop faible pour être détecté (Figure_Résultat 12).

La localisation de la dynéine dans les trains antérogrades continue donc d'être étudiée et les nouvelles approches seront présentées dans la partie Discussion.



Figure_Résultat 13 : IFT-A et Dynéine 2 dans la construction des trains IFT

Dans une souche *IFT140^{RNAi} mNG::DHC2.1 Tdt::IFT81* la mNG::DHC2.1 est représentée en vert et la Tdt::IFT81 en rose en fonction des temps d'induction. Les mesures de fréquence des trains sont présentées sous forme de graphique à droite.

IV. Rôle de la kinésine dans la construction des trains IFT

La kinésine II, qui permet le transport des trains antérogrades, contribue-t-elle à leur construction ? Il existe deux possibilités que nous chercherons à discriminer : (1) soit les trains sont formés et la kinésine les transporte, (2) soit la kinésine contribue à la construction des trains IFT.

Nous avons développé une souche *KIN2A2B^{RNAi}* sur laquelle l'IFT81 est marqué par la mNeon Green. En condition contrôle, non induite, la fréquence est de 0,5 trains/s. Cette fréquence est identique à la fréquence qu'Eloïse Bertiaux et Benjamin Morga avaient obtenu avec un rapporteur YFP::IFT81 (Bertiaux et al., 2018b). Après 48h d'induction les flagelles des cellules sont courts mais toujours présents et du transport est observé dans ces petits flagelles. Toutefois, la fréquence des trains chute à 0,2 trains/s (Figure_Résultat 14A). Cette diminution de la fréquence des trains est nettement visible sur les kymographes. L'entrée des trains dans les flagelles est discontinue mais du transport est toujours observé. A la base des flagelles, nous avons remarqué une forte accumulation de mNG::IFT81 (Figure_Résultat 14B). Cette observation suggère que l'IFT-B est accumulé à l'entrée du flagelle lorsque la quantité des kinésines KIN2A2B est diminuée.

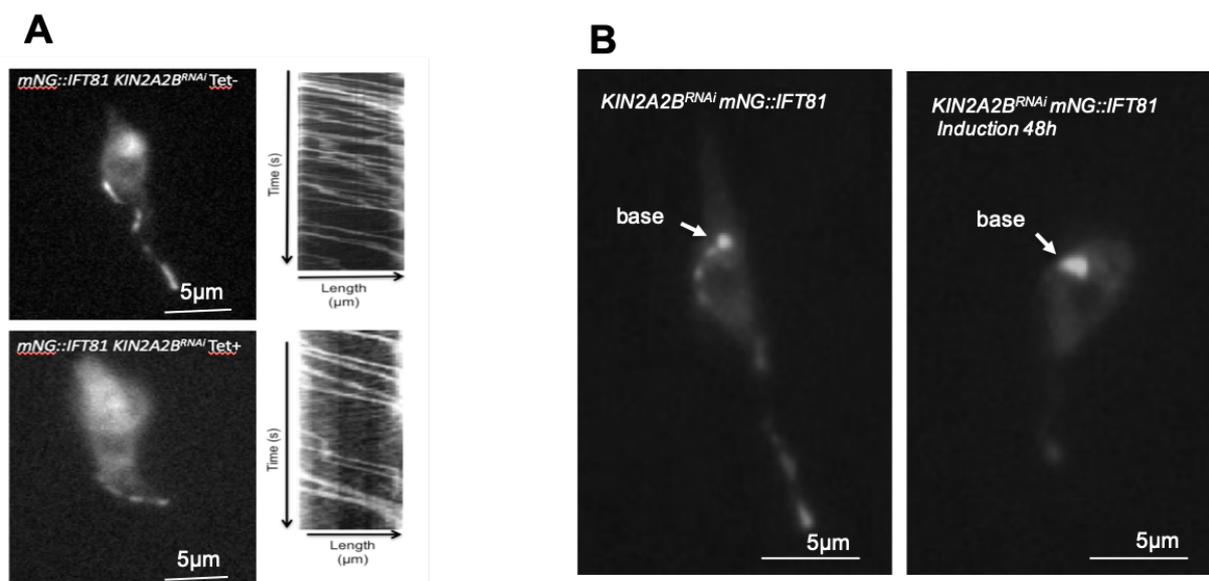
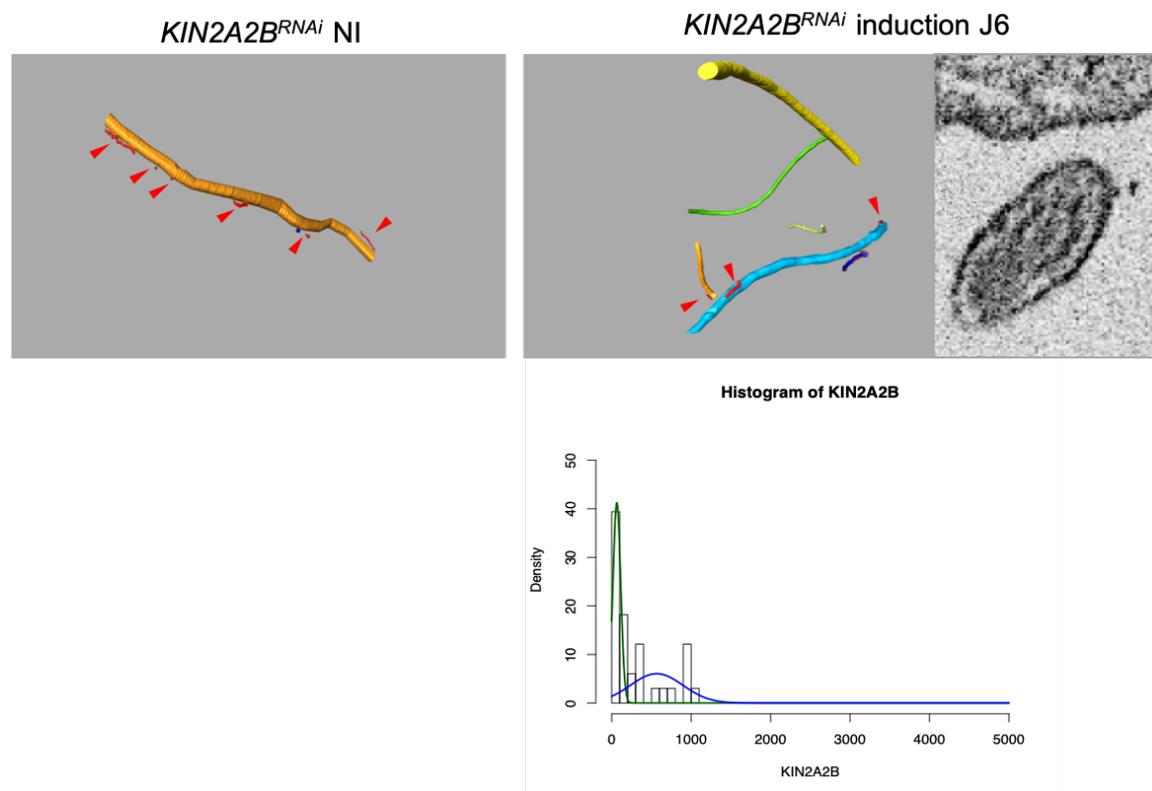


Figure Résultat 14 : *KIN2A2B^{RNAi} mNG::IFT81*

Images de microscopie photonique sur la souche *KIN2A2B^{RNAi} mNG::IFT81* non induite et après 48h d'induction. Les kymographes et graphique représentant les fréquences des trains *mNG::IFT81* sont représentés (A). Mise au point (focus) sur la base des flagelles (flèches blanches) observées sans et après induction (48h).

Pour quantifier et mesurer les longueurs des trains IFT dans la souche *KIN2A2B^{RNAi}*, nous avons utilisé le FIB-SEM (Figure Résultat 15). Lorsque l'expression de *KIN2A* et *KIN2B* est inhibée, les trains IFT détectés dans le flagelle sont moins nombreux (fréquence = 0.39 ± 0.12 train/ μm) en accord avec la baisse de fréquence observée en microscopie photonique.

Par contre, la longueur moyenne des trains IFT a légèrement diminué. La longueur des trains en condition ARNi sont de $L=65\pm 48\text{nm}$ pour la première population (comparé à 207 nm chez les sauvages,) et $L=563\pm 330\text{nm}$ pour la deuxième population (comparé à 800 nm pour les contrôles (Bertiaux et al., 2018a)). Une diminution de la longueur des trains est à noter mais moins importante qu'après induction de l'ARNi pendant 48h ciblant des protéines IFT-A ou IFT-B dans les souches *IFT140^{RNAi}* et *IFT88^{RNAi}*.



<i>KIN2A2B^{RNAi}</i>	Nb of flagella	Nb of IFT trains	Frequency (nb train/ μ m)	Cumulated length of axoneme (μ m)	Cumulated length of IFT trains (μ m)	IFT trains length (nm)	% Axoneme occupancy by IFT trains
Induit J6	13	33	0.33 ± 0.1	99	10.4	65 ± 48 565 ± 330	10.5

Figure_Résultat 15 : Analyse par FIB-SEM des trains dans la souche *KIN2A2B^{RNAi} mNG::IFT81*
 Données FIB-SEM sur une souche *KIN2A2B^{RNAi}*. Les reconstructions montrent les flagelles et les trains IFT segmentés (rouge). Le graphique présentant la longueur des trains IFT et le tableau détaillé sont présentés uniquement pour la souche induite. Les deux populations de trains quantifiées sont représentées en vert et en bleu. Malheureusement, la quantité de flagelles observés dans le bloc avec la souche non induite était insuffisante pour une analyse précise.

Nos résultats montrent que la diminution de KIN2A2B impacte la fréquence d'entrée des trains dans le flagelle mais impacte peu la longueur des trains. Le rôle de la kinésine est important dans la régulation de la fréquence d'entrée des trains IFT dans le flagelle mais probablement moins pour leur construction. La kinésine ne serait donc pas essentielle pour la construction des trains mais plutôt pour leur entrée et bien sûr pour leur transport antérograde.

MATERIELS ET METHODES

I. Lignées cellulaires et construction des souches

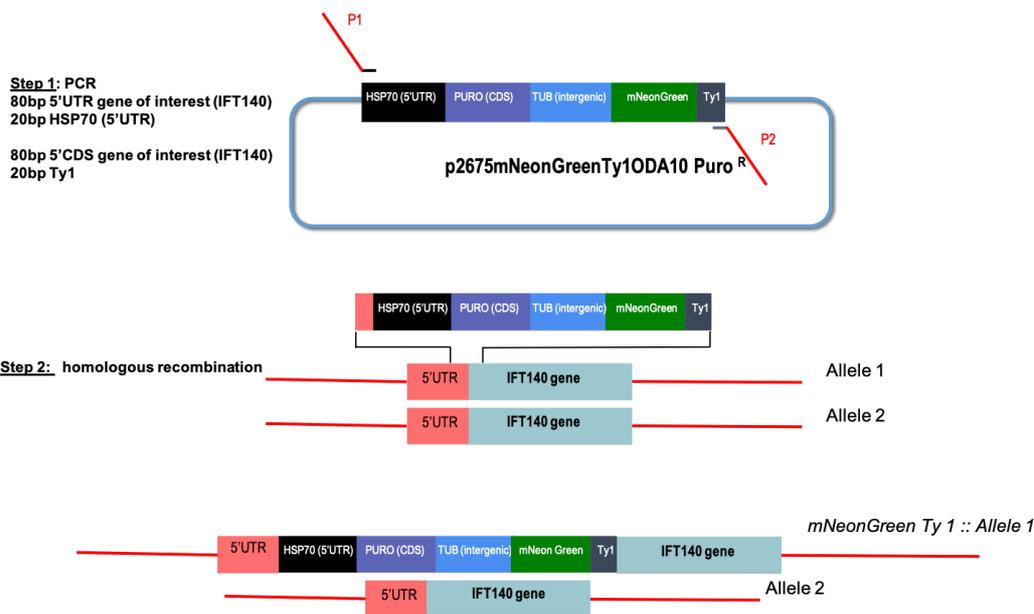
Toutes les cellules utilisées pour ce travail sont dérivées de la souche 29-13 de *T. brucei* (Wirtz et al., 1999) et ont été cultivées dans le milieu de culture SDM79 complété avec de l'hémine (1,5%) et du sérum de veau foetal (10%) (Brun and Schonenberger, 1979).

L'expression de l'ARN double brin est contrôlé par deux promoteurs T7 inductibles à la tétracycline dans un vecteur pZJM intégré dans le site des ADN ribosomiques des cellules 2913 qui expriment l'ARN polymérase T7 et le répresseur tétracycline (Wirtz and Clayton, 1995) (Wirtz et al., 1999). L'addition de tétracycline (1µg/ml) au milieu de culture induit l'expression des brins sens et anti-sens d'un fragment du gène d'intérêt pour former de l'ARN double brin qui va entraîner la dégradation des ARNm de séquence homologue, conduisant *in fine* à l'inhibition de la synthèse de la protéine cible. Cette méthode permet de suivre la diminution de la quantité d'une protéine cible dans le temps et son impact au niveau cellulaire (Bastin et al., 2000). Les lignées cellulaires ont été produites par intégration de fragments PCR obtenus par amplification sur différents plasmides après nucléofection ou dérivées de transfection de plasmides.

Les cellules ont été cultivées dans un milieu approprié avec de la puromycine à une concentration de 1 µg/mL et/ou de la blasticidine à une concentration de 10µg/mL. Les lignées cellulaires ont été caractérisées par l'observation directe des signaux fluorescents. La croissance des cellules a été contrôlée quotidiennement avec le compteur cellulaire Muse (Merck Milipore, Paris). Les cellules ont été diluées tous les 2 ou 3 jours pour les maintenir dans la phase exponentielle de croissance.

Lignées cellulaires	Plasmide / produit de PCR	Marquage
<i>KIN2A2B^{RNAi}</i>	p2675mNGIFT81 (Bertiaux et al., 2018a)	<i>mNG::IFT81</i>
<i>IFT140^{RNAi}</i>	p2675 / p2845	<i>mNG::IFT140 / Tdt::IFT81</i>
<i>IFT140^{RNAi}</i>	p2675 / p2845	<i>mNG::IFT140 / Tdt::DHC2.1</i>
<i>IFT140^{RNAi}</i>	p2675 / p2845	<i>mNG::DHC2.1 / Tdt::IFT81</i>
<i>IFT88^{RNAi}</i>	p2675 / p2845	<i>mNG::IFT140 / Tdt::IFT81</i>
<i>IFT140^{RNAi}</i>	pPotV6 (Dean et al., 2015)	<i>IFT122::mNG</i>
<i>IFT140^{RNAi}</i>	pPotV7	<i>mNG::IFT139</i>

Marquage endogène de la protéine IFT140 par la mNeonGreen



Marquage endogène de IFT81 ou DHC2.1 avec la Tandem Tomato

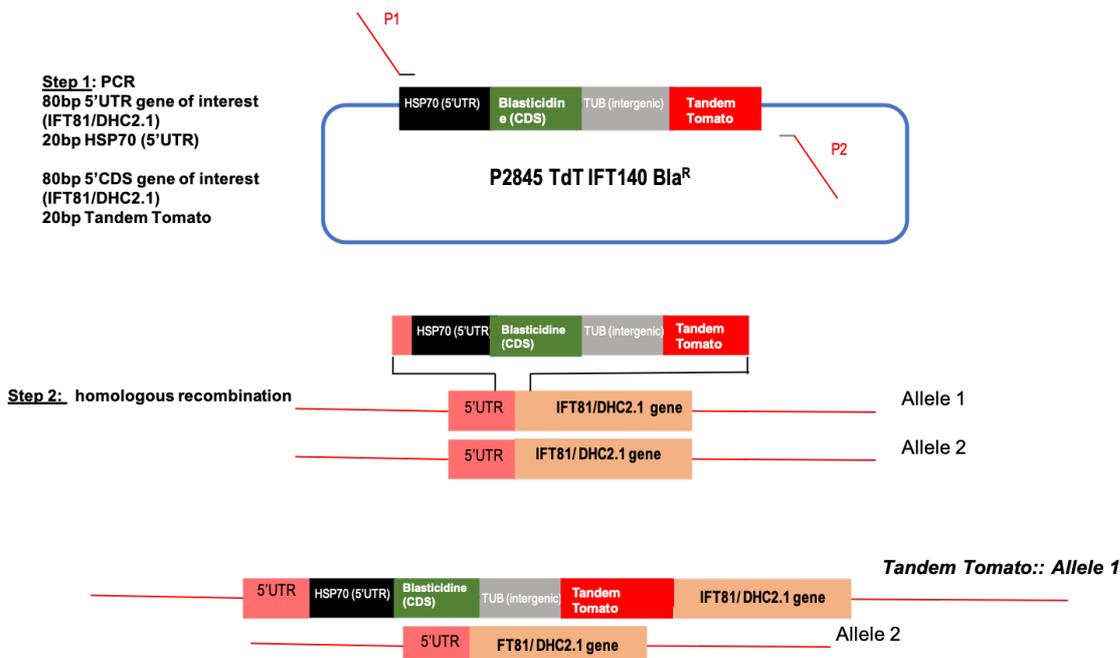
**Méthode 1: Construction des souches $IFT140^{RNAi}mNG::IFT140 Tdt::IFT81$ et $IFT140^{RNAi}mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1$**

Schéma de principe des marquages endogènes permettant l'expression de protéines d'intérêt par des protéines fluorescentes (Dean et al., 2015). Pour exprimer des protéines de fusion fluorescentes, une construction d'ADN au niveau du gène cible est intégrée par recombinaison homologue. On utilisera pour l'amplification du fragment à transférer des oligonucléotides longs (100 bp) dont 20 bp sont spécifiques de la matrice ADN utilisée, de façon à amplifier un fragment PCR contenant le gène encodant la protéine fluorescente et la cassette de résistance à l'antibiotique. Afin de pouvoir intégrer ce fragment à la protéine d'intérêt, il est nécessaire d'ajouter une extension de 80 bp du gène de la protéine d'intérêt. En fonction du marquage en N-ter ou C-ter un deuxième oligonucléotide s'appariera avec la fin de la séquence 5'UTR ou au début de la séquence 3'UTR. Le parasite *T. brucei* par recombinaison homologue intégrera le fragment PCR avec les extensions spécifiques par une double recombinaison, ajoutant à un des allèles sauvages du gène, un allèle fluorescent avec la cassette de résistance à un antibiotique nécessaire pour la sélection. (Figure Thierry Blisnick).

II. Microscopie photonique

Les échantillons ont été montés entre lame de verre et lamelle (lamelle #1.5, volume de cellules :2,7µl prélevé directement dans le milieu de culture). Pour l'acquisition des vidéos, nous avons utilisé un microscope confocal à disque rotatif (*spinning disk* UltraView VOX; PerkinElmer) équipé d'un objectif à immersion 100 × / 1,4 NA à huile (Carl Zeiss). Le microscope est équipé d'un miroir dichroïque qui envoie la lumière émise sur deux caméras EMCCD (ImageEM C9100; Hamamatsu Photonics) séparément. Ce microscope permet de travailler sur un seul canal ou sur deux canaux en même temps. Les vidéos ont été acquises à l'aide du logiciel Volocity fonctionnant en mode streaming. Les échantillons ont été conservés à 27°C en utilisant une chambre à température contrôlée situé sur le porte-lame. Des séquences d'une durée de 30 secondes ont été acquises avec un temps d'exposition de 100 ms par image contrôlé par le logiciel Volocity.

Les kymographes ont été extraits et analysés avec le logiciel Icy (de Chaumont et al., 2012) à l'aide du plugin Kymograph Tracker 2 (Buisson et al., 2013). Les représentations graphiques ont été fait à l'aide du logiciel Kaleidagraph V4.5.2.

III. Microscopie électronique FIB-SEM

Les échantillons (trypanosomes issus de culture ou cardia de mouches tsé-tsé infectées) ont été fixés directement avec 2,5% de glutaraldéhyde (Sigma-Aldrich) dans un tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4. Ils ont été lavés trois fois avec du tampon cacodylate 0,1 M (5 min chacun) et post-fixés avec 1% d'osmium (EMS) et 1,5% de ferrocyanure de potassium (Sigma-Aldrich) dans un tampon cacodylate 0,1 M pendant 1 h. Les échantillons ont été traités pendant 30 min avec 1% d'acide tannique (Sigma-Aldrich) puis 1 h avec 1% de tétroxyde d'osmium (EMS), rincés à l'eau et déshydratés dans une série de bains d'éthanol (Sigma-Aldrich) de 25%, 50%, 75%, 90% et 100% (15 min chacun). Les cellules ont été incorporées dans de la résine époxy (EMS) après 48 h à 60 °C de polymérisation. Les échantillons incorporés ont été montés sur des plots en aluminium. Les blocs ont été taillés avec des couteaux en verre de telle manière que l'exposition des faces verticales permettait l'abrasion latérale par FIB. L'ensemble des données tomographiques ont été obtenues à l'aide d'un microscope électronique à balayage à émission de champ (FESEM) Zeiss Auriga CrossBeam (ZEISS) et les piles d'images ont été acquises à l'aide du logiciel ATLAS 3D (ZEISS). Pour l'abrasion avec le faisceau d'ions gallium focalisé, les conditions étaient les suivantes : 0,5–1 nA de courant conduisant à l'élimination d'une couche de 10 nm à la fois de la résine époxy. Les images de microscopie électronique à balayage ont été faites avec une ouverture de 60 µm à 1,5 ou 2 kV avec un détecteur d'électron rétrodiffusés (EsB). La taille du voxel était de 10 nm en x / y et 10 nm en z. Le contraste des images a été inversé en fond clair conventionnel. Les trains IFT ont été segmentés manuellement. Ceux-ci ont été définis comme des structures denses aux électrons prises en sandwich entre l'axonème et la membrane du flagelle et présentes sur un minimum de trois images consécutives (30 nm). Les densités associées aux distorsions de la membrane ont été exclues. Les trains ont été définis comme des entités différentes lorsqu'ils étaient séparés par un minimum de trois images (30 nm).

IV. Analyse des données de microscopie 3D

L'alignement des séries d'images a été effectué avec le logiciel open source ImageJ (Schneider et al., 2012) et le logiciel Amira (v6.0.1; FEI; Thermo Fisher Scientific) a été utilisé pour la visualisation. La segmentation et les reconstructions 3D ont été effectuées de manière semi-automatique à l'aide du logiciel Amira et ont été corrigées manuellement.

Sylvain Trépout a ensuite analysé toutes les données. Les segmentations des trains IFT et des axonèmes ont été séparées en fonction de leurs couleurs de segmentation, puis transformées en « squelettes » dans ImageJ (Schneider et al., 2012) à l'aide du plugin Skeletonize 3D (Arganda-Carreras et al., 2010). Le nombre de voxels composant les squelettes générés a été calculé dans ImageJ à l'aide du plugin Object Counter 3D (Bolte and Cordelieres, 2006). La longueur des structures biologiques analysées (flagelles et trains IFT) a été calculée comme le nombre de voxels constituant la structure « squelettisée » multiplié par la taille du voxel.

DISCUSSION

Les trains IFT sont de grands complexes macromoléculaires dont l'organisation commence à être connue, au moins chez *Chlamydomonas* (Jordan et al., 2018). Les trains IFT sont composés des moteurs moléculaires et des protéines IFT appartenant aux complexes A et B. Curieusement, bien que les moteurs moléculaires et les protéines IFT soient présentes en quantités significatives dans le cytoplasme, personne n'y a jamais observé ni transport, ni trains. Ce qui amène la question suivante : comment les trains sont-ils formés à partir des complexes A et B et quelle est la contribution des moteurs moléculaires ? Serait-ce seulement possible grâce à l'environnement particulier de la base du flagelle ? Le simple fait qu'il y ait la proximité de la membrane flagellaire et des microtubules pourrait engendrer une concentration élevée de protéines IFT, ce qui pourrait favoriser la formation des trains. N'oublions pas non plus que la zone de transition est un environnement particulier (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017) qui pourrait être favorable à la formation des trains. Dans cette discussion, je vais passer en revue la formation des trains IFT, leur entrée dans le flagelle, leur trajet dans le flagelle et je terminerai par quelques perspectives portant sur le trajet rétrograde et le recyclage.

Nous avons choisi le trypanosome comme modèle d'étude pour ses nombreuses qualités et plus particulièrement pour deux propriétés qui lui sont propres. Premièrement, au contraire de nombreux autres organismes où les flagelles matures se dépolymérisent dès qu'on interfère avec l'IFT (Kozminski et al., 1995), l'axonème du trypanosome est très stable et repose sur l'IFT pour sa construction mais pas pour le maintien de sa longueur (Fort et al., 2016). Même si l'IFT reste actif après l'assemblage (Bertiaux et al., 2018b), il n'est essentiel que pour maintenir la localisation de certaines protéines flagellaires alors que celles entrant dans la composition structurale de l'axonème ne sont pas visiblement affectées (Fort et al., 2016). Deuxièmement, les trypanosomes se prêtent à la génétique inverse. Il est possible d'inhiber l'expression de protéine cible comme les composants des trains IFT par ARNi inductible. Le temps de demi-vie des protéines IFT étant d'environ 3/4 du cycle cellulaire (Tinti et al., 2019), on peut donc observer l'impact de leur disparition au cours du temps et ce même pendant que la construction du nouveau flagelle est inhibée. Grâce à cet outil de biologie moléculaire, nous avons pu étudier la contribution de plusieurs protéines IFT dans l'assemblage des trains IFT.

1) Formation des trains IFT

Dans la littérature, il est prouvé que les trains antérogrades sont véhiculés par la kinésine (Figure_Discussion 1) et que le complexe IFT-B est essentiel au transport antérograde (Webb et al., 2020). L'IFT-A et la dynéine sont surtout définis comme associés au transport rétrograde. La dynéine 2 étant active dans le transport rétrograde, elle joue son rôle de moteur moléculaire en recyclant les trains IFT du bout distal à la base des flagelles (Pazour et al., 1998) (Porter et al., 1999) (Signor et al., 1999a) (Blisnick et al., 2014). Toutefois, l'existence de mutants sévères dans certaines protéines du complexe A suggère un rôle essentiel à la formation des cils et flagelles et donc peut-être dans la formation des trains IFT (Picariello et al., 2019) (Zhu et al., 2017).

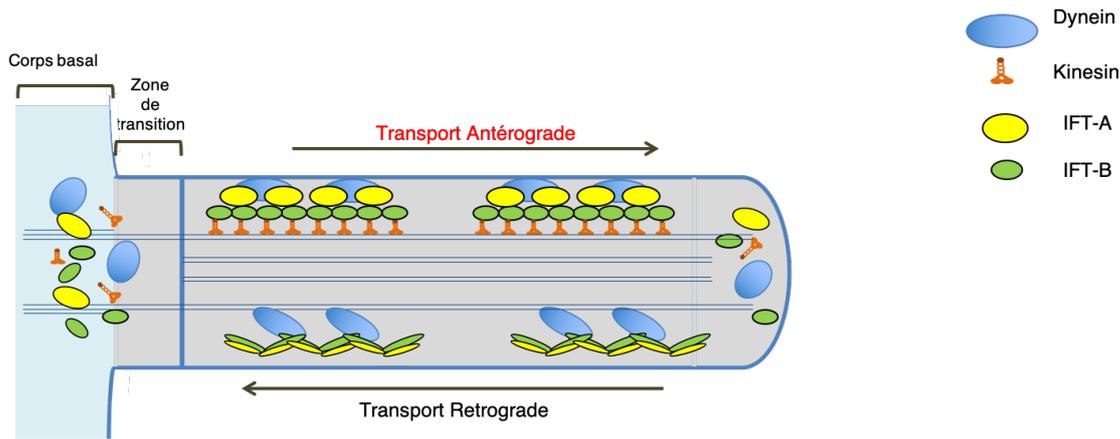


Figure Discussion 1 : Schéma de principe de l'IFT

Les trains antérogrades sont véhiculés de la base au bout distal du flagelle par la kinésine II et les trains rétrogrades sont véhiculés dans le sens inverse par la dynéine 2.

Nous avons montré en couplant des protéines fluorescentes à certaines protéines IFT et en suivant leur trafic chez des cellules vivantes que les IFT-A, IFT-B et la dynéine 2 voyagent toujours ensemble. La kinésine II n'a pas été étudiée car il est difficile de la marquer avec des protéines fluorescentes (Morga, Lemos, et al. non publié). Il y a deux types de moteurs kinésines : KIN2A et KIN2B, qui sont prédites être homodimériques. Même si ces deux kinésines semblent redondantes (Bertiaux et al., 2018b), il n'est pas possible d'exclure qu'elles véhiculent des populations différentes de trains. Johanna Buisson avait vu deux populations de trains antérogrades (rapides et lents) en suivant le trafic antérograde de la GFP::IFT52. Il faut toutefois préciser que ces premières expériences avaient été réalisées après surexpression de la protéine de fusion, avec le risque potentiel d'artefacts en cas de déséquilibre du complexe B (Buisson et al., 2013). Des trains IFT pourraient être véhiculés par KIN2A ou KIN2B seules, ou peut-être sous forme d'hétérodimère. Rappelons ici que chez *C. elegans*, 2 kinésines ont été mises en évidence dans l'IFT : une kinésine hétérotrimérique et une homodimérique, qui interagissent au moins dans la partie médiane des cils (Ou et al., 2005). Récemment, le couplage d'une des kinésines avec la mNeonGreen a enfin été réussi (Alves et al, non publié) et ouvre la possibilité de clarifier la situation.

Dans nos travaux, nous avons étudié plusieurs hypothèses pour comprendre la construction des trains IFT. La plus simple propose que les protéines IFT-B sont nécessaires et suffisantes pour assembler des trains. Dans cette hypothèse, la kinésine joue uniquement son rôle de moteur alors que les IFT-A et la dynéine seraient des cargos de ces mêmes trains. Leur rôle serait uniquement d'assurer le recyclage des composants de l'IFT-B par le transport rétrograde.

Lorsque nous avons utilisé la souche *IFT88^{RNAi}*, nous avons pu observer que lorsque l'expression de l'IFT88 est inhibée, il n'y a pratiquement plus de mouvements ni d'IFT140, ni d'IFT81, suggérant qu'il n'y aurait plus de trains antérogrades dans le flagelle. Les quelques trains observés après 48h d'induction par ARNi contiennent presque toujours l'association entre IFT140 (représentant d'IFT-A) et IFT81 (représentant d'IFT-B) (98% des trains présentent une colocalisation). Ceci démontre que l'inhibition de l'IFT-B entrave la formation des trains et par conséquent que l'IFT-B est essentiel à leur formation. En microscopie électronique en 3D, nous avons

constaté que les densités situées entre les microtubules et la membrane flagellaire sont moins nombreuses et plus courtes que dans la souche sauvage. Lorsqu'il y a moins d'IFT88, il y a moins de complexe B disponible et c'est pourquoi les trains sont plus petits. Ce résultat conforte la première hypothèse, confirme la littérature et dans le cas du trypanosome ajoute une preuve supplémentaire que les structures denses aux électrons correspondent bien aux trains.

Toutefois, il est important de souligner le fait qu'il y a plus de trains observés en FIB-SEM par rapport aux nombres d'événements de transports observés en vidéo-microscopie photonique. Similairement, Cécile Fort observait 60% des coupes de flagelle avec un train IFT dans la souche *IFT88^{RNAi}* avant induction, et quand même 30% dans la souche induite pendant 48h (Fort et al., 2016). Cette différence peut s'expliquer par plusieurs raisons. Tout d'abord, la microscopie électronique est plus résolutive. Comme les trains deviennent de plus en plus petits au cours de l'induction de l'ARNi contre IFT88, il est possible qu'ils ne contiennent plus assez de signal fluorescent pour être détectés. Rappelons qu'un seul des deux allèles est marqué par la mNeon Green ou la Tandem Tomato. Si les trains n'ont plus qu'une copie du complexe étudié, nous ne pouvons détecter que la moitié d'entre eux, et s'ils en contiennent deux, 25% des trains ne seraient pas marqués. Ensuite, certaines densités pourraient être des trains stationnaires comme observé chez *Chlamydomonas* (Stepanek and Pigino, 2016). Ils pourraient correspondre aux lignes fluorescentes verticales observées sur les kymographes. Enfin, nous ne pouvons pas exclure le fait que les densités observées en microscopie électronique puissent être composées d'autres constituants que l'IFT-A ou l'IFT-B. Les études en protéomique ont montré que le flagelle du trypanosome contient plusieurs autres kinésines (Broadhead et al., 2006) (Oberholzer et al., 2011) (Subota et al., 2014) dont la fonction est peu connue. Elles pourraient donc déplacer d'autres cargos.

L'IFT-B est essentiel mais est-il suffisant pour la formation des trains ? Dans la souche *IFT88^{RNAi}*, nous avons montré qu'après 48h d'induction, la mNG::IFT140 est toujours dans le flagelle alors que l'IFT-B est inhibé. La mNG::IFT140 ne trafique pas, ce qui va à l'encontre d'un mouvement d'IFT-A en absence d'IFT-B. Chez le xénope, la mutation d'une protéine de la zone de transition (JBTS17) entraîne la dissociation d'une partie du complexe A (celles constituant le cœur) qui voyage toujours dans le sens antérograde mais sans au moins une protéine du B (IFT38) et sans les autres IFT-A qui sont dispersées dans le cytoplasme (Toriyama et al., 2016).

Les protéines IFT-A contribuent-elles à la formation des trains IFT ? Absalon et al (2008) ont démontré que l'extinction d'IFT122, d'IFT140 ou d'IFT144 interfère avec la formation du nouveau flagelle, résultant en la construction de petits flagelles boursoufflés remplis d'IFT-B. Au contraire, le phénotype est discret dans le cas de l'extinction d'IFT121 où seulement quelques cellules présentent ce phénotype. Les flagelles sont normaux chez *IFT139^{RNAi}* (Blisnick et al. non publié) et l'inactivation d'IFT43 n'a pas été faite.

Ici, nous avons étudié le comportement de protéines du cœur et de la périphérie du complexe A lorsque le niveau d'expression de l'IFT140 est inhibé par ARNi. Les signaux des mNG::IFT122 et mNG::IFT139 dans le flagelle diminuent et le nombre de trains positifs se réduit en parallèle à la réduction du nombre de trains marqués par mNG::IFT140. Nos résultats montrent que l'IFT122 et l'IFT139 ont besoin de l'IFT140

pour trafiquer. Bien que nous n'ayons pas la preuve directe que le complexe A ne se fait plus, il est raisonnable d'y penser au vu de nos résultats et des conclusions apportées dans les autres systèmes (Behal et al., 2012) (Zhu et al., 2017). Chez le trypanosome, c'est la première étude qui montre que lorsqu'une IFT du complexe A est affectée, cela impacte d'autres protéines du complexe A.

Si on suit la première hypothèse qui propose que le complexe IFT-B serait nécessaire et suffisant pour la construction, il serait possible de retirer le complexe A et les trains IFT antérogrades continueraient d'être assemblés, au moins aux temps précoces d'ARNi. Ces trains ne seraient toutefois pas recyclés vu qu'il manquerait le complexe A et la dynéine, et les composants présents s'accumuleraient progressivement au bout distal. Or, après 24h d'induction, nous avons observé peu d'accumulations d'IFT-B au bout distal des flagelles matures de la souche *IFT140^{RNAi}* (seulement 20% des flagelles). Les trains en mouvement restaient positifs pour l'IFT-A et pour l'IFT-B, ce qui n'est pas en accord avec l'hypothèse A où l'on s'attendrait à voir de l'IFT-B sans de l'IFT-A. Nous avons vu par microscopie électronique des trains qui sont de plus en plus petits en fonction des temps d'induction. Le profil est donc similaire à celui de la souche *IFT88^{RNAi}*, même si la longueur des trains apparaît un peu moins affectée. Le fait que l'on détecte toujours l'IFT-A et l'IFT-B sur la plupart des trains à tous les temps d'induction dans les cellules *IFT140^{RNAi}* confirme les résultats obtenus par Picariello dans le mutant IFT140 chez *Chlamydomonas* auquel il manque une partie du domaine WD40 (Picariello et al., 2019). Dans ce mutant, la quantité de protéines IFT-A détectées dans les flagelles est inférieure à la normale, ce qui peut être comparé à notre système aux temps intermédiaires de l'ARNi.

Dans les temps avancés d'induction (48h), il n'y a quasiment plus de mouvement visible ce qui est en accord avec les résultats de Picariello cette fois au moyen du mutant d'IFT140 prédit pour être nul, dans lequel les cellules ne font plus de flagelle. Sur base de ces résultats, nous proposons un nouveau modèle dans lequel le complexe IFT-A est indispensable à l'assemblage des trains puisqu'il n'y a pas de trains antérogrades sans IFT-A (Figure_Discussion 4).

Ce modèle ne correspond pas aux conclusions faites par Jordan et ses collègues qui expliquent que les trains peuvent se faire sans IFT-A (Jordan et al., 2018). Cependant il est important de prendre en compte certains aspects. Dans le mutant *ift139-2* utilisé dans cette étude, il reste des protéines IFT-A (10 à 25% selon le type de protéine) et les trains antérogrades sont plus petits (longueur =196 nm au lieu de 312 nm, soit une réduction de 40%) et n'ont pas une morphologie normale (Figure_Discussion 2). Les trains sont un peu tordus et d'aspect irrégulier. Dans les cellules contrôles, la taille des trains varie entre 100 et 700nm (avec une déviation standard de 130). La variation est plus limitée chez le mutant *ift139-2* et bien que la valeur des trains les plus petits et les plus grands ne soient pas mentionnée, on peut suspecter que les plus grands trains sont absents (Jordan et al., 2018).

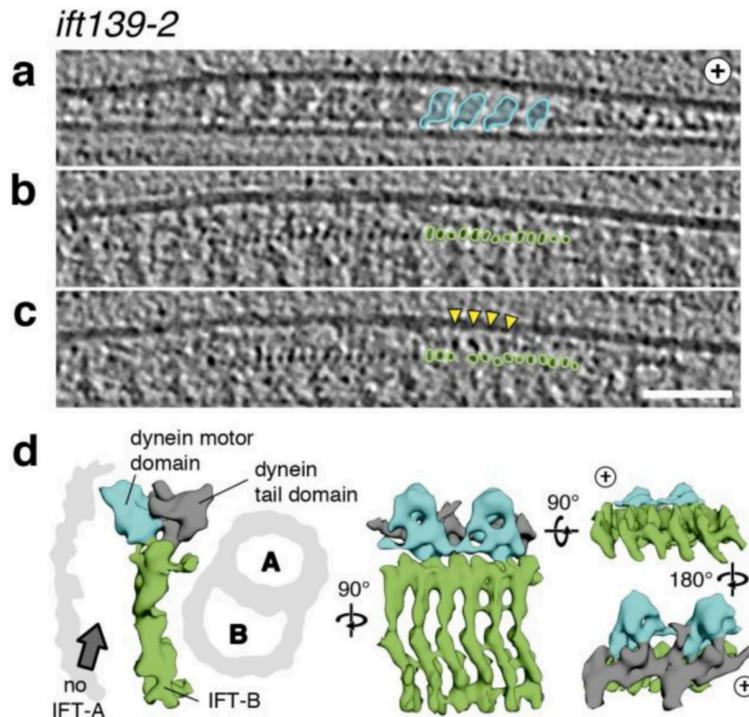


Figure Discussion 2 : Présence de trains aberrants chez le mutant *ift139-2* observé en cryo-tomographie électronique

Train IFT issu d'une cellule mutante *ift139-2* de *Chlamydomonas*. La dynéine est représentée en bleu, l'IFT-A en jaune (densités résiduelles) et l'IFT-B en vert (Jordan et al., 2018). La structure du train est moins bien organisée que dans les cellules contrôles (voir Figure 32 de l'introduction).

Il se peut que la méthode utilisée par Jordan induise un biais dans l'interprétation. En effet, elle repose sur le « *sub-tomogram averaging* » qui consiste à moyenniser un ensemble de données. Il est plausible que les densités irrégulières correspondant au complexe A (Figure 2) ne soient pas prises en compte. Dans la publication, il est écrit qu'il y a des trains constitués seulement de répétitions correspondant au complexe IFT-B, mais leur fréquence n'est pas mentionnée (une seule image est présentée dans le papier).

Jordan et ses collègues proposent que l'IFTA devrait être présent en quantité sub-stoechiométrique pour que les trains se forment. La proportion de chaque sous-unité a sans doute une importance, mais il apparaît qu'une quantité minimale d'IFT-A est nécessaire pour construire les trains antérogrades. Cet argument serait en accord avec le fait que nous ne voyons pas de trains avec de l'IFT-B sans de l'IFT-A aux conditions intermédiaires ou avancées de l'ARNi contre IFT140, un phénomène également observé chez le mutant partiel d'IFT140 chez *Chlamydomonas* (Picariello et al., 2019).

Les autres mutants de gènes de l'IFT-A de *Chlamydomonas* étudiés par Zhu et ses collègues montrent plusieurs situations où les cellules ne font plus de flagelles du tout (*ift121* et *ift122*). Le mutant *ift144* ne fait presque plus de flagelle (21% de cellules ont un flagelle) alors que leur mutant *ift140* possède encore des flagelles mais de taille réduite. Ce mutant a le potentiel pour exprimer une protéine tronquée (privée de sa partie C-terminale), et donc on pourrait se retrouver dans une situation intermédiaire équivalente à la délétion d'une autre partie de la protéine IFT140 étudiée par Picariello (Picariello et al., 2019). Les mutants *ift139* et *ift43* semblent moins affectés, ce qui peut être en accord avec leur localisation périphérique, qui autoriserait la formation de

complexes A partiels (Hirano et al., 2017). Chez *Chlamydomonas*, Zhu et ses collègues montrent que sans IFT43, il y a beaucoup moins des autres protéines A comme si leur turnover était accéléré quand ces protéines ne sont pas sous forme de complexe (Zhu et al., 2017).

Si on considère que l'IFT-A est essentiel pour la construction des trains antérogrades, pourquoi est-ce qu'il y a tant de situations (mutants, ARNi) où une accumulation de matériel IFT au bout distal est observée ? Ceci implique que des trains ont dû être construits et ont réussi à voyager jusqu'à l'extrémité du flagelle. Dans la littérature l'explication vient du fait que la dynéine ne rentre plus dans les flagelles (Blisnick et al., 2014). Comment cette situation pourrait-elle être compatible avec notre modèle qui dit que l'IFT-A est essentiel à la construction des trains ?

Nous proposons que les situations intermédiaires seraient dues à la réduction spectaculaire de la taille des trains. En effet, les données de cryo-microscopie suggèrent qu'il faut au moins 4 copies du complexe B et 2 copies du complexe A pour charger le moteur dynéine inactif (Jordan et al. 2018). Si un train était constitué de seulement 2 copies d'IFT-B et une copie d'IFT-A, il ne pourrait peut-être pas charger le moteur dynéine.

Dans leur publication, Jordan et ses collègues ont montré que dans les trains antérogrades, la dynéine était directement liée à l'IFT-B et avait une conformation spécifique qui la rend inactive. Dans leur étude, une mutation de la dynéine DHC1b a été faite et montre que les trains IFT peuvent être construits sans la dynéine. Jordan et ses collègues concluent que la dynéine est un cargo dans le transport antérograde et que les trains peuvent être formés sans dynéine (Figure_Discussion 3). On notera que chez la souris, une mutation dans le gène encodant la chaîne lourde de dynéine entraîne la formation de cils très courts boursoufflés qui contiennent des structures ressemblant fortement à des trains antérogrades intacts (Liem et al., 2012). Ceci laisse à penser que les trains peuvent se former en absence de dynéine. Chez le trypanosome, nous avons la possibilité d'éteindre l'expression d'éléments composant le moteur dynéine IFT (Blisnick et al. 2014) mais faute de temps, nous n'avons pas pu évaluer son importance pour la formation des trains. Cette expérience sera tentée dans le futur.

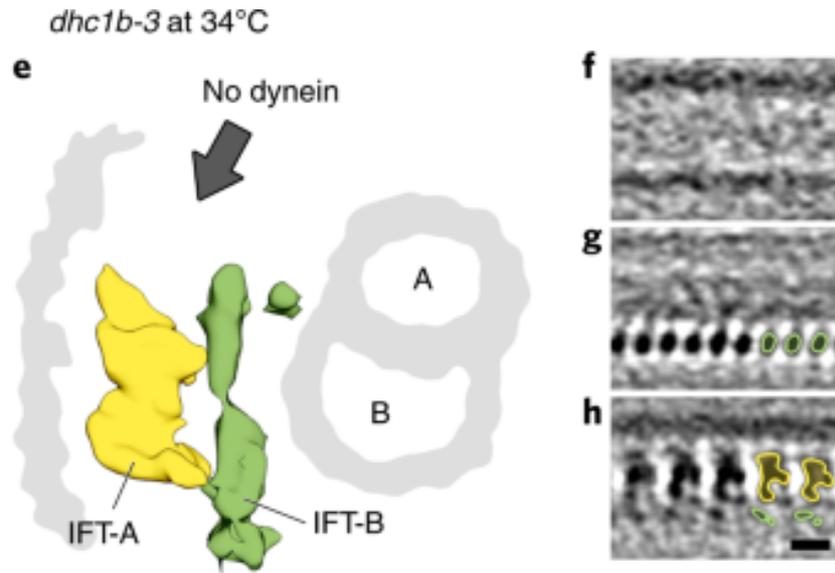


Figure Discussion 3 : Mutant dynéine DHC1b chez Chlamydomonas

e, Modélisation de la structure des trains antérogrades chez le mutant dynéine *dhc1b-3* de *Chlamydomonas*. Les trains de ce mutant ne contiennent pas de répétitions de la structure à 18 nm, identifiant cette densité comme le moteur rétrograde de la dynéine. Les structures répétitives correspondant à l'IFT-A (en jaune) et l'IFT-B (en vert) sont bien présentes normalement. Barre d'échelle, 10 nm. (Jordan et al., 2018)

Nous proposons un modèle pour expliquer les résultats obtenus suite à l'extinction de l'expression d'IFT140, un composant du cœur du complexe IFT-A (Figure Discussion 4). L'IFT-A serait indispensable pour permettre la polymérisation du complexe B et former les trains. Suite à la diminution de la quantité d'IFT140, les trains sont toujours assemblés mais sont plus petits et peuvent néanmoins transporter la dynéine (2^{ème} phase sur le dessin). Toutefois, lorsque la dose d'IFT140 devient trop faible, seuls des tout petits trains par exemple composés de 2 copies du complexe B et d'une copie du complexe A peuvent être construits et ceux-ci seraient trop petits pour pouvoir charger la dynéine (3^{ème} ligne, figure 4). Ceci est soutenu par l'observation de mouvement antérograde de la mNG::IFT140 sans la TdT::DHC2.1 dans le flagelle de cellules de la souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 TdT::DHC2.1* induite. Des trains sont donc composés d'IFT-A mais pas de dynéine. Ce résultat expliquerait l'importance que l'IFT-A jouerait dans le chargement de la dynéine des trains IFT antérogrades. Dans ces conditions, les trains peuvent atteindre la fin du flagelle mais ne sont pas recyclés suite à l'absence de dynéine. Ceci pourrait expliquer les phénotypes de défaut rétrograde observés dans les nombreux mutants ou expérience d'ARNi qui réduisent le taux de complexe A dans les flagelles (Absalon et al., 2008a; Iomini et al., 2001; Perrault et al., 2012). Lorsque la quantité d'IFT140 tombe à un niveau très bas, les trains IFT deviennent rares et le transport s'arrête, comme lors de la déplétion de membres du complexe B (Fig. 4, dernière ligne).

Nos résultats sont séduisants mais restent à confirmer. Dans la souche *IFT140^{RNAi} mNG::DHC2.1 Tdt::IFT81*, la mNG::DHC2.1 et la Tdt::IFT81 colocalisent dans les flagelles en condition ARNi après 36h et 48h d'induction. Nos résultats sont donc contradictoires et nous ne pouvons pas conclure pour le moment.

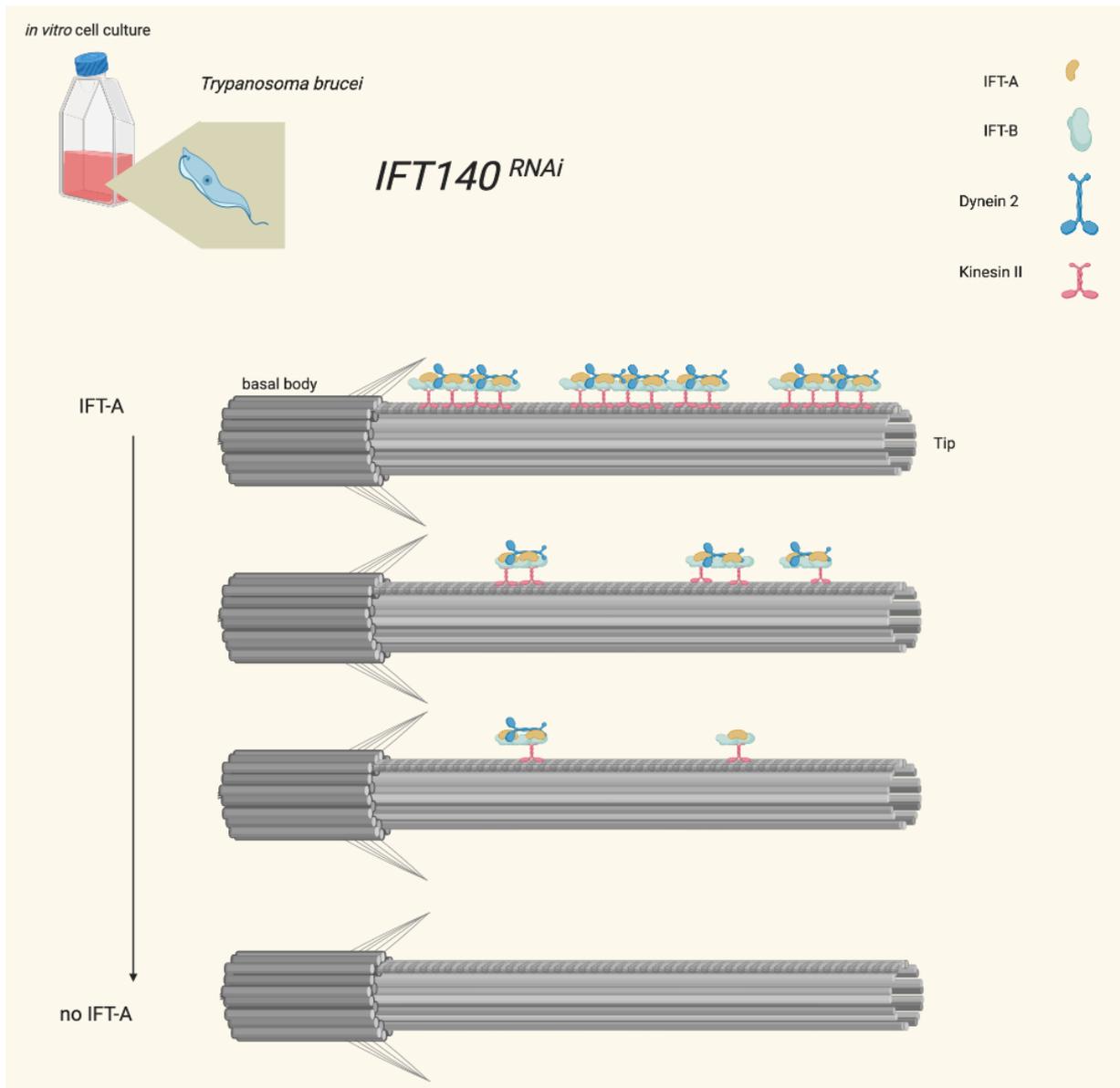
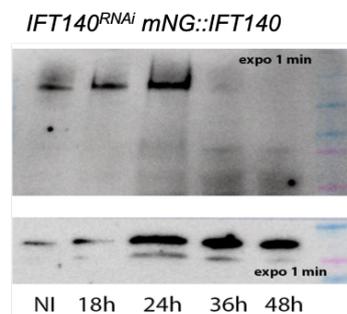


Figure Discussion 4: Model présentant le rôle essentiel de l'IFT-A dans l'IFT et dans la construction des trains IFT

Deux explications sont possibles : (1) L'ARNi sur IFT140 pourrait être moins efficace, ce qui est suggéré par le fait qu'il reste des trains après 48 heures d'induction. Toutefois, cette souche ne contient pas la *mNG::IFT140* et nous ne pouvons donc pas directement évaluer le niveau d'extinction. Une quantification de la quantité d'IFT140 au moyen d'un anticorps contre la protéine endogène par western blot pourrait permettre d'approuver ou de réfuter cette option. (2) La sensibilité de la Tandem Tomato n'est peut-être pas suffisante vu que la détection sur le canal du rouge est un peu moins efficace que celle de la *mNeonGreen* sur le canal du vert. La souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1* a été sous-clonée pour tenter de sélectionner une lignée dans laquelle le signal de la Tandem Tomato serait plus brillant. Malheureusement, aucun sous-clone n'avait un niveau suffisant d'expression de la fusion dynéine avec la Tandem Tomato.

Notre étude a quelques limites. Nous n'avons pour le moment pas pu quantifier l'efficacité de l'ARNi sur les différentes souches *IFT140^{RNAi}* et *IFT88^{RNAi}*. Un western blot nous permettrait de quantifier la quantité d'IFT140 résiduelle en cours d'induction de l'ARNi. Nous disposons d'un anticorps contre IFT140 au laboratoire (Bonney et al., non publié). Toutefois, s'il détecte bien la protéine en immunofluorescence, sa réactivité en western n'a pas pu être démontrée. Nous avons pensé utiliser un anti-mNeonGreen pour suivre la protéine de fusion mNG::IFT140, mais le signal s'est révélé négatif en western. Enfin, une copie du tag Ty-1 avait été ajoutée à la fusion mNG::IFT140 mais curieusement, nous n'arrivons pas à la détecter au moyen de l'anticorps BB2. Pour le moment, nous ne pouvons donc pas quantifier l'expression protéique en fonction des temps d'induction. L'ARNi est certes efficace sur les souches *IFT140^{RNAi}* et *IFT88^{RNAi}*, car après 48h d'induction il y a peu/plus de trains dans le flagelle mais cette interprétation reste indirecte. L'inconvénient principal est que nous ne pouvons pas comparer l'efficacité de l'ARNi d'une souche à l'autre.

Nous avons donc pensé à une nouvelle stratégie. Le plasmide que nous avons utilisé pour amplifier le produit de PCR destiné à insérer la mNeonGreen en amont du gène *IFT140* ne contient qu'une seule copie du Ty-1 tag (Dean et al., 2015). Comme l'IFT-A est deux fois moins abondant que l'IFT-B, il est possible que nous tombions sous le seuil de détection. Nous avons un autre plasmide que nous pouvons utiliser, PpotV6 qui a la particularité de permettre l'addition de 6 copies du tag Ty-1 (Dean et al., 2015). Nous avons donc fait le choix de refaire toutes nos constructions de souches en utilisant ce plasmide. Les résultats préliminaires sont prometteurs, car nous pouvons quantifier l'expression de IFT122::mNG tagué par cette méthode avec l'anticorps BB2 par western blot (Figure_Discussion 5).



Figure_Discussion 5 : Détection de la protéine de fusion mNG::IFT140 contenant 6 copies du Ty1 tag

Western blot au moyen de l'anticorps BB2 dirigé contre le Ty1 tag inséré en 6 copies dans la protéine mNG::IFT140 dans la souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140* (expérience réalisée par Thierry Blisnick). La protéine de fusion est bien détectée à la taille attendue et disparaît après 36h d'induction de l'ARNi contre IFT140. Le contrôle de charge a été effectué avec un anti-ALBA (Subota et al., 2011).

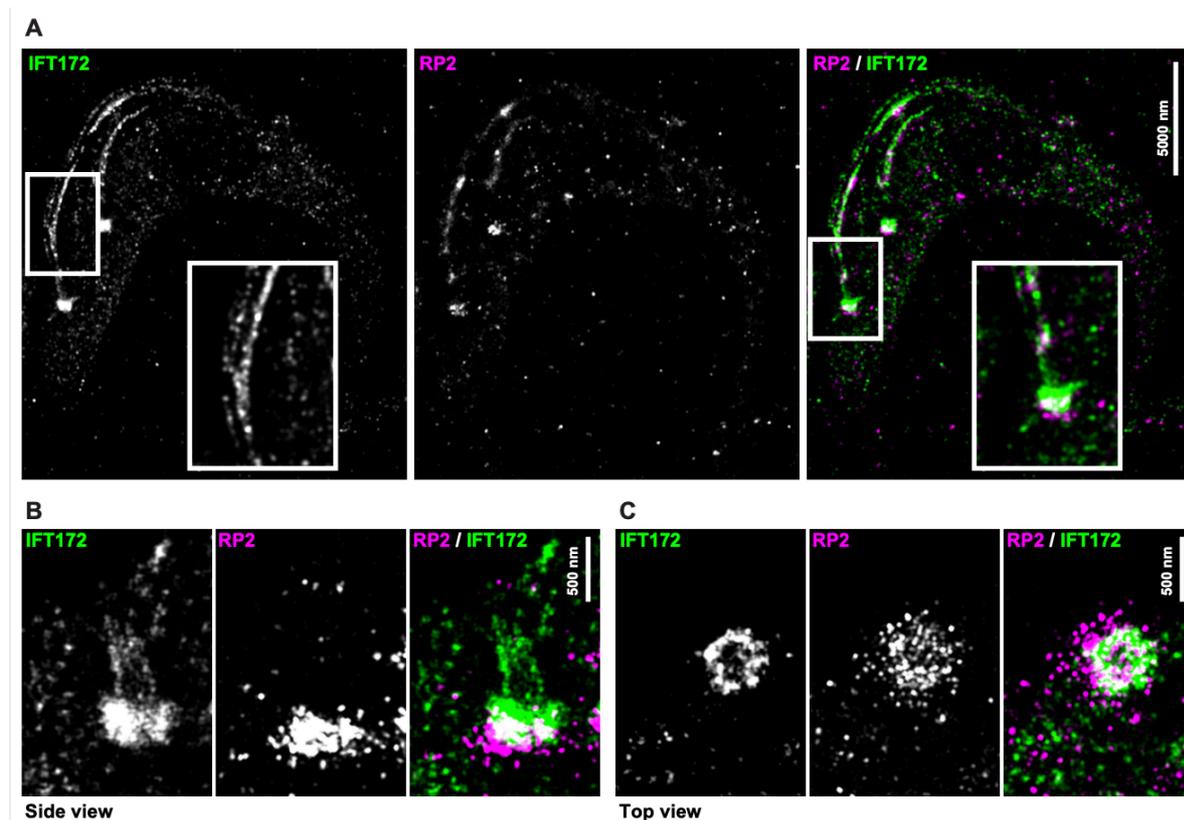
Cette stratégie a un avantage. Avec la nouvelle souche *IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1*, nous pourrions quantifier l'expression de l'IFT140 dans les cellules en cours d'induction.

Nous avons mis en évidence le fait que les complexes A et B sont essentiels à la construction des trains et que si l'un de ces composants n'est pas présent, les trains ne peuvent pas être assemblés correctement. Notre découverte majeure concerne les

rôles de l'IFT-A. L'IFT-A joue un rôle dans la construction des trains IFT et régule la longueur des trains IFT antérogrades.

2) Comment les trains entrent-ils dans le flagelle ?

Plusieurs données issues du laboratoire (Jamin Jung et al., non publié) et de la littérature (Dean et al., 2001) suggèrent que les protéines IFT sont localisées à la base de la zone de transition et que les trains émergent assemblés à la sortie de cette zone avant de trafiquer le long de l'axonème (Figure_Discussion 6).



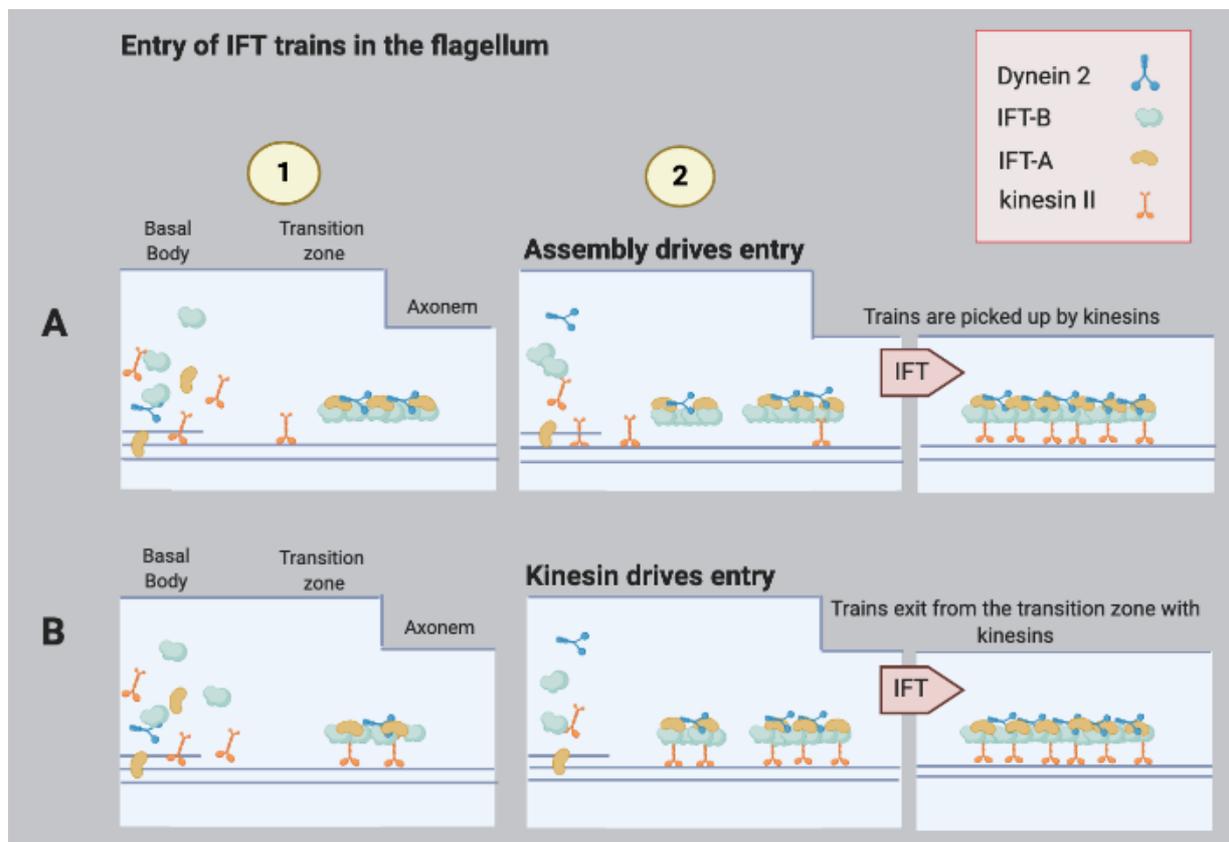
Figure_Discussion 6 : 3D-STORM 2 couleurs montre la structure et la position des protéines IFT à la base du flagelle

Afin de définir la structure et la position du pool IFT à la base du flagelle, la microscopie 3D STORM a été réalisée sur des cellules de *T. brucei* sauvages fixées. Le signal avec l'anticorps contre IFT172 est montré en vert. La RP2-Cherry a été mise en évidence en utilisant un anticorps mCherry pour localiser les fibres de transition. La figure A montre la vue d'une cellule entière avec 2 flagelles. L'encart est un zoom avant sur la région proximale du nouveau flagelle. La figure B montre une image de vue latérale représentative de la région de zone de transition indiquant que le pool IFT est en position légèrement distale par rapport aux fibres de transition marquées par RP2. La superposition en blanc montre l'existence d'un chevauchement partiel de l'IFT172 avec les fibres de transition. De plus, des signaux IFT peuvent être identifiés représentant potentiellement des trains IFT ou la construction de trains IFT se déroulant dans la zone de transition distale. La figure C montre une vue de dessus représentative de la zone de transition. Dans toutes les images analysées, IFT172 est disposé en une structure en anneau. (Au moins 10 acquisitions en 3D STORM analysés ont confirmé ce modèle de localisation) - Figure de Jamin Jung, non publiée.

La zone de transition apparaît comme une matrice qui freine la diffusion des protéines et qui pourrait ralentir les moteurs moléculaires (Prevo et al., 2015) (Mijalkovic et al.,

2017). Si les trains sont assemblés à la base de la zone de transition, comment entrent-ils dans le flagelle ?

Est-ce que ce sont les moteurs moléculaires qui régulent l'entrée des trains antérogrades ? Il y a au moins deux possibilités : (1) le moteur kinésine tire les trains en formation dans la TZ (et peut-être contribue à leur polymérisation en les faisant avancer) ou (2) c'est la polymérisation qui permet au train d'avancer (un peu comme les cheveux qui s'allongent parce qu'ils sont poussés par les nouvelles sous-unités ajoutées à la base), et lorsqu'il est formé, il est pris en charge par le moteur kinésine (Figure_Discussion 7). L'étude du rôle de l'IFT-A dans le flagelle a donc été suivi de l'étude du rôle du moteur kinésine dans le transport antérograde.



Figure_Discussion 7 : Entrée des trains IFT dans le flagelle : modèles proposés

Deux modèles A et B sont proposés. Le corps basal, la zone de transition et l'axonème sont schématisés en bleu clair. L'entrée dans le flagelle des trains IFT est représenté en deux étapes (1 et 2).

Chez *C. elegans*, la kinésine hétérotrimérique permettrait aux trains de progresser dans la zone de transition (Prevo et al., 2015). Cette hypothèse se confirme au regard de nos résultats obtenus avec la souche *KIN2A2B^{RNAi} mNG::IFT81*. Lorsqu'il n'y a pas assez de kinésine, au moins les protéines IFT-B sont bloquées à la base des flagelles (nous n'avons pas eu le temps de développer les souches pour suivre un représentant des IFT-A ou des dynéines). Toutefois, les trains qui rentrent dans le flagelle ont une taille proche de la normale. On peut donc penser que les trains s'assemblent correctement lorsqu'il y a moins de kinésine et que celle-ci serait requise pour leur entrée dans le flagelle. Des expériences en super-résolution seront nécessaires pour

identifier la position des moteurs kinésines par rapport aux protéines IFT avant assemblage des trains.

Les kinésines *KIN2A* et la *KIN2B* ont certainement un rôle fondamental dans la régulation de la fréquence des trains dans le flagelle. Il n'y a à ce jour aucune preuve qu'elles fonctionnent ensembles comme décrit chez *C. elegans* pour KINII et OSM3 (Snow et al., 2004). Étant donné que deux kinésines sont impliquées dans le transport antérograde, il est possible que leurs fonctions ou leurs activités soient différentes.

3) Où les trains voyagent-ils dans le flagelle ?

L'une des principales avancées est la mise en évidence du transport bidirectionnel sur deux voies distinctes chez les cellules vivantes en microscopie photonique et du positionnement spécifique des trains IFT sur les doublets 3-4 et 7-8 de l'axonème par microscopie électronique.

Ces résultats obtenus sur cellules en culture mais aussi *ex vivo* chez les parasites dans le cardia de la mouche tsé-tsé amènent de nouvelles questions : pourquoi des voies spécifiques sont utilisées ? Est-ce que l'IFT chez d'autres organismes ou dans d'autres types de cils utilisent des voies spécifiques ?

Ces questions sont en partie commentées dans une brève revue : *Moteurs moléculaires et microtubules : Relation libre, imposée ou sélective.*

NOUVELLE

Moteurs moléculaires et microtubules : relation libre, imposée ou sélective ?

Adeline Mallet¹⁻³, Philippe Bastin²

¹Unité de technologie et de service UBI (Ultrastructural Bioluminescence Imaging), Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

²Unité de biologie cellulaire des trypanosomes, Institut Pasteur, Inserm U1201, 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

³Sorbonne université, École doctorale complexité du vivant, ED 515, 7, quai Saint-Bernard, case 32, 75252 Paris Cedex 05, France.

philippe.bastin@pasteur.fr

adeline.mallet@pasteur.fr

> La cellule eucaryote est compartimentée et composée d'organites tels que le noyau, le réticulum endoplasmique ou encore les mitochondries. Des échanges moléculaires entre ces divers compartiments sont indispensables pour assurer le bon fonctionnement cellulaire. Comprendre comment fonctionnent ces échanges est un thème central de la biologie cellulaire. Les modes de communication à l'intérieur de la cellule sont nombreux et dépendent du type et de la fonction de la cellule concernée. Les cellules eucaryotes présentent plusieurs voies d'échanges intracellulaires, comme les réseaux d'actine et de tubuline qui servent de rails sur lesquels des moteurs moléculaires transportent des complexes protéiques ou des vésicules.

Les microtubules : des voies de transport pour les moteurs moléculaires

Dans cette Nouvelle, nous discutons des interactions entre les moteurs moléculaires et les microtubules. Les microtubules sont formés de dimères de tubulines α et β qui sont assemblés en protofilaments [1] (→). L'extrémité (+) des microtubules est très dynamique tandis que l'extrémité (-) est plus stable. Dans la cellule, les déplacements polarisés se produisent le long des microtubules grâce à l'action de moteurs moléculaires spécifiques qui permettent d'acheminer divers composants moléculaires vers la périphérie

ou le centre de la cellule. Une première famille de moteurs a été découverte en 1965 par Ian Gibbons, qui a nommé dynéines des protéines capables de se déplacer de l'extrémité (+) à l'extrémité (-) des microtubules en présence d'ATP. À l'inverse, les kinésines correspondent à une autre famille de protéines motrices, mise en évidence par Ronald Vale, et qui entraînent leur cargaison du (-) vers le (+) des microtubules.

Le transport intraflagellaire

La majorité des cellules eucaryotes présentent des extensions nommées cils ou flagelles (termes interchangeable). Dans les cils, les microtubules forment une structure cylindrique appelée axonème qui dérive d'un centre organisateur de microtubules, le corps basal. L'axonème est composé de neuf doublets de microtubules entourés d'une membrane. Entre les deux, la zone de transition filtre les échanges entre le corps cellulaire et le compartiment ciliaire (Figure 1A). Au cours de son élongation, l'incorporation de protéines a lieu à l'extrémité distale de l'organite. Le cil est dépourvu de ribosomes, impliquant que le site d'assemblage s'éloigne du site de synthèse lors de la construction. Ceci est compensé par le transport intraflagellaire (IFT, *intraflagellar transport*) qui permet l'acheminement des protéines de la base au bout distal du flagelle [2, 3]. L'IFT est le mouvement de complexes protéiques (ou trains) entre la membrane flagellaire et les doublets de microtubules. Ces trains sont déplacés par le complexe kinésine II de la base vers l'extrémité distale du

flagelle (transport antérograde) et dans le sens inverse par la dynéine cytoplasmique de type 2 (transport rétrograde) [4] (→). L'IFT est visualisé

(→) Voir la Synthèse de C. Fort et P. Bastin, *m/s* n° 11, novembre 2014, page 955

par microscopie à contraste interférentiel, comme des particules se déplaçant le long des cils. Par microscopie corrélative¹, un lien a été fait avec les structures denses aux électrons situées entre l'axonème et la membrane flagellaire observées en microscopie électronique en transmission [2]. La longueur de ces trains IFT avoisine les 250 nm, et ils se déplacent dans le sens antérograde à une vitesse de 0,5-3 $\mu\text{m/s}$ et dans le sens rétrograde à 1-5 $\mu\text{m/s}$ avec une fréquence de 1 à 3 trains par seconde. L'IFT est essentiel pour l'élongation et la maintenance des cils.

Le déplacement des trains IFT le long des microtubules soulève de nombreuses questions et en premier lieu, celle de savoir si ces trains IFT sont véhiculés de façon similaire sur les 9 doublets de microtubules. *Trypanosoma brucei* est un modèle de choix pour répondre à cette question. Ce protiste possède un flagelle composé d'un axonème de 9 doublets de microtubules (comme chez l'homme) et les trains IFT peuvent être détectés aussi bien en microscopie électronique qu'en utilisant des cellules vivantes [5]. Pour étudier le positionnement des trains IFT, une méthode de microscopie électronique en 3-D a été

¹ La microscopie corrélative combine différentes modalités d'imagerie, comme la microscopie photonique et la microscopie électronique.

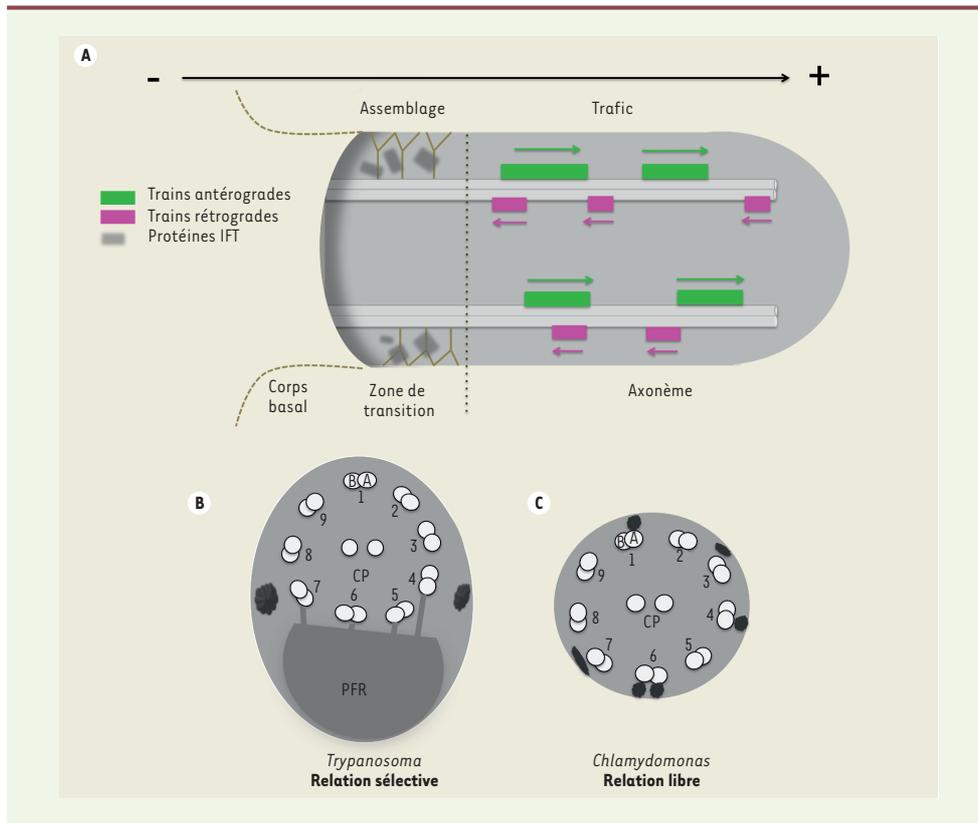


Figure 1. Le transport Intraflagellaire (IFT) et le positionnement des trains IFT. A. Le transport antérograde entraîne les trains IFT de la base au bout du flagelle où est localisée l'extrémité (+) des microtubules et le transport rétrograde permet de ramener les trains IFT à la base du flagelle où se situe l'extrémité (-) des microtubules. B-C. Les protéines IFT sont concentrées à la base du flagelle, au niveau de la zone de transition où l'assemblage des trains a probablement lieu. Représentation de coupes transversales montrant les 9 doublets de microtubules et la répartition des trains IFT (particules noires) chez *Trypanosoma brucei* (B) et chez *Chlamydomonas* (C). CP : paire centrale ; PFR : fibre paraflagellaire.

utilisée : le FIB-SEM² (*focused ion beam – scanning electron microscopy*) qui permet d'analyser des échantillons en trois dimensions à l'échelle nanométrique après inclusion en résine [6]. La reconstruction des trains IFT sur les axonèmes des trypanosomes a révélé que seulement deux voies étaient utilisées : les doublets 3/4

et 7/8. La microscopie photonique à haute résolution a révélé que ces deux voies étaient utilisées comme des rails bidirectionnels, c'est-à-dire que les trains s'y déplacent dans les sens antérograde et rétrograde [6].

Comment expliquer un tel déterminisme moléculaire et cellulaire avec des trains IFT se déplaçant sur seulement 4 des 9 voies en théorie disponibles ? Plusieurs hypothèses peuvent être proposées. La composition moléculaire des microtubules de ces doublets pourrait être dif-

férente. Les tubulines sont sujettes à un grand nombre de modifications post-traductionnelles qui ont été assimilées à un « code » tubuline [1, 7]. La polyglutamylation a lieu sur la queue C-terminale des tubulines qui se trouvent à la surface des microtubules. Cette modification a un impact sur la vitesse et l'activité des moteurs moléculaires [8]. Si un niveau de glutamylation différent était associé aux doublets 3/4-7/8, il pourrait conférer une meilleure affinité pour les moteurs IFT et impliquer une

² La sonde ionique focalisée, ou FIB (*focused ion beam*), utilise un faisceau d'ions focalisés, généralement du gallium, quand un microscope électronique à balayage classique (*scanning electron microscopy*) utilise un faisceau d'électrons focalisés.



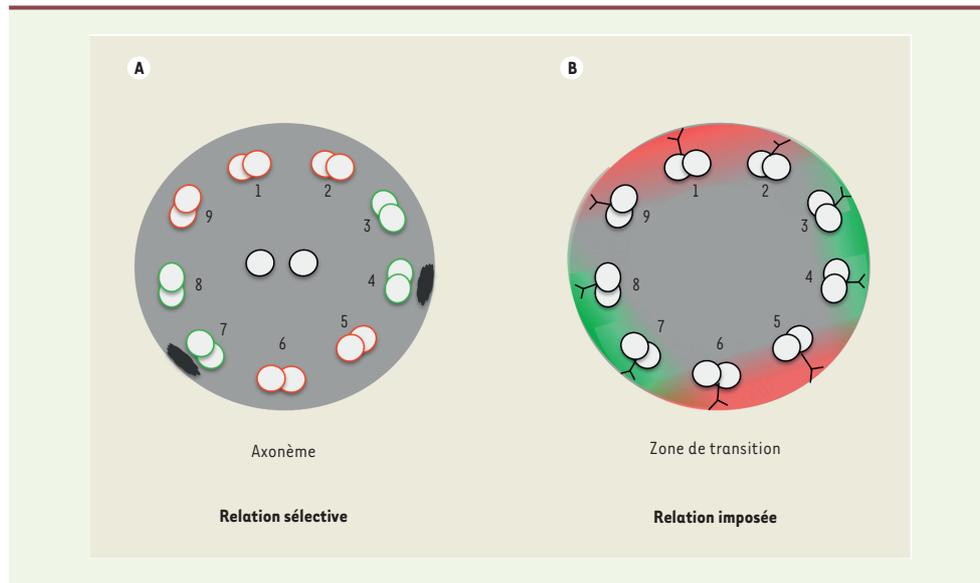


Figure 2. Deux hypothèses pour expliquer le positionnement restreint des trains IFT. **A.** Les moteurs moléculaires sélectionnent des microtubules indiqués en vert sur la base d'une information moléculaire présente sur ceux-ci. **B.** Les trains IFT sont assemblés dans la zone de transition. Si le système d'assemblage est limité aux doublets présentés en vert, les moteurs devront circuler sur ces microtubules dont la nature moléculaire peut être identique.

relation sélective avec ces microtubules (Figure 2A). Un autre cas de figure reposerait sur une relation imposée que l'on pourrait comparer à un aiguillage (Figure 2B). Les trains se forment à la base du cil dans une région appelée zone de transition. Si les trains étaient assemblés seulement sur certains doublets dans la zone de transition, leur positionnement serait imposé à ces microtubules. Cette dernière hypothèse est soutenue par la diversité structurale observée dans la zone de transition [9]. Chez *Chlamydomonas*, un organisme flagellé également étudié pour comprendre l'IFT [1, 2], la microscopie corrélative a permis de démontrer qu'au moins 7 des 9 doublets de microtubules sont utilisés par les trains IFT, suggérant une relation libre entre moteurs et microtubules (Figure 1C) [10]. Les deux seuls modèles étudiés à ce jour présentent donc un positionnement différent des trains IFT

et donc une relation différente entre moteurs moléculaires et microtubules. Ces résultats posent plusieurs questions : (1) Quels sont les mécanismes responsables de cette diversité ? (2) Quel est l'avantage de limiter ou non l'IFT à certains doublets ? (3) Quelle est la situation dans d'autres cellules ciliées ? Pour y répondre, des études approfondies seront nécessaires avec des approches permettant de détecter les trains IFT par microscopie électronique dans d'autres types cellulaires. ♦ **Molecular motors and microtubules: which type of relationship?**

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Sadoul K, Joubert C, Michallet S, et al. Déchiffrement du code tubuline - Le voile se lève sur le rôle de l'acétylation et de la détyrosination. *Med Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 1047-55.

2. Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 5519-23.
3. Craft JM, Harris JA, Hyman S, et al. Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism. *J Cell Biol* 2015 ; 208 : 223-37.
4. Fort C, Bastin P. Élongation de l'axonème et dynamique du transport intraflagellaire. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 955-61.
5. Absalon S, Blisnick T, Kohl L, et al. Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes. *Mol Biol Cell* 2008 ; 19 : 929-44.
6. Bertiaux E, Mallet A, Fort C, et al. Bidirectional intraflagellar transport is restricted to two sets of microtubule doublets in the trypanosome flagellum. *J Cell Biol* 2018 ; 17 : 4284-97.
7. Magiera MM, Singh P, Gadadhar S, Janke C. Tubulin posttranslational modifications and emerging links to human disease. *Cell* 2018 ; 173 : 1323-7.
8. Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* 2014 ; 16 : 335-44.
9. Trépout S, Tassin AM, Marco S, Bastin P. STEM tomography analysis of the trypanosome transition zone. *J Struct Biol* 2018 ; 202 : 51-60.
10. Stepanek L, Pigino G. Microtubule doublets are double-track railways for intraflagellar transport trains. *Science* 2016 ; 352 : 721-4.

Le fait que seulement 2 à 4 voies de transport sont utilisées chez le trypanosome au lieu de 8 voies chez *Chlamydomonas* amène d'autres questions, non abordées dans cette revue.

Nous avons démontré que chez le trypanosome, au maximum 4 des 9 doublets de microtubules disponibles sont utilisés par les trains IFT pour voyager le long de l'axonème. La résolution actuelle du FIB-SEM ne permet pas de discriminer si le train est sur le doublet 3 ou sur le doublet 4 (idem pour 7 et/ou 8). Nous avons pu discriminer les doublets de microtubule sur un seul flagelle de la souche sauvages et les trains IFT se sont avérés légèrement plus proches des doublets 4 et 7. Il est possible que les trains IFT se retrouvent sur uniquement deux de ces quatre doublets de microtubules. Pour la microscopie photonique sur cellules vivantes, la résolution est d'environ 150 nm, ce qui permet de distinguer les deux faces de l'axonème (diamètre 180 nm) mais pas de discriminer les doublets (environ 35 nm).

Chez *Chlamydomonas* presque tous les doublets de microtubules sont utilisés (Stepanek and Pigino, 2016). Comment expliquer cette différence de résultats observés chez le trypanosome et *Chlamydomonas* ? Les trains arrêtés chez *Chlamydomonas* ne sont vus que lorsque les cellules sont en mode « gliding » (Stepanek and Pigino, 2016) et ne sont pas observés en cryo microscopie lorsque les cellules ont été cryo-fixées (Jordan et al., 2018). Chez *Chlamydomonas*, lorsque les trains IFT ont été analysés à température ambiante sur des cellules qui ont glissé sur un support solide, des trains arrêtés sont observés et trois catégories différentes de trains sont quantifiés : les trains antérogrades, rétrogrades et stationnaires. En cryo-microscopie, seulement deux catégories de trains sont discutées dans l'article (Jordan et al., 2018). Est-ce que les trains stationnaires ont une composition différente ? Est-ce que les analyses à température ambiante pourraient induire des artéfacts à cause de l'adhérence à un support solide ? En glissant sur le support peut être que des trains IFT ont été arrêtés par la compression ou l'adhésion du flagelle au support ? Dans le cas des trypanosomes étudiés en FIB-SEM, la fixation a eu lieu en suspension, ce qui élimine le risque potentiel d'artefact causé par l'adhérence des cellules au support.

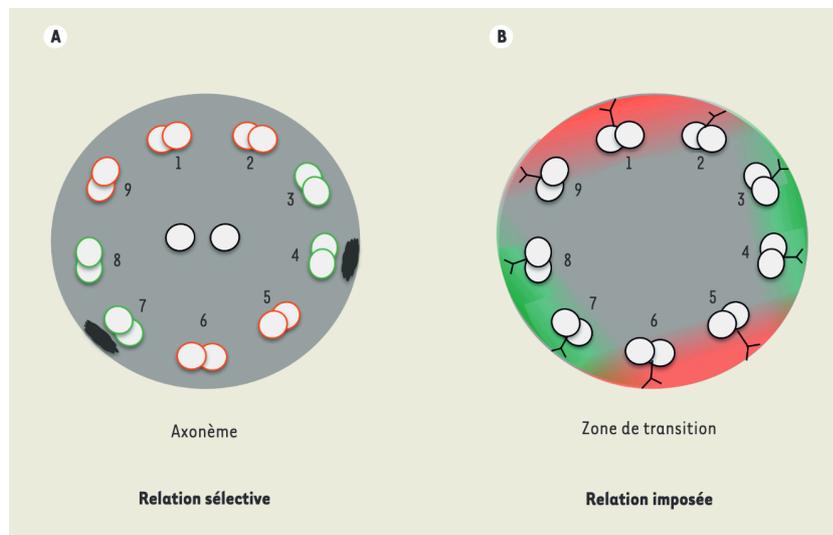
Dans notre étude nous pouvons discriminer deux catégories de trains en fonction de leurs longueurs, mais nous ne pouvons pas attribuer une fonction à ces catégories de trains (voir discussion article 1). Une approche de microscopie corrélative permettrait de lier la structure des trains à leur mode de transport.

Dans le cas du trypanosome, comment se limiter à des voies de transports spécifiques ?

Un premier cas de figure reposerait sur une relation imposée que l'on pourrait comparer à un aiguillage (Figure_Discussion 8A). Les trains se forment à la base du cil à proximité de la zone de transition. Si les trains étaient assemblés seulement au niveau de certains doublets de la zone de transition, leur positionnement serait imposé à ces microtubules. Cette hypothèse est soutenue par la diversité structurale observée dans la zone de transition (Trepout et al., 2018). Le travail de Jamin Jung va à l'encontre de ce modèle, car il a observé que la protéine IFT172 (membre du complexe IFT-B) forme un anneau à la base du flagelle, qui encercle les 9 doublets de microtubules juste au-dessus des fibres de transition (Figure_Discussion 7).

Malheureusement, la qualité des anticorps contre les dynéines et les kinésines n'a pas été suffisante pour établir leur position exacte par microscopie à super-résolution.

Une autre hypothèse peut être proposée. La composition moléculaire des microtubules des doublets où a lieu l'IFT pourrait être différente (Figure_Discussion 8B). Les tubulines sont sujettes à un grand nombre de modifications post-traductionnelles qui ont été assimilées à un « code » tubuline (Janke, 2014). La plus marquante est la polyglutamylation qui a lieu sur la queue C-terminale des tubulines qui se trouve à la surface des microtubules. Cette modification peut avoir un impact sur la vitesse et l'activité de certains moteurs moléculaires comme la kinésine 2 homodimérique (Sirajuddin et al., 2014). Si un niveau de glutamylation différent était associé aux doublets 3/4-7/8, il pourrait conférer une meilleure affinité pour les moteurs IFT et impliquer une relation sélective avec ces microtubules.



Figure_Discussion 8 : Deux hypothèses pour expliquer le positionnement restreint des trains IFT

(A) Les moteurs moléculaires sélectionnent des microtubules indiqués en vert sur la base d'une information moléculaire présente sur ceux-ci. (B) Les trains IFT sont assemblés dans la zone de transition. Si le système d'assemblage est limité aux doublets présentés en vert, les moteurs devront circuler sur ces microtubules dont la nature moléculaire peut être identique.

Est-ce que l'IFT chez d'autres modèles ou chez l'homme utilisent des voies spécifiques ?

A notre connaissance deux autres modèles ont été étudiés en détails pour comprendre les voies du transport intraflagellaire.

Chez *C. elegans*, Guangshuo Ou a montré que des trains IFT pouvaient passer d'un microtubule à un autre grâce à la microscopie en Hessien-SIM (*structured illuminated microscopy*) offrant une résolution aux alentours de 90 nm sur cellules vivantes. La résolution ne permet pas de déterminer sur quels microtubules ces trains IFT étaient positionnés mais cette observation suggère qu'il n'y a pas de spécificité entre les moteurs moléculaires et les microtubules (Xie et al., 2020).

Très récemment une nouvelle étude portant sur la localisation des trains IFT dans les cils primaires a été publiée (Kiesel et al., 2020). Les cils primaires sont des organites qui sont importants pour la signalisation dans les cellules eucaryotes.

Contrairement aux cils mobiles soigneusement étudiés, l'architecture tridimensionnelle et la composition moléculaire des cils primaires est beaucoup moins bien connue. Pourtant, étudier ces aspects est nécessaire pour comprendre comment les cils primaires fonctionnent, en particulier dans le cas de ciliopathies. Kiesel et al ont développé une méthode pour étudier la structure des cils primaires isolés à partir de cellules MDCK-II, par cryo-tomographie électronique, atteignant une excellente résolution. La partie distale de ces cils ne comprend que des microtubules singulets, comme chez *C. elegans*. Les auteurs montrent des trains IFT qui ressemblent aux trains antérogrades observés chez *Chlamydomonas* mais qui sont localisés sur le microtubule A. On rappellera que chez *Chlamydomonas*, les trains IFT antérogrades et rétrogrades sont spatialement séparés car ils se déplacent exclusivement le long des tubules B et A des doublets de microtubules, respectivement. Cette ségrégation spatiale permet un transport efficace en évitant les collisions entre trains qui se déplacent dans des directions opposées (Stepanek and Pigino, 2016). Le fait que les cils primaires soient en grandes parties « singlet » soulève des questions sur la façon dont les trains antérogrades et rétrogrades coordonnent leur mouvement sans collision. Comment les trains passent de l'extrémité des tubules B dans la zone de singlet pour atteindre la pointe ciliaire. Si les trains antérogrades ne voyagent que sur les microtubules B et les trains rétrogrades ne voyagent que sur les microtubules A, qu'en est-il des cils constitués de microtubules en singlet (Kuhns and Blacque, 2016) (Kiesel et al., 2020) ? Ceci ramène deux de nos hypothèses dans la discussion : (1) on peut imaginer que les trains antérogrades et rétrogrades emploient des régions différentes d'un même microtubule, en particulier chez les cils primaires ou les cils de *C. elegans* qui sont dépourvus de bras de dynéine ou de ponts radiaires, offrant ainsi davantage d'espace pour la circulation des trains. (2) Certains microtubules A sont peut-être réservés pour le transport antérograde et d'autres pour le transport rétrograde.

Ces résultats démontrent que le système de transport a pu s'adapter à différentes configurations d'axonème, ou peut-être même, est-ce la restriction du transport à certains microtubules ou doublets de microtubules qui a permis l'évolution d'axonèmes de structure différente...

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de cellules cillées	17
Figure 2 : Structure des cils et flagelles	18
Figure 3 : Structure de la base du cil	19
Figure 4 : Représentation schématique des cils dans diverses cellules.....	22
Figure 5 : Ciliopathies.....	23
Figure 6 : Dyskinésie ciliaire primitive	24
Figure 7 : Modèles d'étude des cils et des flagelles	25
Figure 8 : Trypanosoma brucei.....	28
Figure 9 : Cycle de vie de Trypanosoma brucei.....	30
Figure 10 : Section transversale de l'axonème de T. brucei	32
Figure 11 : Structure de la PFR.....	33
Figure 12 : Rôle de la fibre paraflagellaire	34
Figure 13 : Image de microscopie de la découverte de l'IFT.	36
Figure 14 : Structure située entre la membrane flagellaire et les microtubules.	37
Figure 15 : Transport de la tubuline dans les cils	39
Figure 16 : Modèle de la répartition des trains IFT dans le cil du trypanosome.....	40
Figure 17 : Structure de la kinésine II.	42
Figure 18 : Impact de la perte de Kinésine KIF3B chez des embryons de souris.....	43
Figure 19 : Structure de la dynéine-2 et de la dynéine 1	44
Figure 20 : Mutation de la dynéine chez L. mexicana.....	45
Figure 21 : Modèle pour la formation et la fonction du complexe dynéine.....	46
Figure 22 : Moteurs moléculaires et protéines IFT	47
Figure 23 : Les complexes IFT-A et IFT-B	48
Figure 24 : Tableau représentant les 6 gènes du complexe IFT-A (Fait par Philippe Bastin).....	50
Figure 25 : Structure de la protéine IFT140.....	51
Figure 26 : L'IFT140 chez le trypanosome.....	51
Figure 27 : Caractérisation des mutants IFT-A.....	53
Figure 28 : Étude du rôle d'IFT140 chez Chlamydomonas.....	54
Figure 29 : Manifestations clinique et radiologique d'un individu présentant un syndrome Mainzer-Saldino.....	55
Figure 30 : Deux types de trains observés chez Chlamydomonas.....	56
Figure 31 : Morphologie des trains antérogrades, rétrogrades et stationnaires.....	58
Figure 32 : Structure des trains IFT.	59
Figure 33 : Composition des flagelles des souche mutantes <i>ift139-2</i> et <i>dhc1b-3</i>	60
Figure 34 : Les trains IFT et ses acteurs.....	61
Figure_Hypothèses 1 : Les voies de transport des trains IFT.....	65
Figure_Hypothèse 2 : Voies de transports utilisés par les trains IFT.....	66
Figure_Hypothèse 3 : Construction des trains IFT	70
Figure_Résultat 1 : l'IFT-A et l'IFT-B colocalisent dans <i>IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81</i>	115
Figure_Résultat 2 : IFT-A et IFT-B colocalisent dans <i>IFT88^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::IFT81</i>	116
Figure_Résultat 3 : IFT-A , IFT-B et dynéine 2 dans la construction des trains IFT.....	117
Figure_Résultat 4 : Rôle de l'IFT-B.....	118
Figure_Résultat 5 : L'IFT-B dans la régulation de la longueur des trains IFT.....	120
Figure_Résultat 6 : Localisation de <i>mNG ::IFT140</i> dans <i>IFT88^{RNAi}</i>	121
Tableau 1 : Les 6 gènes encodant les protéines de l'IFT-A sont conservés chez T. brucei.....	121
Figure_Résultat 7 : Transport des protéines IFT-A.....	123
Tableau 2 : Fréquences et vitesses des trains IFT antérogrades	125
Figure_Résultat 8: Relation entre IFT-A et IFT-B.....	127
Figure_Résultat 9 : Comparaison des trains marqués à la <i>mNG::IFT140</i> et la <i>Tdt::IFT81</i> en conditions contrôles ou après initiation de l'extinction d'IFT140	128
Figure_Résultat 10 : Taille de trains IFT analysés en microscopie électronique FIB-SEM.	129
Figure_Résultat 11 : Colocalisation de l'IFT-140 et DHC2.1 dans le transport antérograde.	130

<i>Figure_Résultat 12 : La quantité d'IFT-A régule le chargement de la dynéine</i>	131
<i>Figure_Résultat 13 : IFT-A et Dynéine 2 dans la construction des trains IFT.....</i>	132
<i>Figure_Résultat 14 : KIN2A2B^{RNAi} mNG::IFT81</i>	133
<i>Figure_Résultat 15 : Analyse par FIB-SEM des trains dans la souche KIN2A2B^{RNAi} mNG::IFT81....</i>	134
<i>Méthode 1 : Construction des souches IFT140^{RNAi}mNG::IFT140 Tdt::IFT81 et IFT140^{RNAi} mNG::IFT140 Tdt::DHC2.1.....</i>	138
<i>Figure_Discussion 1 : Schéma de principe de l'IFT.....</i>	144
<i>Figure_Discussion 2 : Présence de trains aberrants chez le mutant ift139-2 observé en cryo- tomographie électronique</i>	147
<i>Figure_Discussion 3 : Mutant dynéine DHC1b chez Chlamydomonas</i>	149
<i>Figure_Discussion 4: Model présentant le rôle essentiel de l'IFT-A dans l'IFT et dans la construction des trains IFT.....</i>	150
<i>Figure_Discussion 5 : Détection de la protéine de fusion mNG::IFT140 contenant 6 copies du Ty1 tag</i>	151
<i>Figure_Discussion 6 : 3D-STORM 2 couleurs montre la structure et la position des protéines IFT à la base du flagelle.....</i>	152
<i>Figure_Discussion 7 : Entrée des trains IFT dans le flagelle : modèles proposés.....</i>	153
<i>Figure_Discussion 8 : Deux hypothèses pour expliquer le positionnement restreint des trains IFT ..</i>	159

REFERENCES

- Absalon, S., T. Blisnick, M. Bonhivers, L. Kohl, N. Cayet, G. Toutirais, J. Buisson, D. Robinson, and P. Bastin. 2008a. Flagellum elongation is required for correct structure, orientation and function of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.* 121:3704-3716.
- Absalon, S., T. Blisnick, L. Kohl, G. Toutirais, G. Dore, D. Julkowska, A. Tavenet, and P. Bastin. 2008b. Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes. *Mol Biol Cell.* 19:929-944.
- 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.* 143:216-225.
- Arganda-Carreras, I., R. Fernandez-Gonzalez, A. Munoz-Barrutia, and C. Ortiz-De-Solorzano. 2010. 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc Res Tech.* 73:1019-1029.
- Bachmann-Gagescu, R. 2014. [Genetic complexity of ciliopathies and novel genes identification]. *Med Sci (Paris).* 30:1011-1023.
- Bastin, P., K. Ellis, L. Kohl, and K. Gull. 2000. Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J Cell Sci.* 113 (Pt 18):3321-3328.
- 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.* 19:8191-8200.
- Bastin, P., T. Sherwin, and K. Gull. 1998. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature.* 391:548.
- Behal, R.H., M.S. Miller, H. Qin, B.F. Lucker, A. Jones, and D.G. Cole. 2012. Subunit interactions and organization of the *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport complex A proteins. *J Biol Chem.* 287:11689-11703.
- Benmerah, A., B. Durand, R.H. Giles, T. Harris, L. Kohl, C. Laclef, S.M. Meilhac, H.M. Mitchison, L.B. Pedersen, R. Roepman, P. Swoboda, M. Ueffing, and P. Bastin. 2015. The more we know, the more we have to discover: an exciting future for understanding cilia and ciliopathies. *Cilia.* 4:5.
- Bennett, R.R., and R. Golestanian. 2015. A steering mechanism for phototaxis in *Chlamydomonas*. *J R Soc Interface.* 12:20141164.
- 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, et al. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 309:416-422.
- Bertiaux, E., A. Mallet, C. Fort, T. Blisnick, S. Bonnefoy, J. Jung, M. Lemos, S. Marco, S. Vaughan, S. Trepout, J.Y. Tinevez, and P. Bastin. 2018a. Bidirectional intraflagellar transport is restricted to two sets of microtubule doublets in the trypanosome flagellum. *J Cell Biol*. 217:4284-4297.
- Bertiaux, E., B. Morga, T. Blisnick, B. Rotureau, and P. Bastin. 2018b. A Grow-and-Lock Model for the Control of Flagellum Length in Trypanosomes. *Curr Biol*. 28:3802-3814 e3803.
- 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*. 341:1009-1012.
- 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*. 25:2620-2633.
- Bolte, S., and F.P. Cordelieres. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 224:213-232.
- Bourges, A.C., A. Lazarev, N. Declerck, K.L. Rogers, and C.A. Royer. 2020. Quantitative High-Resolution Imaging of Live Microbial Cells at High Hydrostatic Pressure. *Biophys J*. 118:2670-2679.
- 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*. 119:3443-3455.
- Braun, D.A., and F. Hildebrandt. 2017. Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 9.
- 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*. 11:1591-1594.
- Briggs, L.J., J.A. Davidge, B. Wickstead, M.L. Ginger, and K. Gull. 2004. More than one way to build a flagellum: comparative genomics of parasitic protozoa. *Curr Biol*. 14:R611-612.
- 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*. 440:224-227.
- Brown, M.C., K.A. West, and C.E. Turner. 2002. Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway. *Mol Biol Cell*. 13:1550-1565.
- Bruce, D. 1895. Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand.
- Bruce, D. 1915. The Croonian Lectures ON TRYPANOSOMES CAUSING DISEASE IN MAN AND DOMESTIC ANIMALS IN CENTRAL AFRICA: Delivered before the Royal College of Physicians of London. *Br Med J*. 2:91-97.
- 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*. 36:289-292.
- Buisson, J., and P. Bastin. 2010. Flagellum Structure and Function in Trypanosomes. 17:63-86.

- 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.* 126:327-338.
- Camara, M., A.M. Soumah, H. Ilboulido, C. Travaille, C. Clucas, A. Cooper, N.R. Kuispond Swar, O. Camara, I. Sadissou, E. Calvo Alvarez, A. Crouzols, J.M. Bart, V. Jamonneau, M. Camara, A. MacLeod, B. Bucheton, and B. Rotureau. 2020. Extravascular dermal trypanosomes in suspected and confirmed cases of gambiense Human African Trypanosomiasis. *Clin Infect Dis.*
- Capewell, P., C. Cren-Travaille, F. Marchesi, P. Johnston, C. Clucas, R.A. Benson, T.A. Gorman, E. Calvo-Alvarez, A. Crouzols, G. Jouvion, V. Jamonneau, W. Weir, M.L. Stevenson, K. O'Neill, A. Cooper, N.K. Swar, B. Bucheton, D.M. Ngoyi, P. Garside, B. Rotureau, and A. MacLeod. 2016. The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. *Elife.* 5.
- Casanova, M., F. de Monbrison, J. van Dijk, C. Janke, M. Pages, and P. Bastien. 2015. Characterisation of polyglutamylases in trypanosomatids. *Int J Parasitol.* 45:121-132.
- Castano-Diez, D., and G. Zanetti. 2019. In situ structure determination by subtomogram averaging. *Curr Opin Struct Biol.* 58:68-75.
- Cavalier-Smith, T. 1974. Basal body and flagellar development during the vegetative cell cycle and the sexual cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Sci.* 16:529-556.
- Clayton, C.E. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 21:1881-1888.
- 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.* 141:993-1008.
- Collet, J., C.A. Spike, E.A. Lundquist, J.E. Shaw, and R.K. Herman. 1998. Analysis of *osm-6*, a gene that affects sensory cilium structure and sensory neuron function in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 148:187-200.
- 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.* 208:223-237.
- Dacheux, D., N. Landrein, M. Thonnus, G. Gilbert, A. Sahin, H. Wodrich, D.R. Robinson, and M. Bonhivers. 2012. A MAP6-related protein is present in protozoa and is involved in flagellum motility. *PLoS One.* 7:e31344.
- de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Herve, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour, and J.C. Olivo-Marin. 2012. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods.* 9:690-696.
- Dean, J.B., E.A. Kinkade, and R.W. Putnam. 2001. Cell-cell coupling in CO₂/H⁺-excited neurons in brainstem slices. *Respir Physiol.* 129:83-100.
- Dean, S., J. Sunter, R.J. Wheeler, I. Hodgkinson, E. Gluenz, and K. Gull. 2015. A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *Open Biol.* 5:140197.
- Dean, S., J.D. Sunter, and R.J. Wheeler. 2017. TrypTag.org: A Trypanosome Genome-wide Protein Localisation Resource. *Trends Parasitol.* 33:80-82.
- Deane, J. 2001. Localization of IFT52 identifies BB transitional fibers as the docking site for Ift particles. *Current Biology.*

- 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.* 187:615-622.
- DiBella, L.M., and S.M. King. 2001. Dynein motors of the Chlamydomonas flagellum. *Int Rev Cytol.* 210:227-268.
- Dollfus, H., J. Muller, C. Stoetzel, V. Laurier, D. Bonneau, A. Megarbane, O. Poch, and J.L. Mandel. 2006. [Bardet-Biedl syndrome: a unique family for a major gene (BBS10)]. *Med Sci (Paris).* 22:901-904.
- Douglas, R.L., B.M. Haltiwanger, A. Albisetti, H. Wu, R.L. Jeng, J. Mancuso, W.Z. Cande, and M.D. Welch. 2020. Trypanosomes have divergent kinesin-2 proteins that function differentially in flagellum biosynthesis and cell viability. *J Cell Sci.* 133.
- Dutcher, S.K. 1995. Mating and tetrad analysis in Chlamydomonas reinhardtii. *Methods Cell Biol.* 47:531-540.
- Dutcher, S.K. 2020. Asymmetries in the cilia of Chlamydomonas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 375:20190153.
- Eguether, T., J.T. San Agustin, B.T. Keady, J.A. Jonassen, Y. Liang, R. Francis, K. Tobita, C.A. Johnson, Z.A. Abdelhamed, C.W. Lo, and G.J. Pazour. 2014. IFT27 links the BBSome to IFT for maintenance of the ciliary signaling compartment. *Dev Cell.* 31:279-290.
- Escalier, D. 2003. New insights into the assembly of the periaxonemal structures in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod.* 69:373-378.
- 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.* 11:1332-1339.
- Fliegau, M., T. Benzing, and H. Omran. 2007. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:880-893.
- Fort, C., S. Bonnefoy, L. Kohl, and P. Bastin. 2016. Intraflagellar transport is required for the maintenance of the trypanosome flagellum composition but not its length. *J Cell Sci.* 129:3026-3041.
- Franco, C.H., D.C. Warhurst, T. Bhattacharyya, H.Y.A. Au, H. Le, M.A. Giardini, B.S. Pascoalino, A.C. Torrecilhas, L.M.D. Romera, R.P. Madeira, S. Schenkman, L.H. Freitas-Junior, E. Chatelain, M.A. Miles, and C.B. Moraes. 2020. Novel structural CYP51 mutation in Trypanosoma cruzi associated with multidrug resistance to CYP51 inhibitors and reduced infectivity. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 13:107-120.
- Gadelha, C., B. Wickstead, P.G. McKean, and K. Gull. 2006. Basal body and flagellum mutants reveal a rotational constraint of the central pair microtubules in the axonemes of trypanosomes. *J Cell Sci.* 119:2405-2413.
- Garcia-Gonzalo, F.R., and J.F. Reiter. 2017. Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9.
- Gibbons, I.R. 1960. On Flagellar Structure in Certain Flagellates. *The Journal of Cell Biology.* 7:697-716.
- Gilula, N.B. 1972. THE CILIARY NECKLACE: A Ciliary Membrane Specialization. *The Journal of Cell Biology.* 53:494-509.
- Guichard, P., A. Desfosses, A. Maheshwari, V. Hachet, C. Dietrich, A. Brune, T. Ishikawa, C. Sachse, and P. Gonczy. 2012. Cartwheel architecture of Trichonympha basal body. *Science.* 337:553.
- Halbritter, J., A.A. Bizet, M. Schmidts, J.D. Porath, D.A. Braun, H.Y. Gee, A.M. McInerney-Leo, P. Krug, E. Filhol, E.E. Davis, R. Airik, P.G. Czarnecki, A.M. Lehman, P. Trnka, P.

- Nitschke, C. Bole-Feysot, M. Schueler, B. Knebelmann, S. Burtey, A.J. Szabo, K. Tory, P.J. Leo, B. Gardiner, F.A. McKenzie, A. Zankl, M.A. Brown, J.L. Hartley, E.R. Maher, C. Li, M.R. Leroux, P.J. Scambler, S.H. Zhan, S.J. Jones, H. Kayserili, B. Tuysuz, K.N. Moorani, A. Constantinescu, I.D. Krantz, B.S. Kaplan, J.V. Shah, U.K. Consortium, T.W. Hurd, D. Doherty, N. Katsanis, E.L. Duncan, E.A. Otto, P.L. Beales, H.M. Mitchison, S. Saunier, and F. Hildebrandt. 2013. Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans. *Am J Hum Genet.* 93:915-925.
- 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.* 13:1679-1686.
- 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:e1003023.
- Hirano, T., Y. Katoh, and K. Nakayama. 2017. Intraflagellar transport-A complex mediates ciliary entry and retrograde trafficking of ciliary G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell.* 28:429-439.
- Hoare, C.A. 1973. Letter: "Trypanosoma brucei-subgroup". *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 67:421-422.
- 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.* 176:653-665.
- 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.* 426:83-87.
- Hughes, L.C., K.S. Ralston, K.L. Hill, and Z.H. Zhou. 2012. Three-dimensional structure of the Trypanosome flagellum suggests that the paraflagellar rod functions as a biomechanical spring. *PLoS One.* 7:e25700.
- Hunter, B., and J.S. Allingham. 2020. These motors were made for walking. *Protein Sci.* 29:1707-1723.
- Informal Expert Group on Gambiense, H.A.T.R., P. Buscher, J.M. Bart, M. Boelaert, B. Bucheton, G. Cecchi, N. Chitnis, D. Courtin, L.M. Figueiredo, J.R. Franco, P. Grebaut, E. Hasker, H. Ilboudo, V. Jamonneau, M. Koffi, V. Lejon, A. MacLeod, J. Masumu, E. Matovu, R. Mattioli, H. Noyes, A. Picado, K.S. Rock, B. Rotureau, G. Simo, S. Thevenon, S. Trindade, P. Truc, and N. Van Reet. 2018. Do Cryptic Reservoirs Threaten Gambiense-Sleeping Sickness Elimination? *Trends Parasitol.* 34:197-207.
- Iomini, C., V. Babaev-Khaimov, M. Sassaroli, and G. Piperno. 2001. Protein particles in *Chlamydomonas* flagella undergo a transport cycle consisting of four phases. *J Cell Biol.* 153:13-24.
- Iomini, C., L. Li, J.M. Esparza, and S.K. Dutcher. 2009. Retrograde intraflagellar transport mutants identify complex A proteins with multiple genetic interactions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics.* 183:885-896.
- Janke, C. 2014. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol.* 206:461-472.
- Johnson, K.A., and J.L. Rosenbaum. 1992. Polarity of flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol.* 119:1605-1611.
- Jordan, M.A., D.R. Diener, L. Stepanek, and G. Pigino. 2018. The cryo-EM structure of intraflagellar transport trains reveals how dynein is inactivated to ensure unidirectional anterograde movement in cilia. *Nat Cell Biol.* 20:1250-1255.

- Julkowska, D., and P. Bastin. 2009. Tools for analyzing intraflagellar transport in trypanosomes. *Methods Cell Biol.* 93:59-80.
- Keady, B.T., R. Samtani, K. Tobita, M. Tsuchya, J.T. San Agustin, J.A. Follit, J.A. Jonassen, R. Subramanian, C.W. Lo, and G.J. Pazour. 2012. IFT25 links the signal-dependent movement of Hedgehog components to intraflagellar transport. *Dev Cell.* 22:940-951.
- 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.* 154:103-109.
- Kennedy, P.G. 2008. The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Ann Neurol.* 64:116-126.
- Kiesel, P., G. Alvarez Viar, N. Tsoy, R. Maraspini, P. Gorilak, V. Varga, A. Honigmann, and G. Pigino. 2020. The molecular structure of mammalian primary cilia revealed by cryo-electron tomography. *Nat Struct Mol Biol.*
- Kohl, L., D. Robinson, and P. Bastin. 2003. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J.* 22:5336-5346.
- Koyfman, A.Y., M.F. Schmid, L. Gheiratmand, C.J. Fu, H.A. Khant, D. Huang, C.Y. He, and W. Chiu. 2011. Structure of *Trypanosoma brucei* flagellum accounts for its bihelical motion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:11105-11108.
- Kozminski, K.G. 2012. Intraflagellar transport--the "new motility" 20 years later. *Mol Biol Cell.* 23:751-753.
- 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.* 131:1517-1527.
- 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.* 90:5519-5523.
- Kuhns, S., and O.E. Blacque. 2016. Cilia Train Spotting. *Dev Cell.* 37:395-396.
- 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.* 187:1117-1132.
- Lechtreck, K.F., J.C. Van De Weghe, J.A. Harris, and P. Liu. 2017. Protein transport in growing and steady-state cilia. *Traffic.* 18:277-286.
- 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.* 18:1899-1906.
- Liem, K.F., Jr., A. Ashe, M. He, P. Satir, J. Moran, D. Beier, C. Wicking, and K.V. Anderson. 2012. The IFT-A complex regulates Shh signaling through cilia structure and membrane protein trafficking. *J Cell Biol.* 197:789-800.
- Livingstone, D. 1857. Missionary travels and researches in South Africa, including a sketch of sixteen year's residence in the interior of Africa. J.Murray.
- Lobo, J., M.A. Zariwala, and P.G. Noone. 2015. Primary ciliary dyskinesia. *Semin Respir Crit Care Med.* 36:169-179.
- 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.* 155:405-414.

- 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.* 13:598-602.
- Mijalkovic, J., B. Prevo, F. Oswald, P. Mangeol, and E.J. Peterman. 2017. Ensemble and single-molecule dynamics of IFT dynein in *Caenorhabditis elegans* cilia. *Nat Commun.* 8:14591.
- Miller, W.J. 2013. Bugs in transition: the dynamic world of *Wolbachia* in insects. *PLoS Genet.* 9:e1004069.
- Molla-Herman, A., R. Ghossoub, T. Blisnick, A. Meunier, C. Serres, F. Silbermann, C. Emmerson, K. Romeo, P. Bourdoncle, A. Schmitt, S. Saunier, N. Spassky, P. Bastin, and A. Benmerah. 2010. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci.* 123:1785-1795.
- 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.* 2:16.
- 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.* 264:1329-1333.
- Mukhopadhyay, I., E. Feingold, D.E. Weeks, and A. Thalamuthu. 2010. Association tests using kernel-based measures of multi-locus genotype similarity between individuals. *Genet Epidemiol.* 34:213-221.
- Mukhopadhyay, S., Y. Lu, S. Shaham, and P. Sengupta. 2008. Sensory signaling-dependent remodeling of olfactory cilia architecture in *C. elegans*. *Dev Cell.* 14:762-774.
- 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 (*orpk*) disease gene is required for left-right axis determination. *Development.* 127:2347-2355.
- Narayan, K., C.M. Danielson, K. Lagarec, B.C. Lowekamp, P. Coffman, A. Laquerre, M.W. Phaneuf, T.J. Hope, and S. Subramaniam. 2014. Multi-resolution correlative focused ion beam scanning electron microscopy: applications to cell biology. *J Struct Biol.* 185:278-284.
- Narayan, K., and S. Subramaniam. 2015. Focused ion beams in biology. *Nat Methods.* 12:1021-1031.
- 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.* 95:829-837.
- 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:M111010538.
- 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.* 398:674.
- Ou, G., O.E. Blacque, J.J. Snow, M.R. Leroux, and J.M. Scholey. 2005. Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature.* 436:583-587.
- Pazour, G.J., N. Agrin, J. Leszyk, and G.B. Witman. 2005. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J Cell Biol.* 170:103-113.

- Pazour, G.J., N. Agrin, B.L. Walker, and G.B. Witman. 2006. Identification of predicted human outer dynein arm genes: candidates for primary ciliary dyskinesia genes. *J Med Genet.* 43:62-73.
- 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. *The Journal of Cell Biology.* 151:709-718.
- 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.* 141:979-992.
- Pedersen, L.B., S. Geimer, and J.L. Rosenbaum. 2006. Dissecting the molecular mechanisms of intraflagellar transport in chlamydomonas. *Curr Biol.* 16:450-459.
- Perkins, L.A., E.M. Hedgecock, J.N. Thomson, and J.G. Culotti. 1986. Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 117:456-487.
- Perrault, I., S. Saunier, S. Hanein, E. Filhol, A.A. Bizet, F. Collins, M.A. Salih, S. Gerber, N. Delphin, K. Bigot, C. Orssaud, E. Silva, V. Baudouin, M.M. Oud, N. Shannon, M. Le Merrer, O. Roche, C. Pietrement, J. Goumid, C. Baumann, C. Bole-Feysot, P. Nitschke, M. Zahrate, P. Beales, H.H. Arts, A. Munnich, J. Kaplan, C. Antignac, V. Cormier-Daire, and J.M. Rozet. 2012. Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations. *Am J Hum Genet.* 90:864-870.
- 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.* 14:2041-2056.
- Picariello, T., J.M. Brown, Y. Hou, G. Swank, D.A. Cochran, O.D. King, K. Lehtreck, G.J. Pazour, and G.B. Witman. 2019. A global analysis of IFT-A function reveals specialization for transport of membrane-associated proteins into cilia. *J Cell Sci.* 132.
- 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.* 187:135-148.
- 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.* 94:4457-4462.
- Piperno, G., E. Siuda, S. Henderson, M. Segil, H. Vaananen, and M. Sassaroli. 1998. Distinct mutants of retrograde intraflagellar transport (IFT) share similar morphological and molecular defects. *J Cell Biol.* 143:1591-1601.
- 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.* 10:693-712.
- Portman, N., and K. Gull. 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *Int J Parasitol.* 40:135-148.
- 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.* 17:1536-1545.
- Pruski, M., L. Hu, C. Yang, Y. Wang, J.B. Zhang, L. Zhang, Y. Huang, A.M. Rajnicek, D. St Clair, C.D. McCaig, B. Lang, and Y.Q. Ding. 2019. Roles for IFT172 and Primary Cilia in Cell Migration, Cell Division, and Neocortex Development. *Front Cell Dev Biol.* 7:287.

- 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.* 5:696-711.
- 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.* 13:608-618.
- Reiter, J.F., and M.R. Leroux. 2017. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18:533-547.
- Ringo, D.L. 1967. Flagellar Motion and Fine Structure of the Flagellar Apparatus in *Chlamydomonas*. *The Journal of Cell Biology.* 33:543-571.
- Roditi, I., and C. Clayton. 1999. An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 103:99-100.
- Rosenbaum, J.L., and K. Carlson. 1969. Cilia regeneration in *Tetrahymena* and its inhibition by colchicine. *J Cell Biol.* 40:415-425.
- Rosenbaum, J.L., and F.M. Child. 1967. Flagellar regeneration in protozoan flagellates. *J Cell Biol.* 34:345-364.
- 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.* 41:600-619.
- 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.* 16:425-433.
- Rotureau, B., I. Subota, and P. Bastin. 2011. Molecular bases of cytoskeleton plasticity during the *Trypanosoma brucei* parasite cycle. *Cell Microbiol.* 13:705-716.
- 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.* 139:1842-1850.
- Rotureau, B., and J. Van Den Abbeele. 2013. Through the dark continent: African trypanosome development in the tsetse fly. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:53.
- Sapiro, R., I. Kostetskii, P. Olds-Clarke, G.L. Gerton, G.L. Radice, and I.J. Strauss. 2002. Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6. *Mol Cell Biol.* 22:6298-6305.
- 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.* 13:1687-1696.
- Satir, P. 1968. Studies on cilia. 3. Further studies on the cilium tip and a "sliding filament" model of ciliary motility. *J Cell Biol.* 39:77-94.
- Satir, P., and S.T. Christensen. 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol.* 69:377-400.
- 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.* 104:431-438.
- Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9:671-675.

- Shaner, N.C., G.G. Lambert, A. Chammass, Y. Ni, P.J. Cranfill, M.A. Baird, B.R. Sell, J.R. Allen, R.N. Day, M. Israelsson, M.W. Davidson, and J. Wang. 2013. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods*. 10:407-409.
- Sherwin, T., and K. Gull. 1989a. 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.
- Sherwin, T., and K. Gull. 1989b. Visualization of deetyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell*. 57:211-221.
- Shimogawa, M.M., S.S. Ray, N. Kisalu, Y. Zhang, Q. Geng, A. Ozcan, and K.L. Hill. 2018. Parasite motility is critical for virulence of African trypanosomes. *Sci Rep*. 8:9122.
- Signor, D., K.P. Wedaman, J.T. Orozco, N.D. Dwyer, C.I. Bargmann, L.S. Rose, and J.M. Scholey. 1999a. 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.
- Signor, D., K.P. Wedaman, L.S. Rose, and J.M. Scholey. 1999b. Two heteromeric kinesin complexes in chemosensory neurons and sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*. 10:345-360.
- Sima, N., E.J. McLaughlin, S. Hutchinson, and L. Glover. 2019. Escaping the immune system by DNA repair and recombination in African trypanosomes. *Open Biol*. 9:190182.
- Sirajuddin, M., L.M. Rice, and R.D. Vale. 2014. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol*. 16:335-344.
- 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*. 6:1109-1113.
- Sorokin, S.P. 1968. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci*. 3:207-230.
- Starich, T.A., R.K. Herman, C.K. Kari, W.H. Yeh, W.S. Schackwitz, M.W. Schuyler, J. Collet, J.H. Thomas, and D.L. Riddle. 1995. Mutations affecting the chemosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 139:171-188.
- Stepanek, L., and G. Pigino. 2016. Microtubule doublets are double-track railways for intraflagellar transport trains. *Science*. 352:721-724.
- 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*. 8:1323-1330.
- 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*. 13:1769-1786.
- Subota, I., B. Rotureau, T. Blisnick, S. Ngwabyt, M. Durand-Dubief, M. Engstler, and P. Bastin. 2011. ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. *Mol Biol Cell*. 22:4205-4219.
- 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*. 131:4085-4093.

- 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*. 36:68-75.
- Taschner, M., and E. Lorentzen. 2016. The Intraflagellar Transport Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8.
- Tinti, M., M.L.S. Guther, T.W.M. Crozier, A.I. Lamond, and M.A.J. Ferguson. 2019. Proteome turnover in the bloodstream and procyclic forms of *Trypanosoma brucei* measured by quantitative proteomics. *Wellcome Open Res*. 4:152.
- Toriyama, M., C. Lee, S.P. Taylor, I. Duran, D.H. Cohn, A.L. Bruel, J.M. Tabler, K. Drew, M.R. Kelly, S. Kim, T.J. Park, D.A. Braun, G. Pierquin, A. Biver, K. Wagner, A. Malfroot, I. Panigrahi, B. Franco, H.A. Al-Lami, Y. Yeung, Y.J. Choi, G. University of Washington Center for Mendelian, Y. Duffourd, L. Faivre, J.B. Riviere, J. Chen, K.J. Liu, E.M. Marcotte, F. Hildebrandt, C. Thauvin-Robinet, D. Krakow, P.K. Jackson, and J.B. Wallingford. 2016. The ciliopathy-associated CPLANE proteins direct basal body recruitment of intraflagellar transport machinery. *Nat Genet*. 48:648-656.
- Toropova, K., R. Zalyte, A.G. Mukhopadhyay, M. Mladenov, A.P. Carter, and A.J. Roberts. 2019. Structure of the dynein-2 complex and its assembly with intraflagellar transport trains. *Nat Struct Mol Biol*. 26:823-829.
- Trepout, S., A.M. Tassin, S. Marco, and P. Bastin. 2018. STEM tomography analysis of the trypanosome transition zone. *J Struct Biol*. 202:51-60.
- Triemer, R.E., and R.M. Brown, Jr. 1975. The ultrastructure of fertilization in *Chlamydomonas moewusii*. *Protoplasma*. 84:313-325.
- Vallet, C., E. Escudier, F. Roudot-Thoraval, S. Blanchon, B. Fauroux, N. Beydon, M. Boule, A.M. Vojtek, S. Amselem, A. Clement, and A. Tamalet. 2013. Primary ciliary dyskinesia presentation in 60 children according to ciliary ultrastructure. *Eur J Pediatr*. 172:1053-1060.
- van Dam, T.J., M.J. Townsend, M. Turk, A. Schlessinger, A. Sali, M.C. Field, and M.A. Huynen. 2013. Evolution of modular intraflagellar transport from a coatomer-like progenitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:6943-6948.
- Van Den Abbeele, J., Y. Claes, D. van Bockstaele, D. Le Ray, and M. Coosemans. 1999. *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology*. 118 (Pt 5):469-478.
- Vaughan, S., and K. Gull. 2015. Basal body structure and cell cycle-dependent biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Cilia*. 5:5.
- Vickerman, K. 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull*. 41:105-114.
- Vincensini, L., T. Blisnick, and P. Bastin. 2011. 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biol Cell*. 103:109-130.
- Wachter, S., J. Jung, S. Shafiq, J. Basquin, C. Fort, P. Bastin, and E. Lorentzen. 2019. Binding of IFT22 to the intraflagellar transport complex is essential for flagellum assembly. *EMBO J*. 38.
- Walentek, P., and I.K. Quigley. 2017. What we can learn from a tadpole about ciliopathies and airway diseases: Using systems biology in *Xenopus* to study cilia and mucociliary epithelia. *Genesis*. 55.
- Walther, Z., M. Vashishtha, and J.L. Hall. 1994. The *Chlamydomonas* FLA10 gene encodes a novel kinesin-homologous protein. *J Cell Biol*. 126:175-188.

- Wang, Q., M. Taschner, K.A. Ganzinger, C. Kelley, A. Villasenor, M. Heymann, P. Schwille, E. Lorentzen, and N. Mizuno. 2018. Membrane association and remodeling by intraflagellar transport protein IFT172. *Nat Commun.* 9:4684.
- Wang, X., Y.W. Sha, W.T. Wang, Y.Q. Cui, J. Chen, W. Yan, X.T. Hou, L.B. Mei, C.C. Yu, and J. Wang. 2019. Novel IFT140 variants cause spermatogenic dysfunction in humans. *Mol Genet Genomic Med.* 7:e920.
- Webb, S., A.G. Mukhopadhyay, and A.J. Roberts. 2020. Intraflagellar transport trains and motors: Insights from structure. *Semin Cell Dev Biol.*
- Williams, C.L., C. Li, K. Kida, P.N. Inglis, S. Mohan, L. Semenc, 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.* 192:1023-1041.
- Wirtz, E., and C. Clayton. 1995. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science.* 268:1179-1183.
- Wirtz, E., S. Leal, C. Ochatt, and G.A. Cross. 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.
- 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.* 23:2463-2471.
- Xie, C., L. Li, M. Li, W. Shao, Q. Zuo, X. Huang, R. Chen, W. Li, M. Brunnbauer, Z. Okten, L. Chen, and G. Ou. 2020. Optimal sidestepping of intraflagellar transport kinesins regulates structure and function of sensory cilia. *EMBO J.* 39:e103955.
- Yi, P., W.J. Li, M.Q. Dong, and G. Ou. 2017. Dynein-Driven Retrograde Intraflagellar Transport Is Triphasic in *C. elegans* Sensory Cilia. *Curr Biol.* 27:1448-1461 e1447.
- Yuan, S., Y. Liu, H. Peng, C. Tang, G.W. Hennig, Z. Wang, L. Wang, T. Yu, R. Klukovich, Y. Zhang, H. Zheng, C. Xu, J. Wu, R.A. Hess, and W. Yan. 2019. Motile cilia of the male reproductive system require miR-34/miR-449 for development and function to generate luminal turbulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116:3584-3593.
- Zhang, C., S. Zhang, and Y. Sun. 2019. Expression of IFT140 During Bone Development. *J Histochem Cytochem.* 67:723-734.
- Zhang, K., H.E. Foster, A. Rondelet, S.E. Lacey, N. Bahi-Buisson, A.W. Bird, and A.P. Carter. 2017. Cryo-EM Reveals How Human Cytoplasmic Dynein Is Auto-inhibited and Activated. *Cell.* 169:1303-1314 e1318.
- Zhang, P. 2019. Advances in cryo-electron tomography and subtomogram averaging and classification. *Curr Opin Struct Biol.* 58:249-258.
- Zhu, B., X. Zhu, L. Wang, Y. Liang, Q. Feng, and J. Pan. 2017. Functional exploration of the IFT-A complex in intraflagellar transport and ciliogenesis. *PLoS Genet.* 13:e1006627.

Titre projet : Le transport intraflagellaire : construction et déplacement des trains dans le flagelle du trypanosome.

Projet de recherche : Les cils et flagelles sont constitués d'un cylindre de neuf doublets de microtubules périphériques appelé axonème. Ils contiennent au moins 500 protéines et leur construction s'effectue essentiellement par addition de nouvelles sous-unités à l'extrémité distale. Les composants du flagelle y sont acheminés par le transport intraflagellaire (IFT), le déplacement de « trains » formés de deux complexes de protéines, entre la membrane flagellaire et les doublets de microtubules par des moteurs moléculaires de type kinésine et dynéine.

Mon projet de thèse s'articule autour du rôle et du fonctionnement de l'IFT en utilisant comme modèle d'étude le protiste *Trypanosoma brucei*. Les objectifs de ma thèse étaient (i) de déterminer comment les trains IFT sont assemblés en établissant le lien entre leur composition moléculaire et leur structure et (ii) d'établir le trajet emprunté par les trains IFT au sein de l'organite.

En combinant des approches de microscopie photonique et de microscopie électronique après ciblage par ARNi de gènes encodant des protéines constituant les trains IFT, nous avons mis en évidence leur contribution à la construction des trains IFT et la régulation de leur longueur. Nous proposons un nouveau modèle pour expliquer la formation des trains et leur entrée dans le compartiment flagellaire. Par microscopie électronique tridimensionnelle (FIB-SEM), nous avons démontré qu'après leur assemblage, les trains IFT sont localisés au niveau de seulement 4 doublets de microtubules sur les 9 disponibles. Ces résultats ont été obtenus à la fois *in vitro* et *ex vivo* sur des parasites se développant chez la mouche tsé-tsé. La comparaison des résultats avec la littérature met en exergue la flexibilité du transport en fonction de l'anatomie des cils et flagelles.

Mots clés : trypanosome, flagelle, transport, IFT, microtubules

Project title: Intraflagellar transport: construction and movement of trains in the trypanosome flagellum

Research project: Cilia and flagella are essential organelles composed of 9 doublet microtubules. They contain at least 500 proteins and their construction is mainly done by adding new subunits at the distal end. They are transported by Intraflagellar transport (IFT), the movement of trains composed of two protein complexes between the flagellar membrane and the microtubule doublets by driven by molecular kinesin and dynein motors.

My thesis project is based on the role and functioning of IFT using the protist *Trypanosoma brucei* as a model organism. The goal of my thesis project was (i) to determine how IFT trains are assembled by establishing the link between their molecular composition and their structure and (ii) to establish the route taken by IFT trains within the flagella.

By combining light microscopy and electron microscopy approaches after RNAi targeting of genes coding for IFT train components, we have demonstrated their contribution to the construction of IFT trains. We propose a new model to explain train formation and their entry in the flagellum. By three-dimensional electron microscopy (FIB-SEM), we have also shown where IFT trains are located. Trains are specifically found on 4 microtubule doublets out of the 9 available. These results have been obtained both *in vitro* and *ex vivo* using parasites developing in the tsetse fly. Comparison of the results with the literature highlights the flexibility of transport depending on the anatomy of cilia and flagella.

Key words: trypanosome, flagellum, transport, IFT, microtubules