



HAL
open science

Caractérisation de nouvelles protéines, partenaires potentiels de BILBO1, chez le parasite *Trypanosoma brucei*

Elodie Berdance

► **To cite this version:**

Elodie Berdance. Caractérisation de nouvelles protéines, partenaires potentiels de BILBO1, chez le parasite *Trypanosoma brucei*. Immunologie. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0390 . tel-01424134

HAL Id: tel-01424134

<https://theses.hal.science/tel-01424134>

Submitted on 2 Jan 2017

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie et de la Santé
SPÉCIALITÉ : Microbiologie - Immunologie

Par Elodie BERDANCE

**Caractérisation de nouvelles protéines, partenaires
potentiels de BILBO1, chez le parasite *Trypanosoma brucei***

Sous la direction de : Derrick ROBINSON

Soutenue le 09 décembre 2014 à 14h00.

Membres du jury :

M. TEICHMANN Martin	Professeur	Bordeaux	Président
M. BASTIEN Patrick	Professeur	Montpellier	Rapporteur
M. BENMERAH Alexandre	Directeur de recherche	Paris	Rapporteur
M. ROBINSON Derrick	Directeur de recherche	Bordeaux	Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr. Martin Teichmann, le Pr. Patrick Bastien ainsi que le Dr. Alexandre Benmerah qui ont acceptés d'examiner et de juger mon travail.

Je remercie mon directeur de thèse, le Dr. Derrick Robinson, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour m'avoir encadrée et conseillée durant ces trois années.

Je remercie les autres membres de l'équipe : le Dr. Mélanie Bonhivers, le Dr. Benoit Roger et le Dr. Denis Dacheux-Deschamps pour l'aide et les conseils qu'ils ont pu m'apporter durant ma thèse. Sans oublier Nicolas Landrein et Anna Albisetti pour les dégustations de pâtisseries mais aussi pour leur aide. Merci aussi à Karen Eguienta, Saliha Ait Aissa et Annelise Sahin qui ont contribué à ce projet.

J'exprime aussi tous mes remerciements à l'ensemble des personnes de l'étage « Para-myc » pour l'ambiance chaleureuse, les débats animés et les fous rires le midi à la cafet'. Merci aussi à tous les membres de l'UMR 5234.

Je remercie les « vilaines » : Annelise, Jacqueline et Mag pour les bons moments passés ensemble, que ce soit les sorties shopping à Mériadeck ou les repas au P'tit Québec. Mais aussi pour leur soutien et leurs conseils.

Une pensée à mes collègues thésards : Adrien, Alice, Anaïs et Rémi.

Alice et Nico je vous remercie pour le super ordinateur qui m'a permis d'écrire ma thèse et aussi pour les très bons moments passés ensemble.

Enfin, je voudrais remercier mes parents, ma sœur et Yoann, pour votre immense soutien et pour avoir cru en moi toutes ces années.

Sommaire

Introduction	8
I. Les kinétoplastidés : taxonomie	9
II. Les trypanosomiases	9
a. Trypanosomiase Américaine	9
b. Trypanosomiases Africaines	10
i. Trypanosomiases humaines	10
1. <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	11
2. <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	12
ii. Trypanosomiase animale : <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	12
III. <i>Trypanosoma brucei</i>	13
a. Le cycle parasitaire	13
b. Le cycle de division cellulaire	14
c. Protéines de surface et variation antigénique	16
d. Le génome	17
i. Le génome nucléaire	17
ii. Le génome mitochondrial : le kinétoplaste	19
e. Architecture cellulaire	19
i. Le cytosquelette	19
1. Les microtubules et les MAPs	20
2. L'actine	22
3. Le bilobe	22
4. Le corset sous pelliculaire	24
5. Le flagelle	24
a. Le corps basal	25
b. L'axonème	25
c. Le PFR ou Paraflagellar Rod	27
d. La Zone d'Attachement du Flagelle ou FAZ	28
ii. La poche flagellaire	29
1. Structure et fonction	29
2. Endocytose	31
3. Exocytose	32
iii. Le collier de la poche flagellaire	33
1. BILBO1	35
2. Les partenaires de BILBO1	37
IV. Les kinésines	38
a. Classification	38
b. Structure	39
c. Activité et fonctions	40
i. Transport de « cargos »	40
ii. Dépolymérisation des microtubules	42
iii. Régulation des kinésines	42
iv. Maladies	44
d. Autres fonctions	44
e. Les kinésines chez <i>Trypanosoma brucei</i>	45
V. Les synaptotagmines	46
a. Structure	46
b. Classification	47
c. Fonction : la fusion membranaire	48
VI. Objectifs	50

Matériel et Méthodes _____ **52**

I. Matériel	53
a. Les lignées cellulaires	53
i. Les parasites	53
ii. Les bactéries	53
iii. Les cellules de mammifères	53
iv. Les levures	54
b. Les milieux de culture	54
i. Pour le parasite	54
ii. Pour les bactéries	55
iii. Pour les cellules de mammifères	55
iv. Pour les levures	55
c. Les vecteurs	56
i. Chez les parasites	56
ii. Chez les bactéries	57
iii. Chez les cellules de mammifères	58
iv. Chez les levures	58
II. Méthodes	60
a. Biologie moléculaire	60
i. Construction des vecteurs	60
ii. Séquençage	60
iii. Transformation des bactéries	61
iv. RT-PCR semi-quantitative	61
b. Le double hybride	62
c. Biologie cellulaire	63
i. Transfection des parasites	63
ii. ARN interférence chez le parasite	64
iii. Surexpression chez le parasite	66
iv. Lipofection des cellules U-2 OS	66
d. Cytométrie en flux	67
e. Biochimie	67
i. Expression et purification de protéines recombinantes	67
1. Etiquette histidine	67
2. Etiquette GST	68
3. Etiquette MBP	68
4. Echangeuse d'anions	69
ii. Gel SDS-PAGE et western blot	69
iii. Enzyme Linked Inorganic Phosphate Assay	70
f. Imagerie	71
i. Immunofluorescence	71
1. Chez les trypanosomes	71
a. Forme procyclique	71
b. Forme sanguine	73
2. Chez les cellules U-2 OS	74
ii. Comptages automatiques	76
iii. Microscopie électronique	76

FPC5 un nouveau partenaire de BILBO1 _____ **78**

I. Carte d'identité de FPC5	79
II. FPC5 une protéine des corps basaux	81
a. Production d'un anticorps polyclonal	81
b. Localisation de FPC5 <i>via</i> l'utilisation d'anticorps	82
c. Localisation de FPC5 étiquetée	85
III. FPC5 un partenaire de BILBO1	85
a. Double hybride	85
b. Surexpression du domaine de liaison à BILBO1 (B1BD) chez le parasite	87

c.	Co-expression de BILBO1 et FPC5 en système hétérologue _____	88
IV.	Analyse fonctionnelle _____	90
a.	ARN interférence _____	90
b.	Surexpression chez la forme procyclique _____	94
i.	Surexpression de FPC5::myc _____	94
ii.	Surexpression de FPC5 ^{MD} ::myc _____	96
V.	FPC5 une kinésine putative _____	97
a.	Production et purification de la forme recombinante du domaine moteur _____	97
b.	Activité ATPase _____	99
c.	FPC5 capable de dimériser ? _____	103
VI.	Interaction avec les autres partenaires de BILBO1 _____	103
VII.	Conclusion _____	104
 <i>FPC9 un partenaire potentiel de BILBO1 _____</i>		106
I.	Carte d'identité de FPC9 _____	107
II.	FPC9 un partenaire potentiel de BILBO1 _____	108
a.	Interaction avec BILBO1 _____	108
b.	Interaction avec les autres partenaires de BILBO1 _____	109
III.	FPC9 une protéine proche de la zone de transition _____	110
a.	Production d'un anticorps polyclonal _____	110
b.	Localisation _____	111
IV.	Analyse fonctionnelle _____	112
a.	ARN interférence _____	112
b.	Surexpression chez le parasite _____	114
i.	Sans étiquette _____	114
ii.	Avec étiquette GFP _____	114
V.	Conclusion _____	115
 <i>Discussion générale - perspectives _____</i>		117
I.	La poche flagellaire _____	118
II.	Le collier de la poche flagellaire _____	119
a.	BILBO1 _____	121
b.	Les nouveaux partenaires de BILBO1 _____	122
i.	FPC5 _____	122
ii.	FPC9 _____	124
III.	Perspectives _____	126
a.	FPC5 _____	126
b.	FPC9 _____	127
 <i>Bibliographie _____</i>		129

Liste des abréviations

aa. : acide aminé

AD : Activating Domain (domaine d'activation du facteur de transcription GAL4)

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : acide ribonucléique

ARNi : ARN interférence

ARNm / ARNr / ARNg : ARN messenger / ARN ribosomique / ARN guide

ATP : Adénosine triphosphate

B1BD : BILBO1 binding domain (domaine de liaison à BILBO1)

BD : Binding Domain (domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4)

BET : Bromure d'éthidium

Da : dalton

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DTT : dithiothreitol

ELIPA : Enzyme Linked Inorganic Phosphate Assay

FAZ : Flagellar Attachment Zone (Zone d'Attachement du Flagelle)

FITC : Fluoresceine-5-isothiocyanate

FP : Flagellar Pocket (Poche Flagellaire)

FPC : Flagellar Pocket Collar (Collier de la Poche Flagellaire)

GDP : Guanosine diphosphate

GFP : Green Fluorescent Protein (protéine fluorescente verte)

GPI : glycosylphosphatidylinositol

GST : Glutathion-S-transferase

GTP : Guanosine triphosphate

HAT : Human African Trypanosomiasis (Trypanosomiase Humaine Africaine)

His : histidine

IFT : Intraflagellar transport (transport intraflagellaire)

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

MAP : Microtubules associated protein (protéine associée aux microtubules)

MBP : Maltose Binding Protein (protéine de liaison du maltose)

MD : Motor Domain (domaine moteur de FPC5)

MTOC : microtubule-organizing center (centre organisateur des microtubules)

NEFTC : Nifurtimox-Eflornithine Combination Treatment
NP40 : Nonidet P-40
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)
pb : paires de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR/RT-PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne par la polymérase),
RT : Reverse Transcription (transcription inverse)
PFA : Paraformaldehyde
PFR : Paraflagellar rod
RE : réticulum endoplasmique
SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SRA : serum resistance-associated protein (protéine de résistance au sérum)
SVF : sérum de veau fœtal
Syt : synaptotagmine
TAC : Tripartite Attachment Complex (complexe d'attachement tripartite)
TBS : Tris-buffered saline
Tet : tétracycline
TLF : Trypanolytic factor (facteur trypanolytique)
VSG : Variant Surface Glycoprotein (glycoprotéine de surface variable)
WT : wild type (type sauvage)

Introduction

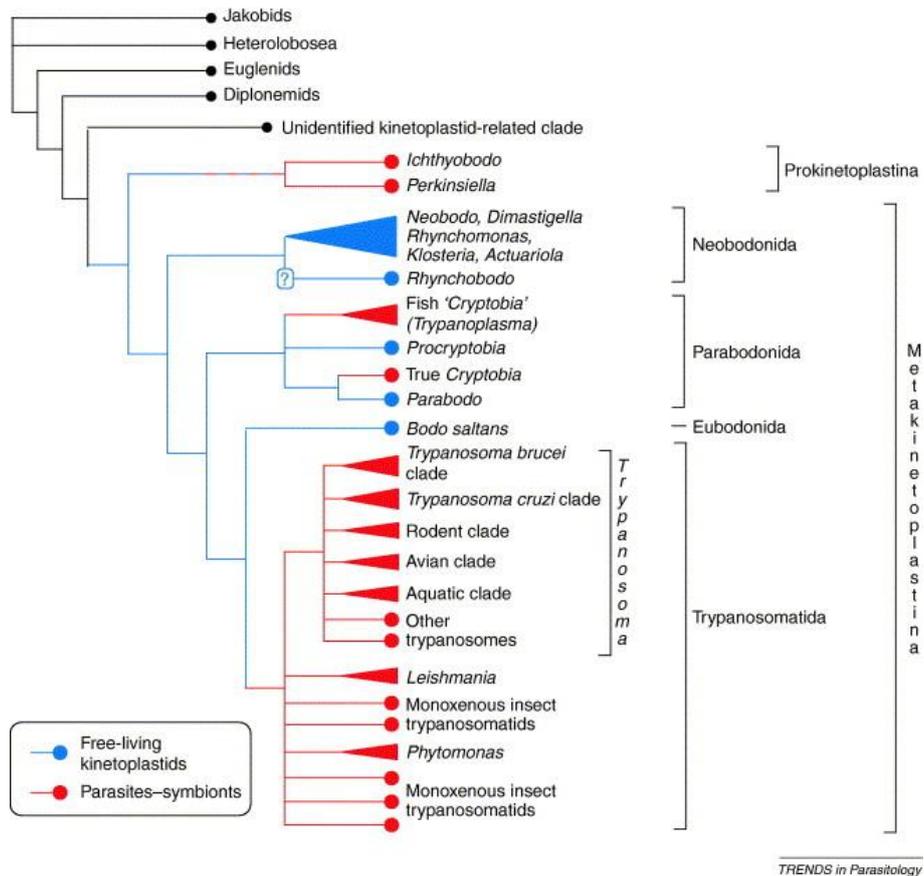


Figure 1 : Phylogénie des *Kinétoplastidae*.

Phylogénie basée sur la séquence des gènes codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomique. Issu de la publication : Simpson et coll., « The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates », 2006.

I. Les kinétoplastidés : taxonomie

Les parasites de la classe des *Kinetoplastidae* sont des parasites protozoaires uniflagellés, caractérisés par la présence d'un organite particulier appelé kinétoplaste (Lukes et al., 2002). Le kinétoplaste contient le matériel génétique de l'unique mitochondrie. La classe des *Kinetoplastidae* contient deux sous-classes : *Prokinetoplastina* et *Metakinetoplastina* (Moreira et al., 2004; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008). Cette dernière sous-classe est composée de quatre ordres : *Neobodonida*, *Parabodonida*, *Eubodonida* et *Trypanosomatida* (Figure 1). Ce dernier ordre contient le genre *Trypanosoma* qui regroupe les parasites responsables des trypanosomioses africaines et américaines (Moreira et al., 2004; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008). L'ordre des *Trypanosomatida* comprend également les parasites du genre *Leishmania*, responsables de maladies graves qui affectent l'Homme : les leishmanioses (Antinori et al., 2012).

II. Les trypanosomioses

a. Trypanosomiase Américaine

La trypanosomiase américaine aussi appelée maladie de Chagas est causée par le parasite *Trypanosoma cruzi* (Rassi Jr et al., 2010). Cette maladie, reconnue comme maladie tropicale négligée, est endémique dans 21 pays d'Amérique centrale et du sud. Elle affecte 7 à 8 millions de personnes dans le monde et tue 12 000 personnes par an (OMS - Organisation Mondiale de la Santé, 2011). *T. cruzi* est transmis par les fèces de la réduve, un insecte hématophage de la famille des *Triatominae* (Rassi Jr et al., 2010). Il peut aussi être transmis lors de transfusion sanguine, de transplantation d'organes, *via* des aliments contaminés ou par transmission verticale entre la mère et l'enfant (Rassi Jr et al., 2010). L'infection à *T. cruzi* est caractérisée par une phase aiguë qui dure quelques semaines, suivie d'une phase chronique le plus souvent asymptomatique et qui peut durer plusieurs années. Les traitements actuels provoquent des effets secondaires non négligeables et ne sont pas efficaces pendant la phase chronique (Rassi Jr et al., 2010).

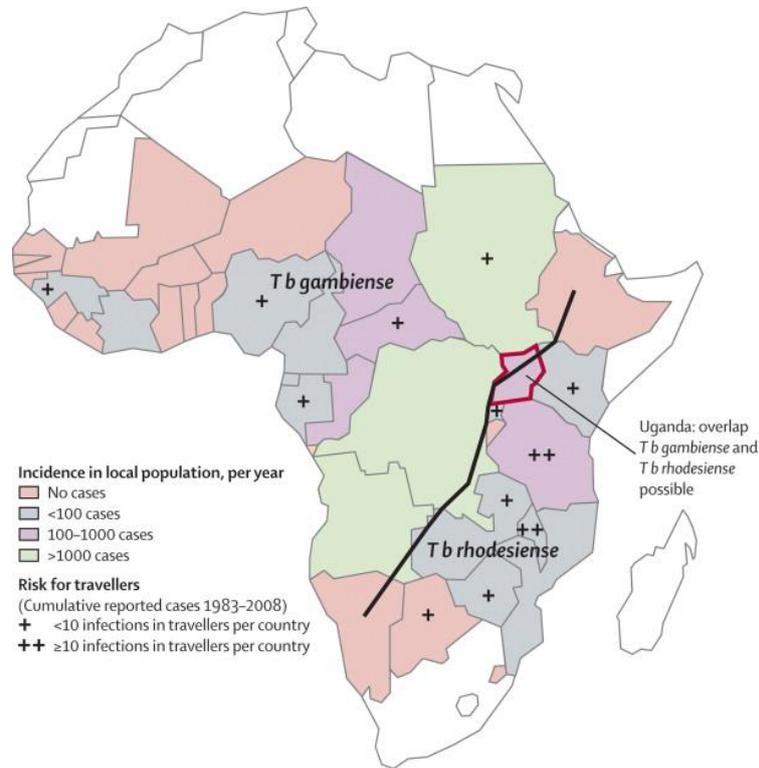


Figure 2 : Répartition géographique des trypanosomiasis humaines africaines.

T. b. gambiense est retrouvé en Afrique de l'ouest et centrale alors que *T. b. rhodesiense* est rencontré en Afrique de l'est. Issu de : Brun et coll., « Human African trypanosomiasis », 2010.

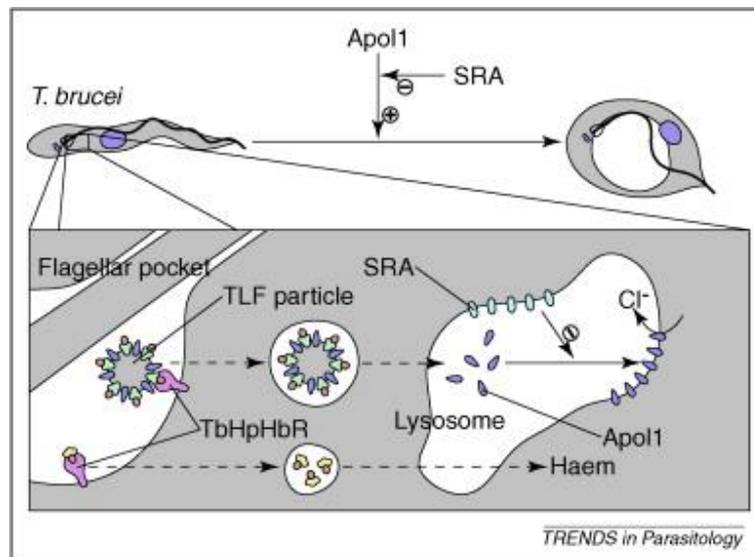


Figure 3 : Mécanisme de trypanolyse.

Le récepteur *TbHpHbR* (rose) permet l'internalisation des TLFs contenant APO-L1 (bleu). Une fois dans les lysosomes, APO-L1 va former des pores dans la membrane, ce qui entraîne un influx d'ions chlorure dans le lysosome. Ce phénomène crée un changement de pression osmotique et pour compenser le lysosome se charge en eau. Ce gonflement incontrôlé du lysosome conduit à la mort de la cellule. La protéine SRA interagit avec APO-L1 dans l'endosome tardif et le lysosome, l'empêchant ainsi de former des pores dans la membrane lysosomale. Issu de : Wheleler RJ., « The trypanolytic factor-mechanism, impacts and applications », 2010.

b. Trypanosomiasés Africaines

i. Trypanosomiasés humaines

La trypanosomiase africaine humaine (HAT), aussi appelée maladie du sommeil est une parasitose transmise par un insecte vecteur : la mouche tsé-tsé ou glossine. La maladie est rencontrée en Afrique sub-saharienne sur le territoire de la mouche tsé-tsé (Figure 2). Cependant certaines zones sont épargnées par la maladie bien que la glossine soit présente. Le nombre de cas est estimé à 30 000 et 70 millions de personnes sont considérées comme à risque (OMS, 2010). Deux sous-espèces ont la capacité d'infecter l'Homme : *Trypanosoma brucei gambiense* et *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Malvy and Chappuis, 2011). En effet, pour ce faire ces deux sous-espèces ont développé des mécanismes de résistance aux facteurs trypanolytiques TLF-1 et TLF-2 (Trypanolytic Factor, TLF) (Wheeler, 2010) présents dans le sérum humain. *T. b. rhodesiense* possède une protéine de résistance au sérum humain (SRA, serum resistance-associated protein) (De Greef and Hamers, 1994; Van Xong et al., 1998). Cette protéine est apparentée à un VSG (Variant Surface Glycoprotein) et est transcrite dans un site d'expression des VSG. Quant à *T. b. gambiense*, il exprime une glycoprotéine spécifique : TgsGP (*T. b. gambiense*-specific glycoprotein) (Capewell et al., 2013; Uzureau et al., 2013). Les complexes TLF possèdent les protéines HRP (haptoglobin-related protein) et APO-L1 (apolipoprotein L1). HRP permet la liaison à l'hémoglobine (Hb) ce qui assure l'entrée de TLF-1 dans les trypanosomes *via* l'interaction avec le récepteur TbHpHbR. L'entrée de TLF-2 est indépendante de ce récepteur. Une fois les TLF entrés, l'APO-L1 génère des pores dans la membrane lysosomale, ce qui entraîne l'entrée d'ions chlorure et d'eau du cytosol vers le lysosome. Pour compenser le déficit en ions chlorure dans le cytosol, une importation d'ions chlorure depuis le milieu extracellulaire est mise en place, ce qui conduit à une augmentation de la pression intracellulaire et ainsi à la mort du parasite (Pays et al., 2006; Vanhollebeke and Pays, 2010; Wheeler, 2010) (Figure 3). Dans le cas de *T. b. rhodesiense*, la protéine SRA permet la neutralisation de APO-L1 en interagissant avec cette dernière, ce qui entraîne la survie du parasite dans le sang de l'hôte (Van Xong et al., 1998). Chez *T. b. gambiense* le mécanisme de résistance est différent. En effet, la protéine TgsGP renforce les membranes lysosomales en interagissant avec les

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

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

Figure 4 : Traitements contre les trypanosomiasés humaines africaines.

Tableau répertoriant les traitements contre la maladie du sommeil en fonction du parasite (*T. b. gambiense* ou *T. b. rhodesiense*), pour les deux stades de la maladie. Issus de : Malvy et coll., « Sleeping sickness », 2011.

lipides ce qui empêche l'incorporation de APO-L1 dans ces dernières (Uzureau et al., 2013).

Deux phases distinctes caractérisent la maladie du sommeil. Durant la première phase ou phase lymphatico-sanguine, les parasites injectés lors d'une piqûre par une mouche tsé-tsé infectée vont se multiplier dans le système sanguin et lymphatique de l'hôte. Les signes cliniques correspondant sont l'apparition de fièvre, de céphalées et de douleurs articulaires (Malvy and Chappuis, 2011). Lors de la deuxième phase aussi appelée phase neurologique, les parasites franchissent la barrière hémato-encéphalique et envahissent le système nerveux central (Mogk et al., 2014). Le patient présente alors des troubles du comportement, de la coordination et du sommeil (Malvy and Chappuis, 2011). Sans traitement, l'issue de cette maladie est fatale. A l'heure actuelle, aucun vaccin n'est disponible dû à la variation antigénique et les traitements proposés sont toxiques et difficiles à mettre en place (Jacobs et al., 2011). Pour ces raisons, de nombreux travaux sont menés pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques chez *T. brucei*.

1. *Trypanosoma brucei gambiense*

T. b. gambiense est rencontré dans 24 pays d'Afrique Centrale et de l'Ouest (Figure 2), et à lui seul il est responsable de 98% des cas de maladie du sommeil. Ce parasite est transmis par la mouche tsé-tsé du genre *Glossina palpalis*. Son principal réservoir est l'Homme bien que le parasite soit aussi retrouvé chez le porc et le chien. L'infection est qualifiée de chronique et peut perdurer plusieurs années. Le traitement contre ce parasite dépend du stade de la maladie. Durant la première phase de la maladie, le traitement consiste en l'injection de pentamidine en intramusculaire (Malvy and Chappuis, 2011) (Figure 4). Lors de la seconde phase, une molécule capable de passer la barrière hémato-encéphalique est nécessaire. Pour cela, l'éflornithine (Malvy and Chappuis, 2011) est utilisée en intraveineux pour traiter les patients (Figure 4). Cette molécule est un inhibiteur de la biosynthèse des polyamines. Bien que de faible toxicité comparé au mélarsoprol (utilisé contre *T. b. rhodesiense*), elle n'est efficace que sur *T. b. gambiense*. Le nifurtimox peut

également être associé à l'éflornithine dans le cadre d'une bithérapie, NECT (Nifurtimox-Eflornithine Combination Treatment) (Babokhov et al., 2013).

2. *Trypanosoma brucei rhodesiense*

Ce parasite est présent dans 13 pays d'Afrique orientale et australe (Figure 2), et représente seulement 2% des cas rapportés de maladie du sommeil. Il est transmis par la glossine du genre *Glossina morsitans*. Les animaux sauvages (antilopes, phacochères, etc) ainsi que le bétail constituent le réservoir principal de ce parasite. L'infection par *T. b. rhodesiense* est caractérisée comme aigüe. En effet, la seconde phase de la maladie est atteinte en quelques semaines et sans traitement la mort survient en seulement quelques mois. Durant la première phase de la maladie la suramine est administrée en intraveineux (Malvy and Chappuis, 2011) (Figure 4). Malgré le fait que cette molécule possède une forte toxicité rénale et neurologique, elle est encore utilisée pour traiter les patients. Le traitement de la seconde phase nécessite une molécule capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. C'est le cas du mélarsoprol, un dérivé d'arsenic (Malvy and Chappuis, 2011) (Figure 4). Cependant cette molécule reste très toxique et conduit à la mort dans 5 à 10% des cas (Schmid et al., 2005).

ii. Trypanosomiase animale : *Trypanosoma brucei brucei*

La sous-espèce *T. b. brucei* est responsable de la maladie Nagana. Aussi appelée trypanosomiase africaine animale, elle affecte essentiellement le bétail. Cette maladie est la cause de pertes économiques considérables qui sont évaluées à 1-1,2 milliards de dollars par an (Ilemobade, 2009). En effet, elle entraîne une altération des productions laitières et bovines, due à une perte de poids et une anémie des animaux infectés. D'autres espèces sont à l'origine de cette maladie : *T. congolense*, *T. vivax* et *T. evansi*. Ces espèces ne sont pas pathogènes pour l'Homme car contrairement à *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*, elles ne possèdent pas de facteurs de résistance aux facteurs trypanolytiques contenus dans le sérum humain : TLF-1 et TLF-2 (Wheeler, 2010).

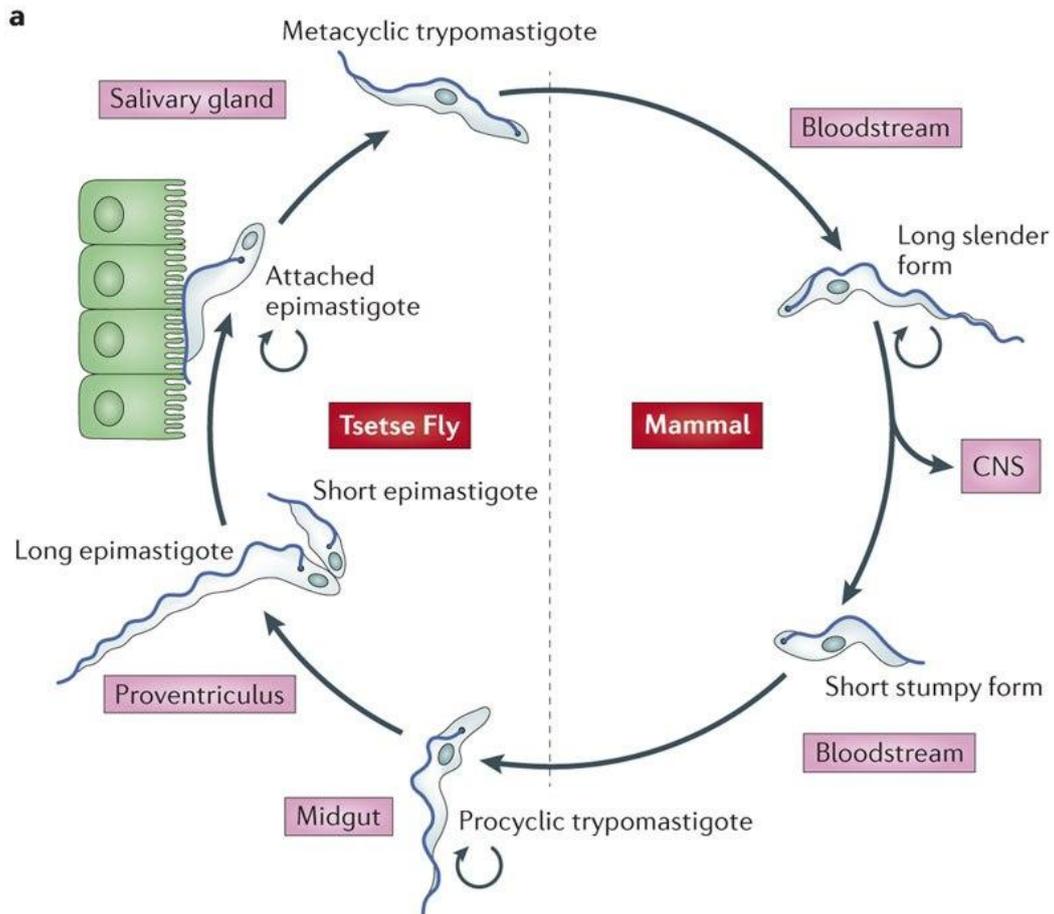


Figure 5 : Cycle parasitaire de *Trypanosoma brucei*.

Lors d'une piqûre par une glossine infectée, les formes métacycliques infectieuses sont injectées dans le sang de l'hôte où elles se différencient en formes sanguines « long slender ». Ces formes se multiplient dans le sang et la lymphe et pourront se différencier en « short stumpy ». Ces dernières seront ingérées par une mouche tsé-tsé lors de son repas sanguin et se différencieront dans son intestin moyen (midgut) en formes trypomastigotes procycliques. Les procycliques vont ensuite se différencier en épimastigotes capables de proliférer. Ces derniers vont se différencier en métacycliques infectieuses dans les glandes salivaires. Issu de : Langousis et coll., « Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei* », 2014.

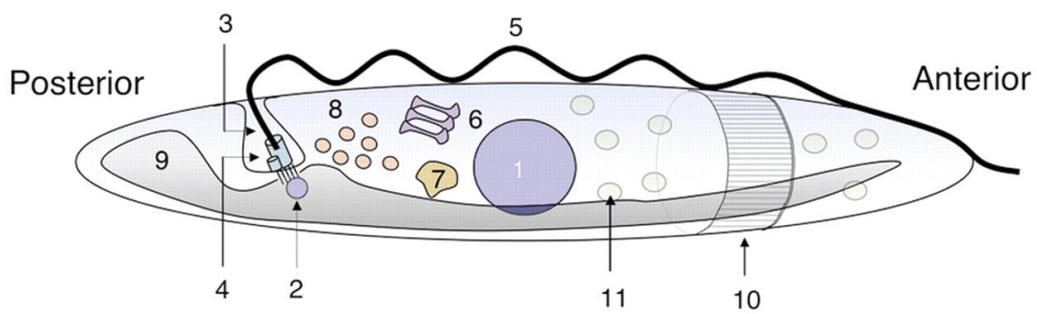
A l'heure actuelle, de nombreux trypanocides sont disponibles pour lutter contre l'infection à *T. b. brucei*. Les plus couramment utilisés sont l'acéturate de diminazène et le chlorure d'isométymidium (Magona et al., 2004) en Afrique de l'Ouest, et les chlorure et bromure d'éthidium en Afrique de l'Est (Roy Chowdhury et al., 2010).

III. *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei est un organisme modèle de choix. En effet, son génome a été entièrement séquencé en 2005 (Berriman et al., 2005a) et est disponible sur la base de données TriTrypDB (<http://TriTrypDB.org>). La technique d'ARN interférence (ARNi) (Wirtz et al., 1999b) est utilisée chez ce parasite et permet de générer des mutants. La délétion de gènes par knock-out est également possible. De plus, la culture de la forme sanguine « long slender » et de la forme procyclique *in vitro*, est relativement facile en laboratoire. D'autre part, le génome de la sous-espèce *T. brucei brucei* pathogène des animaux mais pas de l'Homme est quasiment identique à celui des deux sous-espèces responsables de l'infection chez l'Homme, à l'exception notamment du gène codant pour la protéine SRA (De Greef and Hamers, 1994; Van Xong et al., 1998) impliquée dans la résistance au sérum humain chez *T. b. rhodesiense* et du gène codant pour la protéine TgsGP (Capewell et al., 2013; Uzureau et al., 2013) chez *T. b. gambiense*. Toutes ces caractéristiques font de *T. brucei brucei* un organisme modèle de choix dans l'étude des trypanosomes.

a. Le cycle parasitaire

Lors du repas sanguin sur l'hôte mammifère, la glossine va injecter dans le sang de l'hôte la forme métacyclique infectieuse du parasite, pré-adaptée à l'environnement de l'hôte. Ces parasites, vont ensuite se différencier en forme sanguine trypomastigote appelée « long slender » pour longue et mobile. Cette forme est une forme proliférative qui se multiplie dans le sang et la lymphe. Ensuite, les « long slender » se différencient en trypomastigotes courts et trapus appelés « short stumpy ». Ces derniers n'ont pas la capacité de se diviser et pourront être ingérés par une mouche tsé-tsé lors de son repas sanguin. Du fait du changement



- | | |
|----------------------------------|------------------------------|
| 1. Nucleus | 7. Lysosome |
| 2. Kinetoplast | 8. Endosomes |
| 3. Flagellar pocket | 9. Mitochondrion |
| 4. Basal body and probasal body | 10. Microtubule cytoskeleton |
| 5. Axoneme and paraflagellar rod | 11. Glycosomes |
| 6. Golgi | |

Figure 6 : Architecture de *Trypanosoma brucei*.

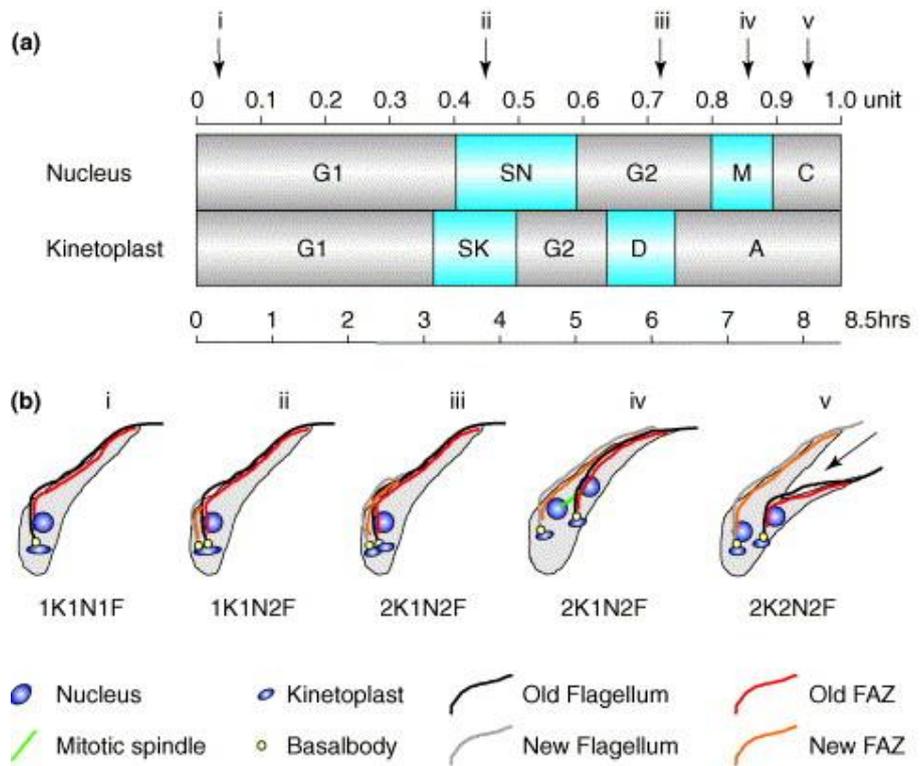
Schéma de l'organisation cellulaire de *T. brucei*. Issu de : Matthews KR., « The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei* », 2005.

d'environnement entre le sang de l'hôte et l'intestin de la glossine, les trypanosomes « short stumpy » ingérés par la mouche vont se différencier en formes procycliques capables de se multiplier. Les formes procycliques migrent ensuite vers le pro-ventricule où elles se différencient en longs trypanosomes. Ces derniers migrent ensuite vers les glandes salivaires où ils se différencient en épimastigotes, une forme proliférative. Cette forme est caractérisée par le passage du kinétoplaste vers l'extrémité antérieure par rapport au noyau. Dans les glandes salivaires, les épimastigotes vont se différencier en formes métacycliques (le kinétoplaste repasse du côté postérieur), pré-adaptées à l'environnement de l'hôte et qui pourront être injectées avec la salive lors du prochain repas de la glossine (Figure 5) (Langousis and Hill, 2014). Ce cycle parasitaire entraîne une dissémination importante de la maladie au sein des populations exposées.

b. Le cycle de division cellulaire

Parmi les différentes formes du parasite capables de se multiplier, deux sont cultivées au laboratoire : la forme sanguine trypanosome « long slender » présente chez l'hôte mammifère et la forme procyclique trypanosome retrouvée dans l'intestin de la mouche tsé-tsé. Toutes deux prolifèrent par division binaire : à partir d'une cellule, deux cellules sont générées (Hamarton et al., 2007b). Comme les cellules eucaryotes, *T. brucei* suit un cycle de division cellulaire classique : phase G1, suivie de la phase S (duplication de l'ADN), suivie de la phase G2, puis de la mitose et enfin de la cytodierèse. Mais il possède aussi des étapes qui lui sont propres.

Au stade G1 chaque parasite possède les différentes structures et organites en une copie unique : kinétoplaste, noyau, mitochondrie, flagelle, corps basaux mature et immature, appareil de Golgi, poche flagellaire et son collier, etc (Figure 6). Au cours de la division chaque élément doit être dupliqué et doit ségréger pour donner naissance à deux nouvelles cellules. Chez la forme procyclique cette division dure entre 8 et 9 heures, et chez la forme sanguine elle est comprise entre 6 et 7 heures. Il faut savoir que les divisions du kinétoplaste et du noyau sont orchestrées de manière indépendante mais synchronisée (Woodward and Gull, 1990) (Figure 7).



Current Opinion in Microbiology

Figure 7 : Cycle cellulaire de la forme procyclique de *Trypanosoma brucei*.

A. Chronologie de la division cellulaire. La réplication du kinétoplaste et celle du noyau sont indépendantes. Celle du kinétoplaste (SK) commence avant celle du noyau (SN) et est plus courte. Ce qui implique que la ségrégation des kinétoplastes (D) a lieu avant celle des noyaux (M). **B.** Schéma d'une cellule à différents stades de la division. N = noyau, K = kinétoplaste et F = flagelle. Issu de : McKean PG., « Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei* », 2003.

L'initiation de la division cellulaire est régulée par de nombreuses cyclines, phosphatases et kinases. En effet, il a été montré que les cyclines CYC2 et CYC4 ainsi que les kinases CRK1 et CRK2 ont un rôle dans la transition entre la phase G et la phase S. En leur absence la cellule est bloquée en phase G1 (Hammarton, 2007). La première étape consiste en la maturation et l'élongation du corps basal immature, faisant intervenir : les protéines γ -tubuline, *TbCentrines* (Selvapandiyar et al., 2012), NRKC (NIMA related kinase) (Pradel et al., 2006) et *TbPLK* (polo-like kinase) (Graffenried et al., 2008; Hammarton et al., 2007a; Ikeda and Graffenried, 2012). Au même moment, un nouveau quartette de microtubules associé à ce corps basal est généré. En parallèle la duplication du kinétoplaste débute. La ségrégation des corps basaux nécessite la translation du nouveau corps basal du côté antérieur vers l'extrémité postérieure (Lacomble et al., 2010). Ce mouvement pourrait également permettre la génération de deux poches flagellaires qui se sépareraient durant la ségrégation des corps basaux. A la suite de la duplication des corps basaux, on observe l'initiation de l'élongation du nouveau flagelle ainsi que la duplication de l'appareil de Golgi qui nécessite la présence de *TbCentrine2* (He et al., 2005). A ce stade, les cellules possèdent deux kinétoplastes et un noyau, elles sont notées 2K1N. Les cellules entrent alors en phase S et commencent la duplication de l'ADN nucléaire. Pendant ce temps, l'élongation du nouveau flagelle se poursuit le long de l'ancien *via* un lien appelé « flagellar connector » (Briggs et al., 2004a) qui permet de le guider. Au même moment il y a formation de la FAZ (Flagellar Attachment Zone) associée au flagelle. Les cellules entrent ensuite en phase G2 durant laquelle CRK3 et CRK9 ainsi que les cyclines CYC2, CYC6 et CYC8 induisent la transition vers la phase M qui est la mitose. Cette dernière étape se déroule sans disparition de l'enveloppe nucléaire (Ersfeld, 2011). A la fin de la mitose, les cellules possèdent deux noyaux et deux kinétoplastes et sont notées 2K2N (Figure 7).

Pour donner naissance aux deux cellules 1K1N, une étape appelée cytodièrese (séparation des cellules) est nécessaire. Elle débute au niveau de l'extrémité antérieure du nouveau flagelle et se poursuit de manière unidirectionnelle jusqu'à l'extrémité postérieure (Figure 7). Chez la forme procyclique, contrairement à la forme sanguine, il n'existe pas de point de contrôle permettant de réguler la cytodièrese en cas d'inhibition de la mitose (Hammarton et al., 2003). De plus, l'inhibition de la mitose n'inhibe pas la duplication ni la ségrégation des kinétoplastes,

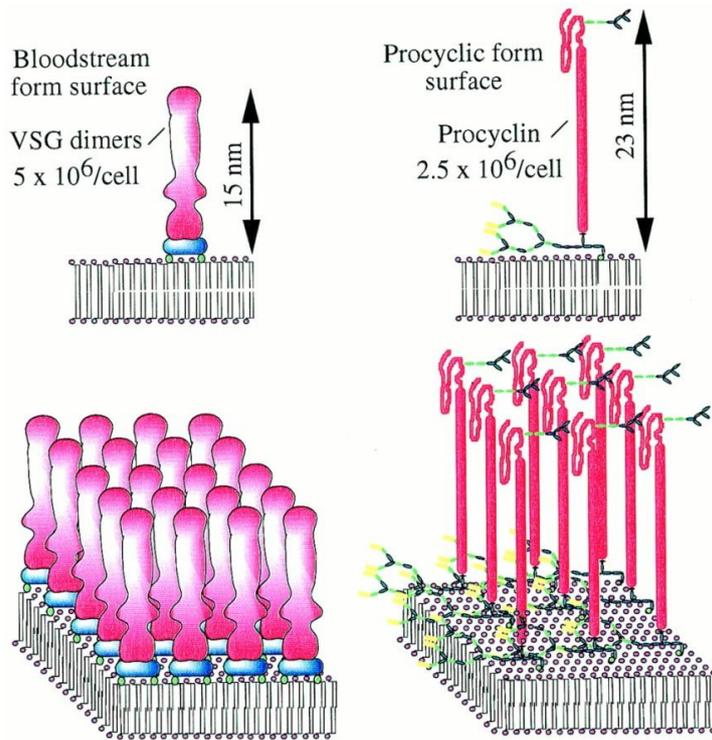


Figure 8 : Antigènes de surface.

Représentation schématique des protéines de surface majoritaires, retrouvées à la surface du parasite : le VSG pour les formes sanguines (à gauche) et la procycline pour les formes procycliques (à droite). Ces protéines sont ancrées à la membrane par une ancre GPI. Issu de : Ferguson MA., « Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness », 2000.

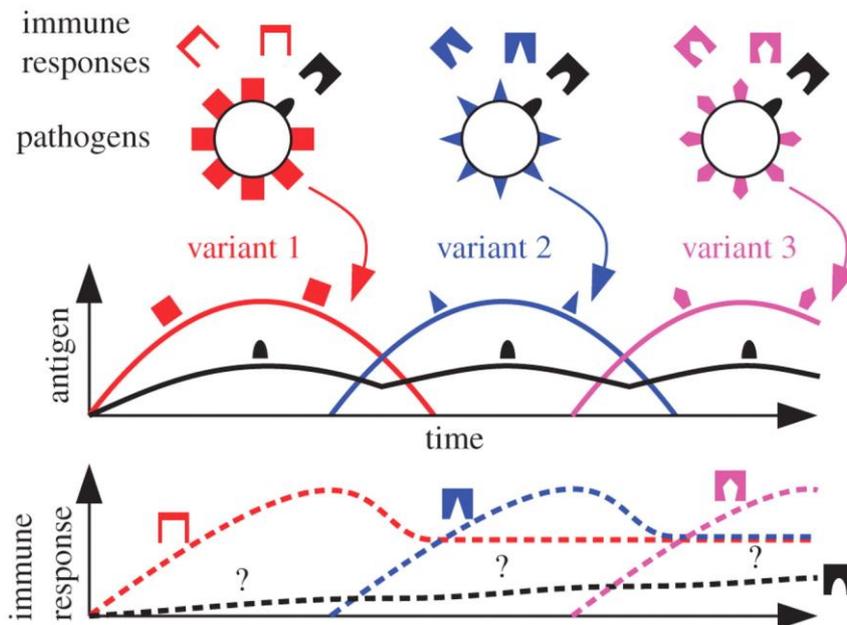


Figure 9 : Variation antigénique.

Lorsque l'hôte produit des anticorps dirigés contre le VSG exprimé (carré rouge) on observe une diminution de la parasitémie. Un nouveau variant est alors exprimé à la surface du parasite (triangle bleu). Ce processus se répète sans cesse afin d'échapper au système immunitaire. Issu de : Johnson et coll., « How do antigenically varying pathogens avoid cross-reactive responses to invariant antigens ? », 2012.

ce qui peut mener à la formation de cellules possédant uniquement un kinétoplaste et pas de noyau. Elles sont appelées zoïdes ou 1K0N et n'ont pas la capacité de proliférer. Ce type de cellules est obtenu uniquement à partir des formes procycliques (Hammarton et al., 2003).

c. Protéines de surface et variation antigénique

Les formes du parasite présentes dans le sang des hôtes mammifères (formes sanguines « long-slender » et « short-stumpy ») ont la capacité de sans cesse modifier le manteau de glycoprotéines qui recouvrent leur surface par un phénomène de variation antigénique (Horn, 2014; Taylor and Rudenko, 2006; Weirather et al., 2012). Ce mécanisme permet au parasite d'échapper au système immunitaire de l'hôte mammifère. Le manteau de ces formes est constitué d'environ 10 millions de copies identiques d'une glycoprotéine de surface appelée VSG pour « Variant Surface Glycoprotein » (Cross, 1990) (Figure 8). Cette protéine, très immunogène, d'une taille comprise entre 400 et 450 acides aminés, est insérée sous forme d'homodimère dans la membrane plasmique *via* une ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (Ferguson, 1999) liée en C-terminal (Figure 8). Son domaine N-terminal est très variable et contient les épitopes reconnus par les anticorps de l'hôte. Cependant leur structure reste inchangée d'un VSG à l'autre. Les VSG à la surface sont recyclées toutes les 12 minutes environ, ce qui permet d'internaliser et détruire les complexes VSG-anticorps et de redistribuer des VSG « libres » à la surface (Engstler et al., 2004). Cependant ce processus n'est pas suffisant pour échapper au système immunitaire de l'hôte. C'est alors qu'intervient la variation antigénique (Horn, 2014; Taylor and Rudenko, 2006; Weirather et al., 2012) (Figure 9). En effet, *T. brucei* possède un répertoire de plus de 1500 gènes et pseudo-gènes codant pour les VSG (80-90% sur les 11 grands chromosomes, le reste sur les chromosomes intermédiaires et les minichromosomes) et peut donc changer le variant exprimé à sa surface grâce à des remaniements dans le génome. Un seul variant de VSG est exprimé à la fois à la surface du parasite. On observe alors des pics de parasitémie qui sont corrélés avec l'apparition d'un nouveau variant à la surface des parasites (Figure 9). En effet, la nouvelle population n'étant pas encore reconnue par les anticorps circulants, le parasite peut se multiplier.

C'est à cause de ce phénomène de variation antigénique que la création d'un vaccin est compromise. Ajouté au fait que les traitements actuels sont difficiles à mettre en place et présentent une grande toxicité, il paraît urgent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer de nouveaux médicaments.

A la surface des formes présentes chez l'insecte vecteur (excepté la forme métacyclique qui est recouverte de VSG) on retrouve un manteau de procyclines (Figure 8) présentes en 5.10^6 copies, qui ont un rôle dans la protection du parasite contre l'environnement du tube digestif (Roditi et al., 1998) mais qui ne sont pas impliquées dans un phénomène de variation antigénique. Tout comme les VSG elles sont ancrées à la membrane *via* une ancre GPI (Ferguson, 1999). Deux formes de procyclines co-exprimées à la surface du parasite existent :

- EP composée de répétitions du dipeptide « acide glutamique – proline »,
- GPEET composée de répétitions du penta-peptide « glycine – proline – acide glutamique – acide glutamique – thréonine ».

Les gènes codants pour ces protéines sont transcrits par l'ARN polymérase I. Il en existe 3 codants pour la forme EP et un pour la forme GPEET (Roditi et al., 1998).

d. Le génome

Trypanosoma brucei est un organisme diploïde dont le matériel génétique est contenu dans deux structures : le noyau et le kinétoplaste.

i. Le génome nucléaire

Le matériel génétique nucléaire de *T. brucei*, d'environ 35 Mb, est composé de plus d'une centaine de chromosomes classés en 3 groupes en fonction de leur taille : 11 grands chromosomes de 1 à 6 Mb, des chromosomes intermédiaires de 200 à 900 kb et une centaine de minichromosomes de 50 à 150 kb (Ersfeld et al., 1999; Van der Ploeg et al., 1984). Les 11 grands chromosomes ont été entièrement séquencés en 2005 (Berriman et al., 2005a) et codent pour près de 10 000 gènes

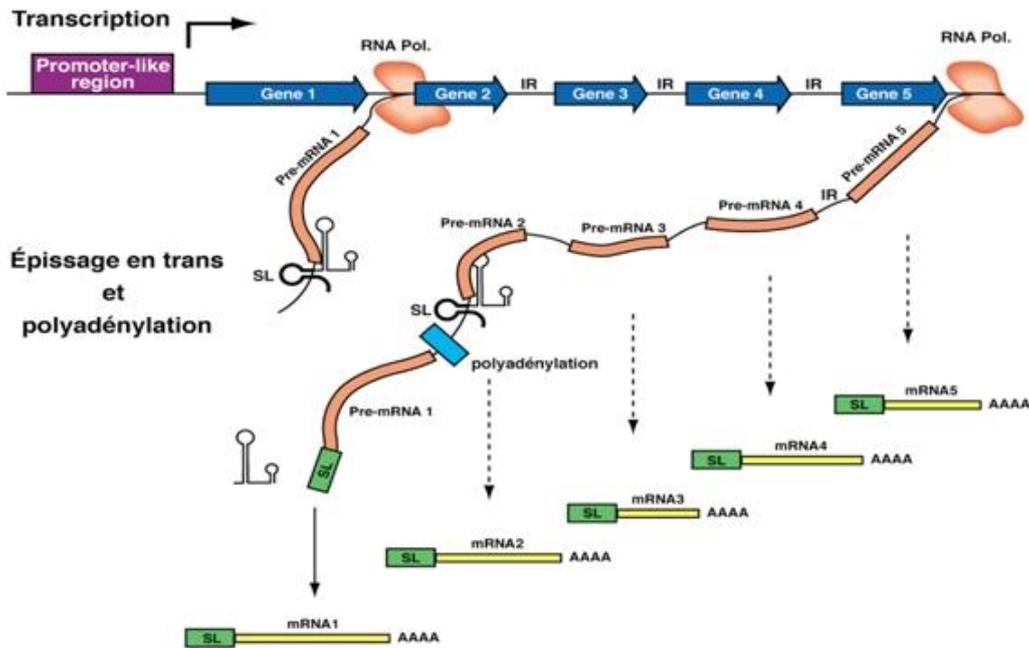


Figure 10 : Mécanisme de *trans*-épissage.

La transcription des gènes par l'ARN polymérase II donne naissance à de longs pré-ARNm. La maturation des ARNm se fait dans un premier temps par l'ajout en 5' de la coiffe SL (spliced leader) de 39 nucléotides, suivi d'une polyadénylation par ajout d'une queue poly-A en 3'.

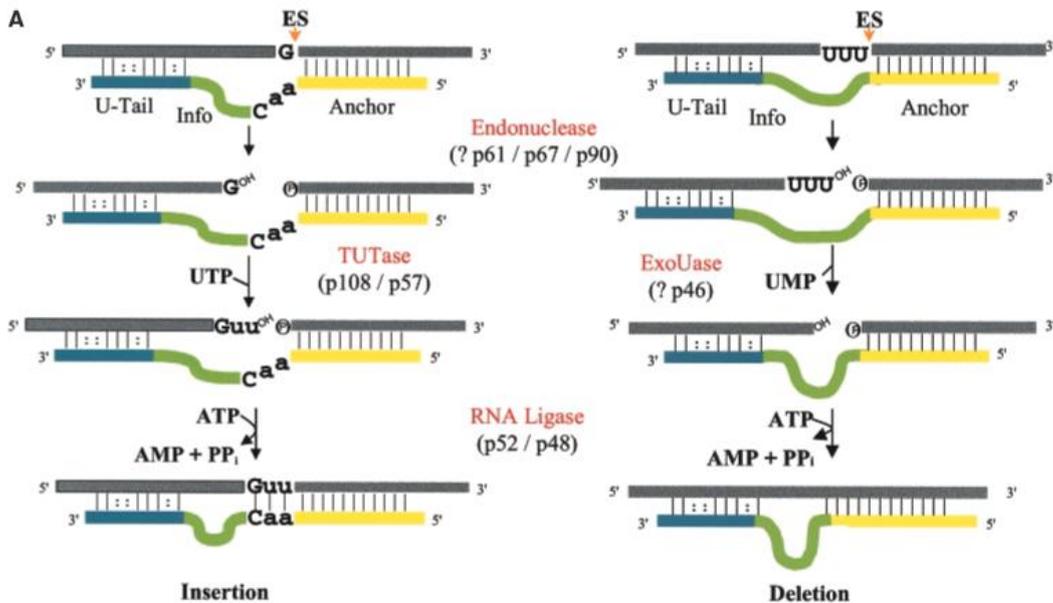


Figure 11 : Mécanisme de correction des ARN (RNA editing).

Les ARNg (brin du bas) reconnaissent et se fixent sur les pré-ARNm (brin du haut). Le pré-ARNm est clivé par une endonucléase et des résidus U sont ajoutés par une TUTase (gauche) ou délévés par une 3'-exoUase (droite). Pour finir, le pré-ARNm est reliqué par une ARN ligase. Issu de : Stuart et coll., « RNA editing: complexity and complications », 2002.

dont environ 900 pseudo-gènes et 1700 gènes spécifiques de *T. brucei*. Ces gènes sont contenus dans la partie centrale des mégachromosomes alors que les régions sous-télomériques contiennent les sites d'expression des antigènes de surface ou VGS (Variable Surface Glycoprotein) (Berriman et al., 2005a). Chez les chromosomes intermédiaires, les régions sous-télomériques sont composées de répétitions de 177 pb (Wickstead et al., 2004). Ils contiennent également des sites d'expression des VSG (Van der Ploeg et al., 1984). Les minichromosomes eux sont composés de séquences répétées de 177 pb à structure palindromique. On y retrouve des éléments sous-télomériques non répétés incluant des pseudogènes de VSG (Wickstead et al., 2004).

Classiquement, les cellules eucaryotes possèdent 3 classes d'ARN polymérases : l'ARN polymérase I impliquée dans la synthèse des ARN ribosomiaux (ARNr), l'ARN polymérase II dans celle des ARN messagers (ARNm) et l'ARN polymérase III dans celle des ARN de transfert (ARNt).

Chez *T. brucei*, les gènes sont organisés de façon polycistronique (transcription de plusieurs gènes sur un même transcrit d'ARN) et sont pour la plupart transcrits par l'ARN polymérase II (De Gaudenzi et al., 2011). De plus, chez ce parasite, contrairement à la plupart des eucaryotes, les gènes codant pour des protéines ne possèdent pas d'introns (De Gaudenzi et al., 2011) à l'exception du gène codant pour l'ARN polyA polymérase (Mair et al., 2000). Leur transcription conduit à la formation de pré-ARNm polycistroniques qui vont être maturés par un mécanisme de *trans*-épissage (Agabian, 1990). Lors de ce processus, une coiffe de 39 nucléotides appelée « spliced leader » ou séquence SL est ajoutée en 5' du pré-ARNm (Ullu and Tschudi, 1991). Dans le même temps une queue polyA est ajoutée en 3' de façon à former les ARNm matures (Figure 10).

Les gènes qui ne sont pas transcrits par l'ARN polymérase II le sont soit par l'ARN polymérase I qui transcrit les messagers des VSG et de la procycline ainsi que des sous-unités des ARN ribosomiaux (Zomerdiijk et al., 1991), soit par l'ARN polymérase III qui transcrit des sous-unités d'ARN ribosomiaux ainsi que les ARN de transfert (Fantoni et al., 1994).

ii. Le génome mitochondrial : le kinétoplaste

L'ADN mitochondrial est contenu au sein d'une structure appelée kinétoplaste. Il est composé de milliers de molécules d'ADN circulaire compactées réparties en deux groupes : les minicercles et les maxicercles (Liu et al., 2005; Shapiro and Englund, 1995). Les minicercles d'une taille comprise entre 0,5 et 2,5 kb sont entre 5 000 et 10 000. Ils codent pour de petits ARN guides (ARNg) qui servent de matrice pour le mécanisme de correction des ARN ou « RNA editing » (Stuart and Panigrahi, 2002). Les 30 à 50 maxicercles de 20 à 40 kb codent pour des ARN ribosomiaux (ARNr) ainsi que pour les sous-unités du complexe respiratoire mitochondrial (Shapiro and Englund, 1995).

Le mécanisme de correction des ARN (Figure 11) est un processus de modifications post-transcriptionnelles des pré-ARNm qui consiste en l'insertion ou la délétion de résidus uridine au sein des pré-ARNm codés par les maxicercles (Stuart and Panigrahi, 2002). Ceci a pour but de créer des cadres ouverts de lecture ou ORF (Open Reading Frame) complets car sur les maxicercles beaucoup de gènes ne possèdent pas d'ORF fonctionnels.

e. Architecture cellulaire

Trypanosoma brucei est un organisme unicellulaire mono-flagellé. D'une structure allongée (20-25 μm de long sur 3-5 μm de large pour la forme procyclique et 15 μm de long sur 2 μm de large pour la forme sanguine), il possède plusieurs organites uniques, organisées de façon structurée entre l'extrémité postérieure et le noyau du parasite (Figure 6).

i. Le cytosquelette

Le cytosquelette est un ensemble de réseaux impliqués dans de multiples fonctions. En effet, il joue un rôle dans la forme de la cellule, la division cellulaire, le transport intracellulaire ainsi que dans le mouvement des cellules. Ce constat en fait une cible thérapeutique potentielle. Pour ces raisons, l'équipe au sein de laquelle j'ai

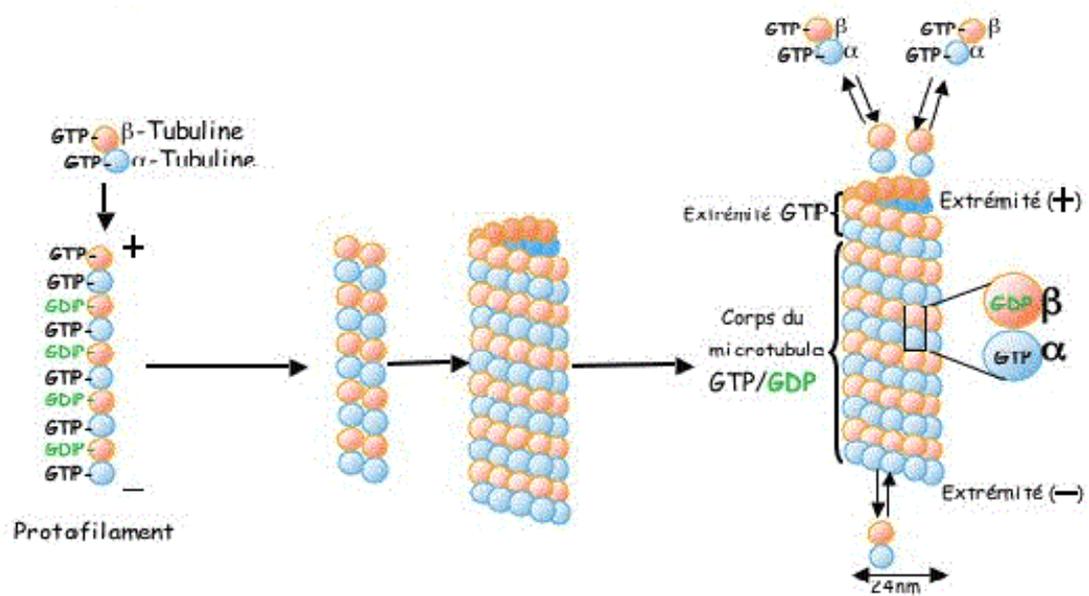


Figure 12 : Les microtubules.

Mécanisme d'assemblage des microtubules. Les tubulines α et β liées au GTP s'assemblent en hétérodimères. Ces dimères s'assemblent pour former des protofilaments qui eux même s'associent au nombre de 13 pour former les microtubules.

réalisé ma thèse s'intéresse à la biogenèse du cytosquelette chez *Trypanosoma brucei*.

Chez les Eucaryotes, trois types de réseaux existent : les microtubules (polymères de tubulines) (Mayer and Jürgens, 2002), les filaments d'actine (polymères d'actine) (Berepiki et al., 2011) et les filaments intermédiaires (Goldman et al., 2012) (polymères de protéines fibrillaires). Seuls les microtubules sont présents chez *T. brucei*. En effet, dans le génome il existe des gènes codant pour la tubuline (Berriman et al., 2005b) et pour l'actine (Amar et al., 1988) mais pas pour les filaments intermédiaires. Cependant aucune forme d'actine polymérisée n'a été observée chez ce parasite (Gull, 1999).

1. Les microtubules et les MAPs

Dans le cas de *T. brucei*, plusieurs copies en tandem des gènes codant pour les tubulines α et β sont présentes dans le génome et sont regroupées en cluster (Seebeck et al., 1983)(Ersfeld et al., 1998). On retrouve chez ce parasite des microtubules au niveau du corset sous-pelliculaire, du flagelle et des corps basaux mais aussi au niveau de la zone d'attachement du flagelle (FAZ) et du fuseau mitotique.

Les microtubules sont des polymères formés de 13 protofilaments eux-mêmes formés d'hétérodimères de tubuline α et β . L'assemblage des microtubules débute d'abord par la formation des dimères de tubuline α et β chacune associée au GTP. Les hétérodimères de tubulines s'associent ensuite tête-bêche de façon à former les protofilaments. Le GTP des tubulines β uniquement est alors hydrolysé en GDP et les protofilaments s'associent entre eux pour former les microtubules (Howard and Hyman, 2003). Cet assemblage forme des cylindres creux dynamiques, capables de s'allonger ou de se raccourcir (Figure 12). La croissance des microtubules se fait par l'extrémité positive qui est extrêmement dynamique, et les microtubules nouvellement formés sont caractérisés par la présence de tyrosinations (Howard and Hyman, 2003). Les microtubules peuvent subir d'autres modifications post-traductionnelles (Gull, 1999; Janke and Chloë Bulinski, 2011) telles que : l'acétylation

de la tubuline α (microtubules stables), la détyrosination de la tubuline α (« vieux » microtubules) ou la glutamylation et la glycylation des tubulines α et β .

Une autre tubuline est trouvée chez *T. brucei* : la tubuline γ , un marqueur du centre d'organisation des microtubules (MTOC). C'est donc logiquement qu'on la retrouve au niveau des corps basaux chez ce parasite. Elle apparaît également sous forme d'un point dans le noyau et dans les cellules en mitose, ce point se duplique et on observe cette tubuline sur le fuseau mitotique (Gull, 1999; Kohl and Gull, 1998).

On retrouve également des protéines associées aux microtubules (MAPs) qui peuvent être structurales et ainsi jouer un rôle dans la stabilisation ou la déstabilisation des microtubules (Gull, 1999; Kohl and Gull, 1998). Chez *T. brucei*, certaines sont spécifiques du corset sous-pelliculaire, elles permettent de créer un lien entre les microtubules ou entre les microtubules et la membrane plasmique, c'est le cas de :

- CAP15 (*Tb11.01.7880*) et CAP17 (*Tb11.01.3805*) sont localisées au niveau du corset sous-pelliculaire, excepté à l'extrémité postérieure. Quand elles sont exprimées dans des cellules mammifères elles stabilisent les microtubules traités au froid ou au nocodazole (Vedrenne et al., 2002).
- MARP-1 (*Tb927.10.10360*) et MARP-2 (*Tb927.10.10280*) contiennent des domaines répétés de 38 acides aminés. Cependant ces répétitions ne sont pas impliquées dans la liaison aux microtubules, qui est assurée par une région sans répétitions en C-terminal. Ces protéines sont connues pour stabiliser les microtubules (Affolter et al., 1994).
- WCD (*Tb927.7.3550*) possède un domaine C2 (domaine capable de lier le calcium) en N-terminal et 5 répétitions de 32 acides aminés en C-terminal. Ces répétitions sont impliquées dans la liaison aux microtubules. Cette protéine est localisée entre la membrane plasmique et le corset de microtubules. Elle pourrait jouer un rôle dans la liaison entre ces deux éléments (Baines and Gull, 2008).
- Gb4 (*Tb09.160.1200*) est exclusivement retrouvée à l'extrémité postérieure des microtubules composant le corset. Il semblerait que Gb4 forme une coiffe sur ces microtubules (Rindisbacher et al., 1993).
- I/6 (*Tb927.7.3440*) est composée de 6 régions répétées de 8 acides aminés ainsi que d'un domaine EF-hand identifié comme non fonctionnel. Cette

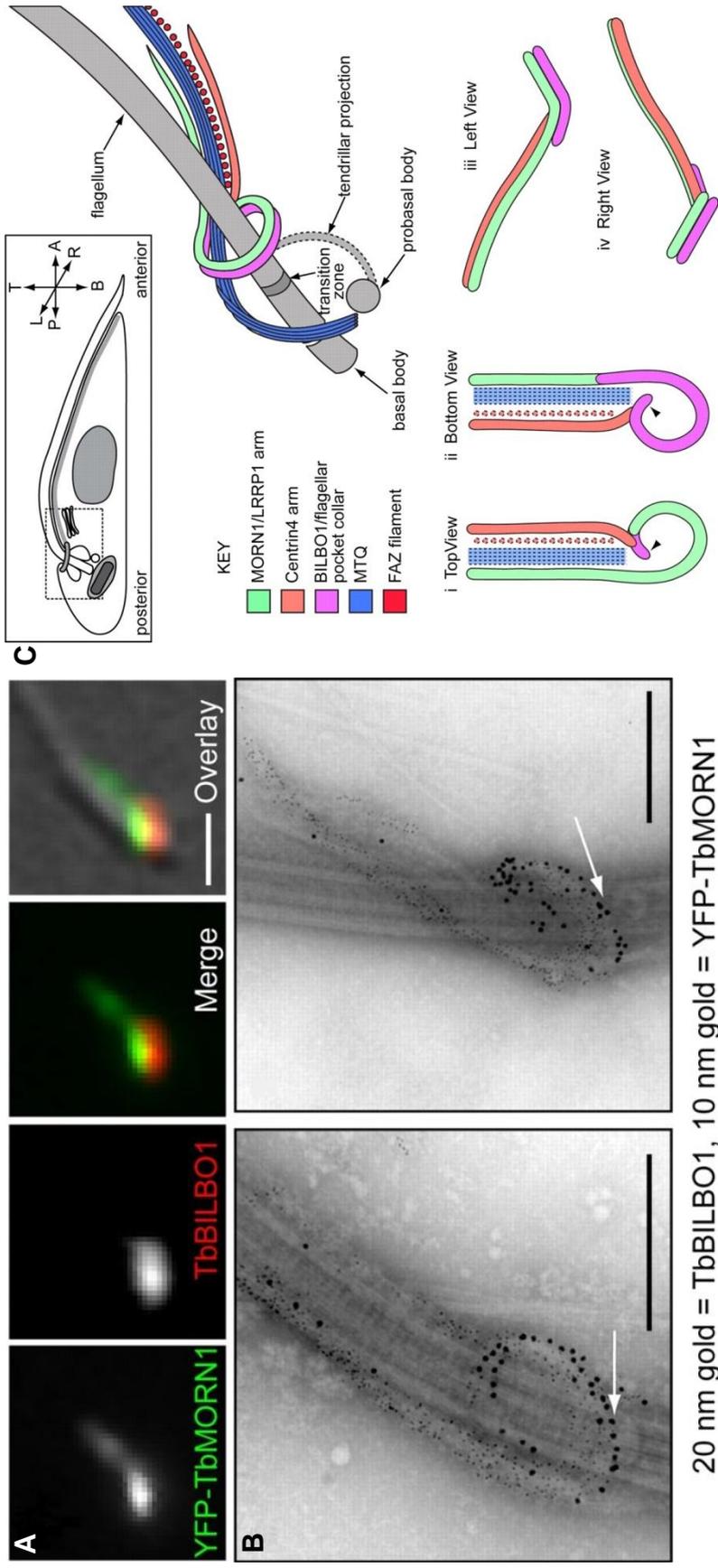


Figure 13 : Colocalisation partielle entre le bilobe et BILBO1.

A. Immuno-marquage de flagelles de la lignée YFP::TbMORN1, marqués avec les anticorps anti BILBO1 (rouge) et anti-GFP (vert). On observe une colocalisation partielle entre les deux marquages. **B.** Immuno-marquage de flagelles de la lignée YFP::TbMORN1, marqués avec les anticorps anti-BILBO1 (billes de 20 nm) et anti-GFP (billes de 10 nm). L'observation en microscopie électronique révèle une colocalisation partielle entre les deux protéines. **C.** Schéma de la position du bilobe par rapport aux autres composants du cytosquelette : le collier de la poche flagellaire (rose), le quartette de microtubules (MTQ, bleu) et le filament de la FAZ (rouge). Issu de : Esson et coll., « Morphology of the Trypanosoma Bilobe, a Novel Cytoskeletal Structure », 2012.

protéine est localisée sur les connexions entre les microtubules du corset sous-pelliculaire, dans lesquelles elle semble impliquée (Detmer et al., 1997).

- p15A est composée de 16 répétitions. Elle est codée par un gène présent en multiples copies dans le génome. Cette famille de protéines est spécifique des trypanosomes et peut lier à la fois la tubuline et les phospholipides. Elle pourrait donc participer à la stabilisation du corset sous-pelliculaire (Rasooly and Balaban, 2002).

D'autres MAPs ont un rôle dans la stabilisation de l'axonème. Ce qui est par exemple le cas de *TbSAXO*, un homologue de MAP6 (Dacheux et al., 2012). Les protéines MAP6 sont connues pour stabiliser les microtubules après traitement au nocodazole ou au froid.

Il existe aussi des MAPs motrices : la kinésine et la dynéine, capables de se déplacer sur les microtubules pour transporter divers « cargos¹ » (Marx et al., 2005).

2. L'actine

Bien que des gènes codant pour l'actine soient présents chez *T. brucei*, aucun filament d'actine n'est présent dans le cytoplasme des parasites (Gull, 1999). Cependant, chez la forme sanguine, l'actine est localisée au niveau de la poche flagellaire où elle joue un rôle essentiel dans l'endocytose (García-Salcedo et al., 2004). Cette fonction la rend essentielle à la survie de la forme sanguine alors qu'elle ne l'est pas pour la forme procyclique (García-Salcedo et al., 2004).

3. Le bilobe

Le bilobe est une structure du cytosquelette d'environ 2 µm qui comme son nom l'indique est composée de deux lobes (Esson et al., 2012). Il a été montré que cette structure est partiellement colocalisée avec l'anneau formé par BILBO1 (collier de la poche flagellaire) (Gheiratmand et al., 2013) (Figure 13). Quatre protéines sont

¹ Le terme « cargo » est utilisé dans ce manuscrit pour désigner les « charges » transportées par les kinésines et les dynéines.

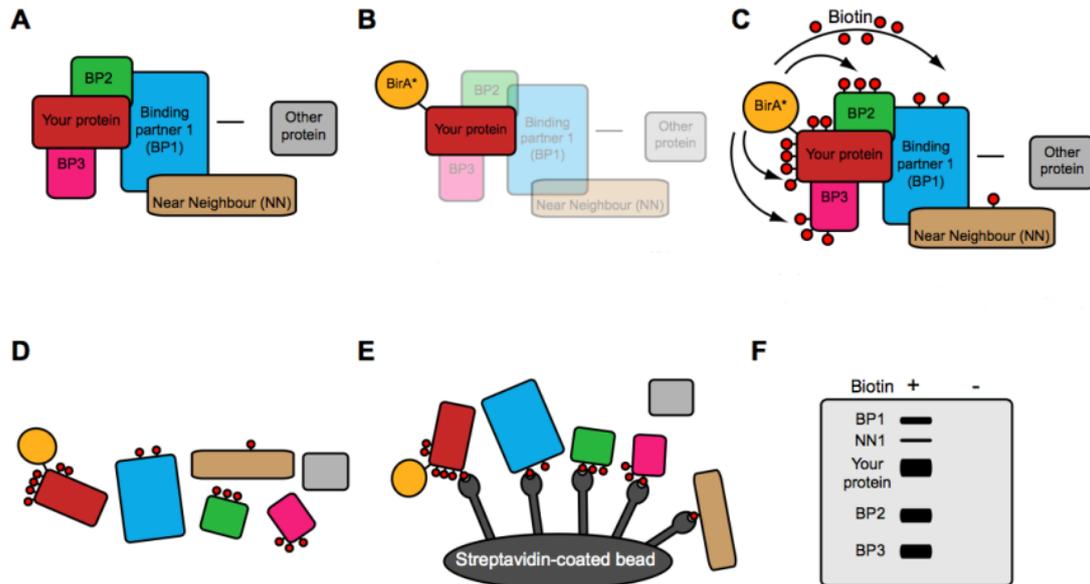


Figure 14 : Système BiOId.

A. Protéine d'intérêt (rouge) dans un complexe. **B.** La protéine d'intérêt est étiquetée avec BirA*. **C.** Incubation avec un excès de biotine. Biotinylation des protéines proches de la protéine d'intérêt. **D.** Solubilisation des complexes protéiques. **E.** Purification d'affinité avec des billes conjuguées à la streptavidine. **F.** SDS-PAGE suivi d'un blot avec la streptavidine couplée à la HRP. Issu de : Morriswood et coll., « Novel Bilobe Components in *Trypanosoma brucei* Identified Using Proximity-Dependent Biotinylation », 2013.

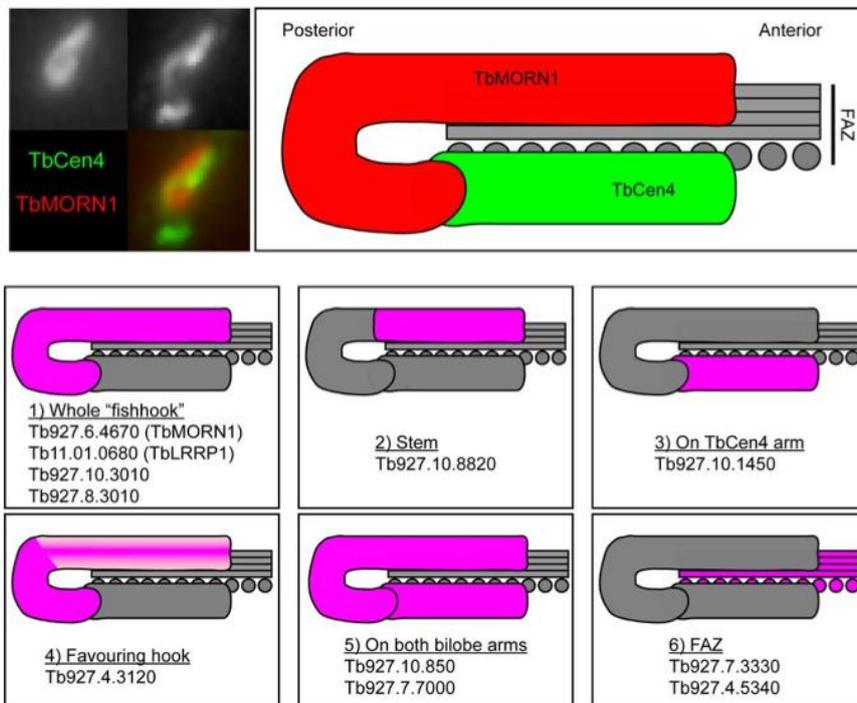


Figure 15 : Partenaires potentiels de *TbMORN1*.

Schéma résumant la localisation de partenaires potentiels de *TbMORN1* au bilobe, identifiés par la technique BiOId. Issu de : Morriswood et coll., « Novel Bilobe Components in *Trypanosoma brucei* Identified Using Proximity-Dependent Biotinylation », 2013.

connues comme faisant partie du bilobe : *TbMORN1*, *TbLRRP1*, *TbCentrin2* et *TbCentrin4*. *TbMORN1* et *TbLRRP1* font partie exclusivement du bilobe alors que *TbCentrin2* et *TbCentrin4* sont également retrouvées au niveau des corps basaux matures et immatures (Esson et al., 2012; Gheiratmand et al., 2013).

TbLRRP1 est une protéine contenant des domaines répétés riches en leucine en N-terminal et un domaine coiled-coil en C-terminal (Zhou et al., 2010). L'ARN interférence de cette protéine chez la forme procyclique entraîne une inhibition de la croissance, une inhibition de la duplication de l'appareil de Golgi, du collier de la poche flagellaire ainsi que celle de la FAZ et une diminution de motilité du parasite (Zhou et al., 2010). Chez les formes sanguines l'ARNi de cette protéine n'a pas été décrit.

La protéine *TbMORN1* contient 15 domaines répétés de type MORN (Membrane Occupation and Recognition Nexus) (Morriswood et al., 2009). Ces domaines sont impliqués dans des interactions avec les membranes. En effet, l'homologue de cette protéine chez *Toxoplasma gondii* jouerait un rôle dans la liaison entre le cytosquelette et la membrane plasmique (Gubbels et al., 2006). *TbMORN1* pourrait donc constituer un lien entre la membrane plasmique et le bilobe. L'ARNi de *TbMORN1* chez la forme procyclique du parasite entraîne une légère diminution de la croissance cellulaire alors que chez la forme sanguine l'ARNi est létal (Morriswood et al., 2009). Cependant chez la forme procyclique, il reste environ 20% de la protéine après induction, ce qui pourrait être suffisant pour maintenir la fonction de *TbMORN1* au sein de la cellule (Morriswood et al., 2009).

Plus récemment l'utilisation du système BioID (Figure 14) a permis de mettre en évidence sept nouvelles protéines présentes dans la région du bilobe : *Tb927.10.3010*, *Tb927.8.3010*, *Tb927.10.8820*, *Tb927.10.1450*, *Tb927.4.3120*, *Tb927.10.850* et *Tb927.7.7000* (Figure 15) (Morriswood et al., 2013). L'identification de ces protéines permet de diviser le bilobe en quatre sous-domaines : l'hameçon, la tige (ou partie antérieure de l'hameçon), le crochet (partie postérieure de l'hameçon) et le bras de *TbCentrin4* (Figure 15) (Morriswood et al., 2013).



Figure 16 : Le corset sous-pelliculaire.
Image en microscopie électronique du corset sous-pelliculaire de microtubules, qui assure le maintien de la structure cellulaire.

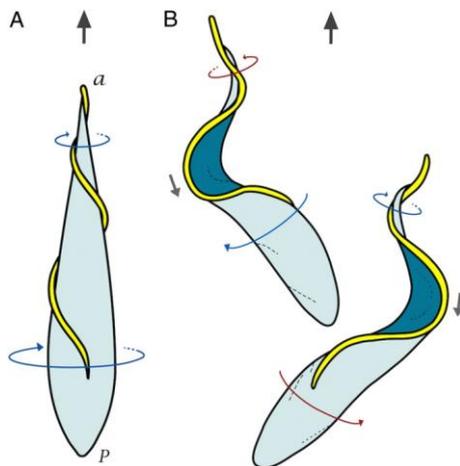


Figure 17 : Motilité de *Trypanosoma brucei*.
A. Modèle traditionnel : rotation du corps cellulaire dans le sens des aiguilles d'une montre, permettant le déplacement du parasite vers l'extrémité antérieure. **B.** Mouvement bi-hélical : le flagelle produit alternativement des mouvements de gauche à droite puis de droite à gauche. Ces mouvements se propagent de l'extrémité distale vers la base du flagelle. Issu de : Rodriguez et coll., « Propulsion of African trypanosomes is driven by bihelical waves with alternating chirality separated by kinks », 2010.

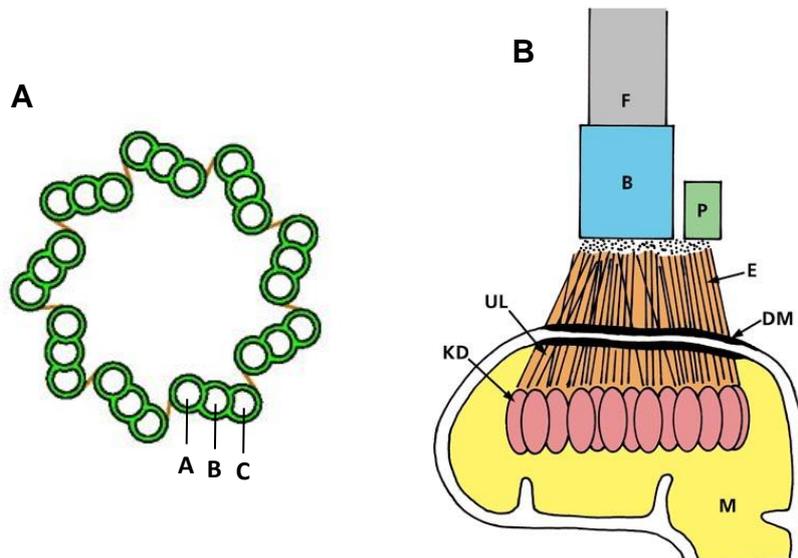


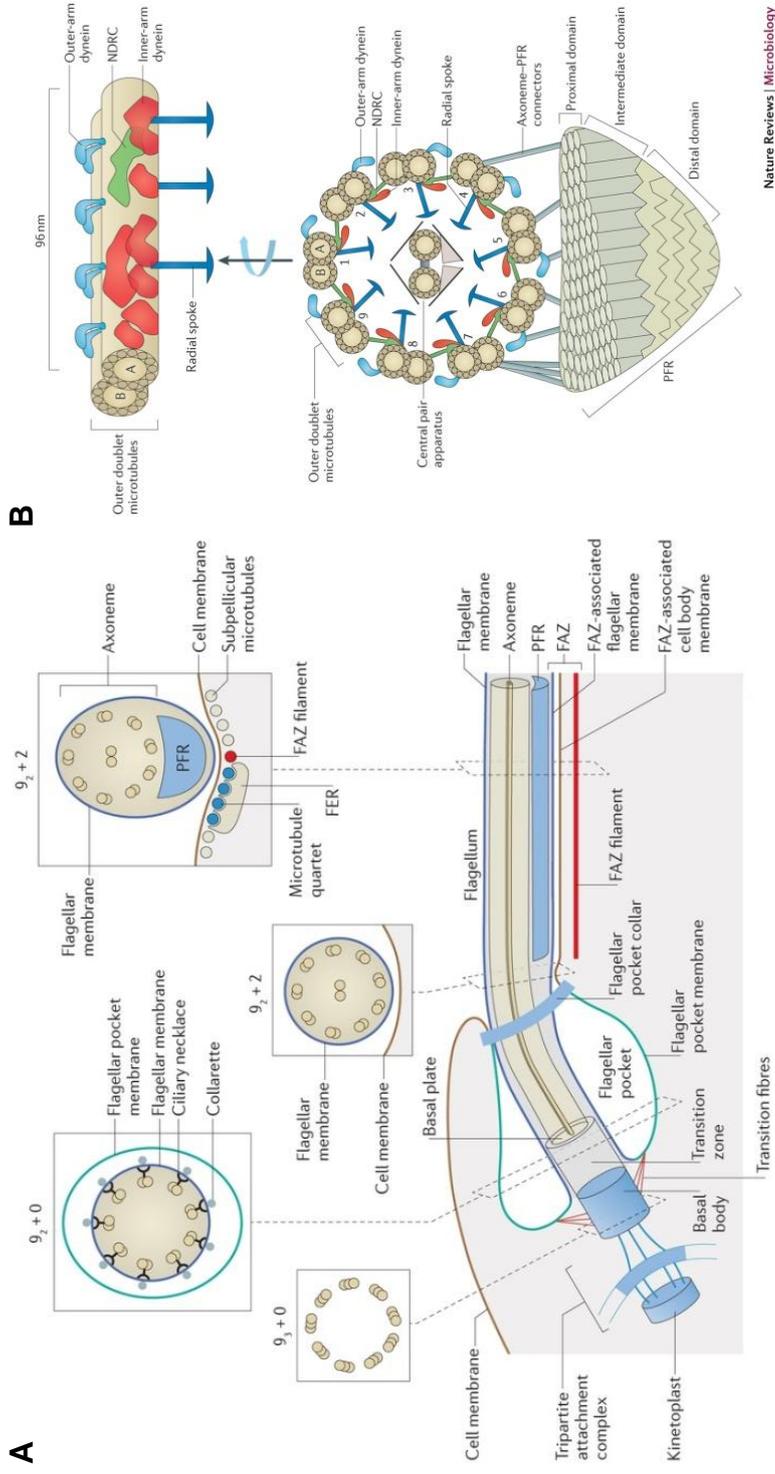
Figure 18 : Corps basal et Complexe d'attachement tripartite (TAC).
A. Schéma du corps basal, composé de 9 triplets de microtubules notés A, B et C. **B.** Schéma du complexe d'attachement tripartite qui permet la liaison entre les corps basaux et le kinétoplaste. F = flagelle, B = corps basal mature, P = corps basal immature, KD = kinétoplaste, M = mitochondrie, DM = membrane mitochondriale, E = filaments de la zone d'exclusion et UL = filaments unilatéraux. Issu de : « Tripartite Attachment Complex (TAC) », 2008.

4. Le corset sous pelliculaire

Sous la membrane plasmique on retrouve un corset de microtubules, plus de 100, espacés de 18-22 nm (Kohl and Gull, 1998) (Figure 16). Ces microtubules sont liés entre eux ainsi qu'à la membrane plasmique et possèdent tous la même polarité, soit leur extrémité positive située à l'extrémité postérieure du parasite (Robinson et al., 1995). Seule la membrane de la poche flagellaire n'est pas recouverte par ce réseau de microtubules. Ils assurent le maintien de la forme de la cellule.

5. Le flagelle

Trypanosoma brucei est un parasite dont l'unique flagelle (en phase G1) prend naissance au corps basal, émerge de la cellule par la poche flagellaire et reste attaché le long du corps cellulaire grâce à la zone d'attachement du flagelle aussi appelée FAZ (Flagellar Attachment Zone) (Gull, 1999; Kohl and Bastin, 2005). Le flagelle de ce parasite est composé de l'axonème mais aussi d'une structure extra-axonémale caractéristique des kinétoplastidés, appelée Paraflagellar Rod (PFR) (Gull, 1999; Kohl and Bastin, 2005). Il est essentiel au parasite car responsable de l'attachement du parasite à la surface de l'épithélium de l'hôte, par exemple il permet l'attachement aux glandes salivaires chez la mouche tsé-tsé (Tetley and Vickerman, 1985). Le flagelle est également responsable de la motilité du parasite. En effet, ses battements de l'extrémité distale vers les corps basaux permettent le déplacement du parasite de l'extrémité postérieure vers l'extrémité antérieure (à l'inverse de la plupart des organismes flagellés) (Hill, 2010; Koyfman et al., 2011) (Figure 17). *In vitro*, ce mécanisme modulé par le calcium permet à la cellule de parcourir entre 25 et 30 μm en une seconde. Le flagelle est également impliqué dans la morphogénèse (Kohl et al., 2003) et la division cellulaire (Kohl and Bastin, 2005; Ralston and Hill, 2008). Il pourrait aussi jouer un rôle de senseur des modifications de l'environnement (Kohl and Bastin, 2005; Ralston and Hill, 2008).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 19 : L'axonème de *Trypanosoma brucei*.
A. Structure de l'axonème. Des coupes montrent la composition de l'axonème depuis le corps basal jusqu'à la sortie du corps cellulaire. **B.** Structure de l'axonème associé à la PFR. Issu de : Langouis et coll., « Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei* », 2014.

a. Le corps basal

Le corps basal est le seul centre organisateur des microtubules (MTOC) présent chez *T. brucei*. Il est formé de 9 triplets de microtubules formant un cylindre et notés A, B et C (Gull, 1999; Pearson and Winey, 2009) (Figure 18). Le microtubule A est complet alors que B et C sont incomplets. Ce sont ces triplets qui vont permettre la formation des doublets retrouvés dans l'axonème. En effet, c'est le site de nucléation des microtubules de l'axonème mais aussi celui du quartette de microtubules qui fait partie de la FAZ. On l'appelle corps basal mature. Il existe aussi un corps basal immature qui au cours du cycle cellulaire subira une maturation afin de donner naissance à l'axonème du nouveau flagelle.

Chez *T. brucei*, les corps basaux sont physiquement liés au kinétoplaste (ADN mitochondrial) *via* le complexe d'attachement tripartite ou TAC (Tripartite Attachment Complex) (Zhao et al., 2008) (Figure 18). Cette connexion nécessite un lien étroit entre le corps basal, les membranes externe et interne de la mitochondrie et le kinétoplaste (Bonhivers et al., 2008a). Cependant, la composition du complexe TAC reste mal connue. La première protéine de ce complexe à avoir été identifiée est la protéine p166 (Zhao et al., 2008). Elle jouerait un rôle dans la ségrégation des kinétoplastes. Plus récemment, d'autres protéines, TAC40 (Schnarwiler et al., 2014) et p197 (Gheiratmand et al., 2013) ont également été décrites comme composants du complexe TAC.

Les corps basaux ont aussi un rôle dans l'ancrage des protéines impliquées dans le transport intraflagellaire ou IFT (Intraflagellar Transport) (Reiter et al., 2012).

b. L'axonème

L'axonème du flagelle de *T. brucei* est un axonème conventionnel composé de 9 doublets de microtubules et d'une paire centrale « 9+2 » (Kohl and Bastin, 2005) (Figure 19). Au niveau de la zone de transition, les deux microtubules les plus internes de chaque triplet du corps basal mature vont former les 9 doublets de l'axonème. Les doublets sont composés d'un microtubule de 13 protofilaments (noté A) et d'un second microtubule contenant 11 protofilaments (noté B), tous deux connectés par des ponts de nexine (Downing and Sui, 2007). Les bras internes et

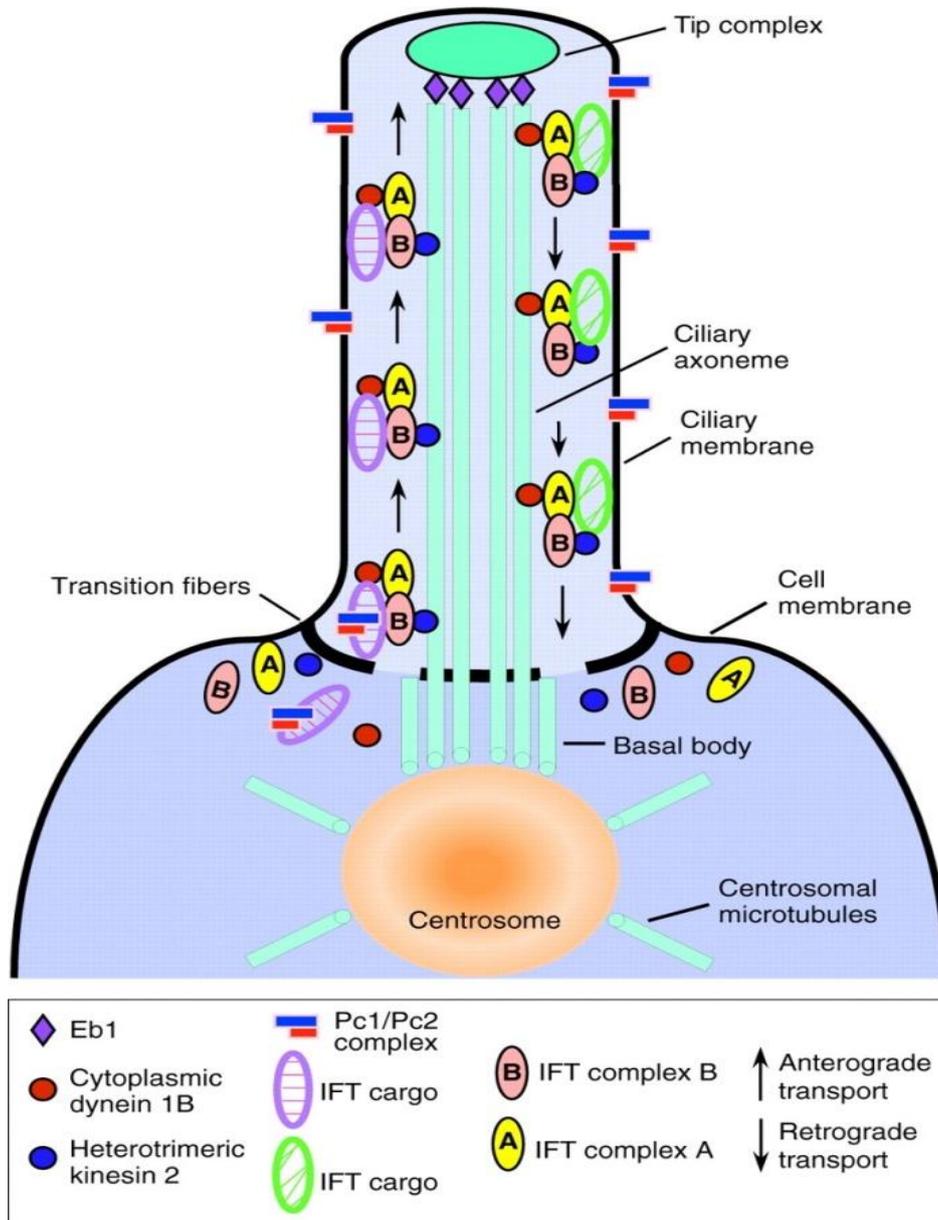


Figure 20 : Transport intraflagellaire (IFT).

La kinésine-2 assure le transport antérograde permettant l'acheminement du complexe B à la pointe du flagelle. La dynéine cytoplasmique DHC-1b quant à elle assure le transport inverse, transport rétrograde, qui permet le recyclage au corps basaux *via* le complexe A. Issu de : Bisgrove et coll., « The roles of cilia in developmental disorders and disease », 2006.

externes de dynéines sont associés au microtubule A. La dynéine est un complexe protéique moteur qui par hydrolyse de l'ATP, peut se déplacer sur les microtubules et ainsi mouvoir différents « cargos ». Dans l'axonème, les bras de dynéines assurent les glissements des doublets l'un contre l'autre permettant le battement du flagelle. L'absence de ces bras de dynéines rend le flagelle immobile (Lindemann and Lesich, 2010; Ralston et al., 2011). On retrouve aussi, associé au tubule A, des bras radiaires dirigés vers la paire centrale qui quant à elle est générée à la fin de cette zone de transition. Ces microtubules centraux comptent 13 protofilaments chacun et sont connectés entre eux.

L'orientation des microtubules du flagelle est à l'opposé de celle des microtubules du corset. En effet, l'extrémité positive de l'axonème est retrouvée du côté antérieur du parasite (à la pointe du flagelle) (Gull, 1999).

L'assemblage du flagelle est assurée par un transport bidirectionnel appelé transport intraflagellaire ou IFT (Intraflagellar transport) (Buisson et al., 2013; Scholey, 2003; Taschner et al., 2012) (Figure 20). Ce mécanisme, identifié en 1993 chez *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1993), est très conservé chez les organismes eucaryotes ciliés ou flagellés à quelques exceptions près. Par exemple, pour les gamètes mâles de *Drosophila* et chez *Plasmodium*, l'assemblage du flagelle a lieu dans le cytoplasme de façon indépendante du transport intraflagellaire (Briggs et al., 2004b; Han et al., 2003).

Les protéines impliquées dans l'IFT sont ancrées aux corps basaux avant d'être prises en charge pour la synthèse de l'axonème. Elles sont regroupées en deux complexes :

- Le complexe IFT-A, composé de 6 protéines, est impliqué dans le transport rétrograde dirigé par la dynéine cytoplasmique DHC-1b (Taschner et al., 2012). Chez *T. brucei*, certaines ont déjà été étudiées : IFT-122 et IFT-140 (Absalon et al., 2007; Buisson et al., 2013). La délétion d'une des protéines composant ce complexe a pour conséquence la formation d'un flagelle court. En effet, le complexe B permet l'assemblage du flagelle mais l'inhibition du recyclage aux corps basaux (via le complexe A) inhibe l'élongation du flagelle (Absalon et al., 2007).
- Le complexe IFT-B quant à lui est impliqué dans le transport antérograde dirigé par la kinésine-2 hétérotrimérique et est composé de 11 protéines (Taschner et al., 2012). Huit de ces protéines ont été caractérisées chez *T.*

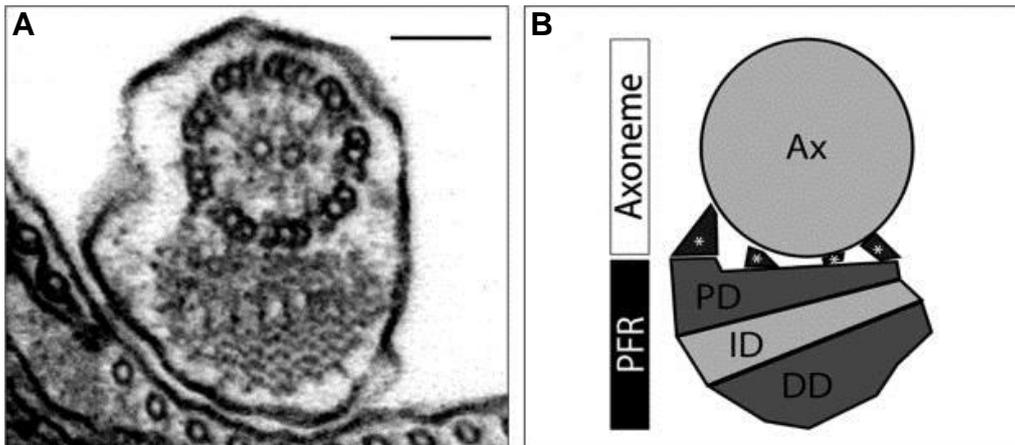


Figure 21 : Paraflagellar rod (PFR).

A. Image en microscopie électronique du flagelle : axonème et PFR. **B.** Structure de la PFR liée à l'axonème par son domaine proximal (PD). Le domaine distal (DD) est impliqué dans la liaison à la FAZ. Issu de : Portman et coll., « The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function », 2010.

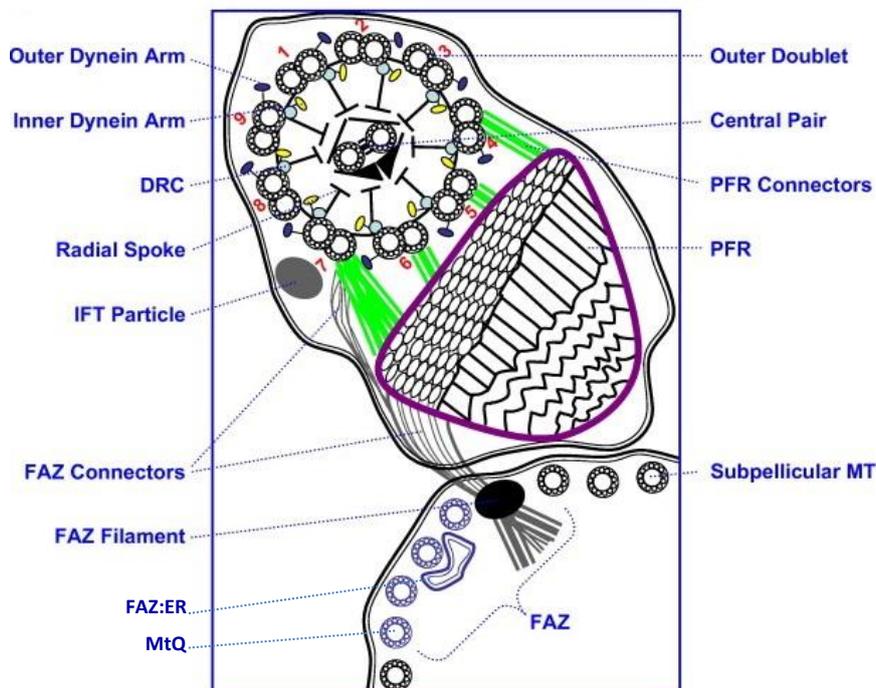


Figure 22 : Zone d'attachement flagellaire (FAZ).

Schéma de la structure de la FAZ. Elle est composée du quartette de microtubules (MtQ), du filament FAZ, des connecteurs et du réticulum endoplasmique associé à la FAZ (FAZ:ER). Modifié à partir de : Ralston et coll., « The flagellum of *Trypanosoma brucei*: New tricks from an old dog », 2008.

brucei : IFT-20, IFT-27, IFT-52, IFT-57/55, IFT-80, IFT-88 et IFT-172 (Absalon et al., 2007; Buisson et al., 2013; Huet et al., 2014). La délétion d'une protéine faisant partie de ce complexe entraîne l'inhibition complète de la formation du flagelle (Absalon et al., 2007).

Toutes les protéines impliquées dans l'IFT ne sont pas encore connues chez *T. brucei*, cependant, d'autres protéines sont décrites comme potentiellement impliquées dans l'IFT car elles interviennent dans la formation du flagelle (Absalon et al., 2007).

Chez *T. brucei* ce type de transport utilise spécifiquement les doublets de microtubules 3-4 et 7-8 (Absalon et al., 2007) (Figure 22). Le doublet 1 correspond au doublet situé à l'opposé du PFR par rapport à la paire centrale de microtubules. Les autres doublets sont ensuite numérotés de 2 à 9, dans le sens horaire.

c. Le PFR ou Paraflagellar Rod

En plus de l'axonème, le flagelle de *T. brucei* contient une structure protéique de 150 nm de diamètre spécifique des kinétoplastidés appelée PFR (Hughes et al., 2012; Kohl and Bastin, 2005) (Figure 21). Cette structure apparaît à la sortie du flagelle de la poche flagellaire et se poursuit jusqu'à la pointe du flagelle.

Le PFR est un complexe protéique organisé en « treillis » dont les deux principaux composants sont PFR-1 et PFR-2, bien qu'on estime à plus de 40 le nombre de protéines composant cette structure (Lacomble et al., 2009b; Portman and Gull, 2010). Chacune de ces deux protéines est codée par un cluster de quatre gènes répétés, présents respectivement sur les chromosomes 3 et 8. Le PFR est divisée en 3 sous-domaines par rapport à l'axonème : proximal, intermédiaire et distal (Hughes et al., 2012). Le domaine proximal est lié à l'axonème *via* les doublets 4 à 7. Cette liaison est très stable car elle résiste à des traitements par des détergents non ioniques et à de fortes concentrations en sels. Quant à la région distale elle permet la liaison au corps cellulaire *via* la FAZ. Il a aussi été mis en évidence que des kinésines de la famille 9 sont nécessaires à l'assemblage correct du PFR le long de l'axonème (Démonchy et al., 2009a).

Il a été montré que le PFR est impliqué dans la motilité des flagelles et de ce fait il est essentiel à la survie du parasite. En effet, chez la forme sanguine de *T. brucei*, la

diminution de l'expression de PFR-2 engendre une diminution de l'amplitude des battements du flagelle aboutissant à une perte de motilité ainsi qu'à une inhibition de la division cellulaire, ce qui conduit à la mort cellulaire. Ceci est expliqué par une altération de la structure de la PFR : seul le sous-domaine proximal est présent et il n'est plus lié à l'axonème (Portman and Gull, 2010).

d. La Zone d'Attachement du Flagelle ou FAZ

Le flagelle des trypanosomes est attaché au corps cellulaire grâce à la zone d'attachement du flagelle ou FAZ (Figure 22) et ce *via* le PFR (Kohl and Bastin, 2005). Cette structure est présente à la fois au niveau du flagelle et du corps cellulaire. Du côté du corps cellulaire on observe un groupe particulier de 4 microtubules appelé quartette de microtubules. Ils prennent naissance dans la région des corps basaux, font un demi-tour autour de la poche flagellaire et se placent sous la membrane plasmique le long du flagelle (Kohl and Bastin, 2005) (Figure 13). Leur polarité est inversée en comparaison à celle des microtubules du corset sous-pelliculaire mais identique à celle de l'axonème (Gull, 1999) (extrémité positive du côté antérieur de la cellule, soit du côté opposé au corps basal). Ce quartette est lié au réticulum endoplasmique rugueux (Lacomble et al., 2012) et est placé à proximité d'une autre structure de la FAZ : le filament de la FAZ. Ce filament est lui aussi placé sous la membrane plasmique au niveau de la liaison avec le flagelle. Du côté flagellaire sont présentes des fibres liées au PFR, qui traversent les membranes flagellaire et plasmique pour atteindre le filament FAZ.

Bien que le mécanisme de biogenèse de la FAZ ne soit pas encore connu, plusieurs protéines composant cette dernière ont été identifiées :

- FAZ1 est caractérisée par la présence de 36 répétitions de 14 acides aminés. C'est la première protéine du filament FAZ à avoir été identifiée. L'ARNi conduit au détachement du flagelle ainsi qu'à un défaut de cytodierèse. Cependant, le filament FAZ est toujours présent (Vaughan et al., 2008).
- CC2D est une protéine riche en domaines coiled-coil (impliqués dans l'interaction entre protéines) et possédant un domaine C2 (capable de lier le calcium). Tout comme FAZ1, elle est retrouvée au niveau du filament FAZ et

l'ARNi dirigé contre cette protéine entraîne l'inhibition de l'assemblage du filament FAZ conduisant au détachement du flagelle. On observe également un défaut de croissance (Zhou et al., 2011).

- FLA1 est une glycoprotéine transmembranaire qui possède un court domaine C-terminal nécessaire à l'adressage à la FAZ et un long domaine N-terminal glycosylé qui interagit avec des partenaires flagellaires. L'ARNi de cette protéine conduit à un défaut de cytotérièse, un détachement du flagelle et un changement de morphologie (LaCount et al., 2002).
- FLA1BP est une protéine transmembranaire présente au niveau de la membrane flagellaire. L'ARNi de FLA1BP entraîne le détachement du flagelle mais n'a pas d'impact sur la croissance cellulaire. Cette protéine est capable de se lier à la protéine FLA1 et l'interaction entre FLA1 et FLA1BP permettait de rapprocher la membrane cellulaire et la membrane flagellaire (Sun et al., 2013), car toutes deux possèdent un domaine transmembranaire.
- FLA3 est une protéine N-glycosylée, présente au niveau de la FAZ et qui joue un rôle uniquement chez la forme sanguine du parasite. En effet, l'ARNi contre cette protéine entraîne un détachement du flagelle et un défaut de cytotérièse (Woods et al., 2013).
- FLAM3 se localise au flagelle, proche du PFR. Là encore, l'ARNi conduit à un détachement du flagelle et à un défaut de cytotérièse. De plus, elle est nécessaire à la distribution correcte de FLA1BP (Rotureau et al., 2014).

En plus de l'attachement du flagelle au corps cellulaire, la FAZ jouerait un rôle dans la cytotérièse. En effet, la FAZ permet de contrôler la division cellulaire car elle définit le sillon de clivage lors de la cytotérièse (Kohl et al., 2003; Robinson et al., 1995).

ii. La poche flagellaire

1. Structure et fonction

La poche flagellaire est une structure très particulière essentielle à la survie du parasite. Elle correspond à une invagination de la membrane plasmique et constitue le lieu de sortie du flagelle qui la traverse de manière asymétrique (Field and

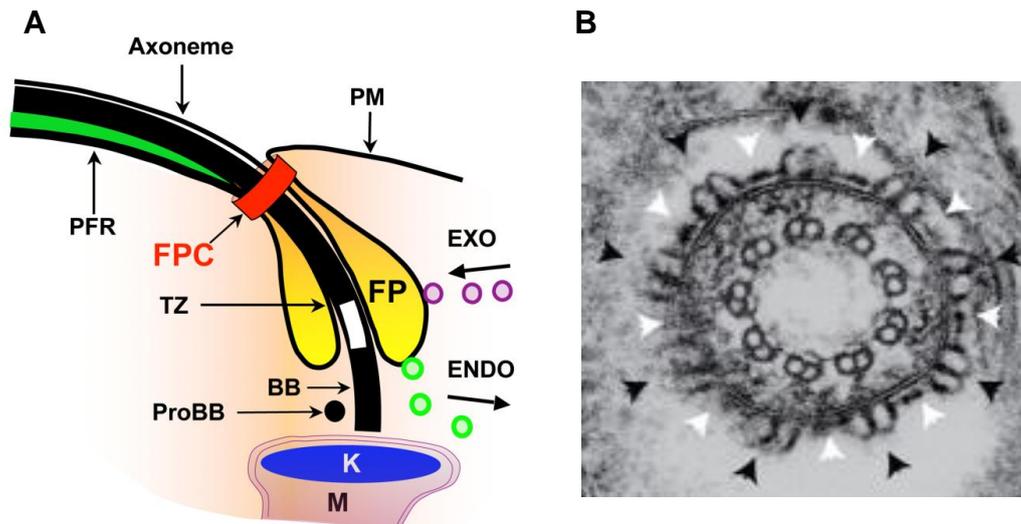


Figure 23 : La poche flagellaire.

A. Schéma de la poche flagellaire (FP) de *T. brucei*. Elle prend naissance au niveau d'une structure appelée collerette et se termine au point de sortie du flagelle : le collier de la poche flagellaire (FPC), qui resserre cette dernière. BB = corps basal mature, proBB = corps basal immature, K = kinétoplaste, M = mitochondrie, TZ = zone de transition, PFR = Paraflageller rod et PM = membrane plasmique. Issu de : Bonhivers et coll., « Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated », 2008. **B.** Image en microscopie électronique représentant une section transversale de la collerette à la base de la poche flagellaire. Issu de : Lacomble et coll., « Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography », 2009.

Carrington, 2009) (Figure 23). Elle est localisée à l'extrémité postérieure de la cellule (forme procyclique et forme sanguine). Au point d'entrée dans la poche du flagelle on retrouve une structure dense aux électrons appelée collerette (Field and Carrington, 2009; Lacomble et al., 2009a) (Figure 23). Cette structure se compose de fibres de transition qui sont localisées à l'extérieur de la membrane flagellaire, dans le lumen de la poche flagellaire, au niveau de la zone de transition. Elles sont en liaison avec les neuf doublets de microtubules de l'axonème. Ces résultats suggèrent que la collerette pourrait permettre l'ancrage de l'axonème à la membrane (Field and Carrington, 2009; Lacomble et al., 2009a).

Au niveau de la sortie du flagelle du corps cellulaire, on trouve une structure semblable aux desmosomes : le collier de la poche flagellaire (FPC) (Delva et al., 2009; Field and Carrington, 2009) (Figure 23). Il permet de resserrer la poche flagellaire au site de sortie du flagelle.

La structure de la poche flagellaire rappelle celle observée à la base de certains cils primaires chez les cellules mammifères. Cependant la raison de la présence ou non de cette poche ciliaire ainsi que sa fonction restent encore indéterminées (Molla-Herman et al., 2010).

La poche flagellaire peut être divisée en deux sous-domaines membranaires : la membrane de la poche flagellaire et la membrane flagellaire. Toutes deux sont de composition différente et diffèrent également de la membrane plasmique. La membrane flagellaire est enrichie en stérols, des lipides retrouvés principalement au niveau de domaines appelés « radeaux lipidiques » (Maric et al., 2010; Oberholzer et al., 2011). Quant à la membrane de la poche flagellaire, il s'avère qu'elle est enrichie en divers récepteurs membranaires (récepteur à la transferrine, récepteur de lipoprotéines, récepteur TbHpHbR) dont la localisation est restreinte à cette zone (Borst and Fairlamb, 1998; Field and Carrington, 2009). Ces données laissent penser qu'il existe une barrière permettant la répartition correcte des différents composants membranaires en fonction du sous-domaine qu'ils occupent (Field and Carrington, 2009; Maric et al., 2010).

La poche flagellaire est le seul endroit où la membrane n'est pas recouverte par le corset de microtubules (Gull, 1999) et où les échanges avec le milieu extérieur peuvent se faire. En effet, elle joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires :

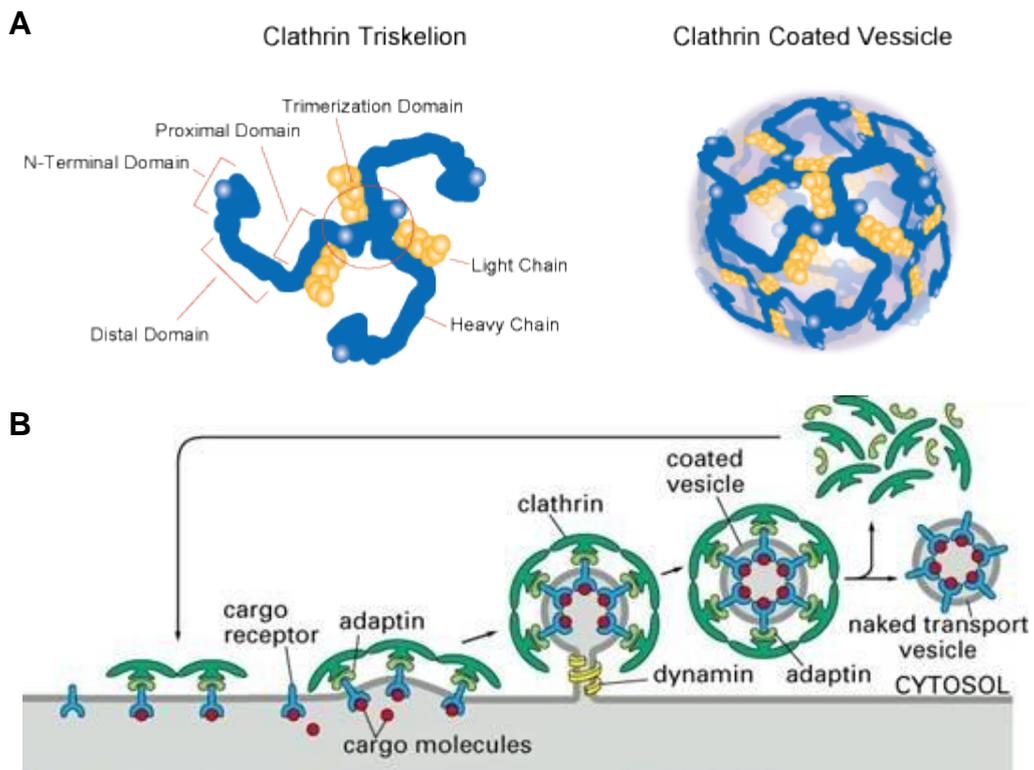


Figure 24 : L'endocytose dépendante de la clathrine.

A. Structure en triskelion de la clathrine composée de 3 chaînes lourdes et 3 chaînes légères. Les triskelions s'assemblent pour former un manteau à structure icosaédrique autour des vésicules. **B.** Mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine.

elle intervient dans le recyclage des protéines de surface, l'échappement au système immunitaire de l'hôte, la sécrétion de protéines dans le milieu extracellulaire et elle représente le seul site d'endocytose et d'exocytose pour la cellule du fait de l'absence du corset de microtubules (Field and Carrington, 2009). Des études montrent que les activités d'endocytose et d'exocytose sont plus intenses chez la forme sanguine du parasite que chez la forme procyclique. Ce phénomène est notamment expliqué par le recyclage perpétuel des glycoprotéines de surface (VSG) chez la forme sanguine, qui permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Field and Carrington, 2009).

2. Endocytose

Chez *T. brucei*, il a été admis par la communauté que le mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine (Figure 24) est le seul mécanisme d'endocytose actif chez ce parasite (Allen, 2003; Hung et al., 2004). En effet, on peut noter l'absence chez ce parasite de composants impliqués dans des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine, telle que l'endocytose dépendante de la calveoline (Allen, 2003; Field et al., 2007; Hung et al., 2004). De plus, divers travaux ont montré que la diminution de l'expression de la clathrine induit un gonflement spectaculaire de la poche flagellaire dû à un déséquilibre entre endo- et exocytose (Allen, 2003). Ce phénotype conduit à la mort du parasite, consécutivement à l'inhibition du mécanisme d'endocytose. Il a également été montré que la clathrine joue un rôle très important dans le recyclage des VSG chez la forme sanguine, qui permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Manna et al., 2014). De plus, d'autres travaux ont montrés que chez la forme sanguine, la diminution de l'expression de l'actine entraîne des phénotypes similaires à ceux observés lors de la diminution d'expression de la clathrine (García-Salcedo et al., 2004). Il semble donc que chez *T. brucei* l'endocytose soit à la fois dépendante de la clathrine et de l'actine (García-Salcedo et al., 2004).

La clathrine est une protéine structurale composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère qui s'assemblent en triskèle (structure formée de 3 unités protéiques). Elle est impliquée dans la formation de vésicules d'endocytose en générant autour

des vésicules un manteau de structure icosaédrique (Ramanan et al., 2011; Young, 2007) (Figure 24).

Le mécanisme d'endocytose fait également intervenir des protéines de la famille des Rab-GTPases (GTPases de la famille Rab, protéines capables d'hydrolyser le GTP) (Mizuno-Yamasaki et al., 2012), notamment RAB5. Ces protéines régulent les mécanismes d'ancrage, de fusion des vésicules avec les membranes et de transport. Un autre facteur est lui aussi impliqué dans ce mécanisme : Epsin-R, possédant un domaine ENTH (Epsin N-terminal homology). L'epsine-R possède un motif de liaison à la clathrine et joue un rôle d'adaptateur dans l'endocytose (Gabernet-Castello et al., 2009).

Les molécules endocytées suivent ensuite la voie endosomale et sont orientées soit vers le lysosome soit vers la voie de recyclage à la surface cellulaire.

Une autre structure a également été décrite comme impliquée dans l'endocytose : le cytotome-cytopharynx. Cependant, elle est retrouvée chez la forme épimastigote du parasite *Trypanosoma cruzi* mais pas chez *T. brucei*. Le cytotome-cytopharynx correspond à une invagination profonde de la membrane plasmique, il est retrouvé à proximité de la poche flagellaire (Alcantara et al., 2014). Le cytotome représente l'ouverture à la surface de la cellule, alors que le cytopharynx correspond à la longue invagination qui forme un tube. Chez la forme épimastigote de *T. cruzi*, l'endocytose passe majoritairement par le cytotome-cytopharynx (Porto-Carreiro et al., 2000), à la place de la poche flagellaire.

3. Exocytose

Tout comme l'endocytose, le mécanisme d'exocytose transite par la poche flagellaire (Field and Carrington, 2009). Cependant peu de choses sont connues sur ce mécanisme chez *T. brucei*. Nous savons qu'il nécessite l'implication de protéines Rab. 16 ont été identifiées chez ce parasite et il s'avère que RAB1A et RAB2 jouent un rôle dans l'exocytose (Dhir et al., 2004). Ces deux protéines sont localisées au niveau des sites de sortie du réticulum endoplasmique et du Golgi et sont impliquées dans le transport des vésicules entre le réticulum endoplasmique et le Golgi mais

aussi dans le transport *intra*-Golgi. Néanmoins aucune analyse des protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor accessory protein receptor) impliquées dans la fusion membranaire n'a été réalisée chez *T. brucei*. De plus, ce parasite ne semble pas posséder d'orthologues de la SNARE : SNAP25 (synaptosomal-associated protein 25) (Field and Carrington, 2009). Cependant des études menées chez les leishmanies indiquent que la machinerie responsable de la fusion des vésicules reste conservée chez ce parasite (Besteiro et al., 2006).

Des expériences de microscopie électronique ont mis en évidence la présence de microvésicules aussi appelées exosomes, chez *T. brucei* (Geiger et al., 2010). Ce type de vésicules pourrait avoir un rôle dans le déversement de son contenu dans le milieu extracellulaire (Olver and Vidal, 2007). L'utilisation de ce système de sécrétion a également été mis en évidence chez *Leishmania donovani* (Silverman et al., 2008).

Compte tenu de l'abondance de VSG à la surface du parasite, le mécanisme d'exocytose est majoritairement employé à l'exportation de ces glycoprotéines à la surface.

iii. Le collier de la poche flagellaire

Le collier de la poche flagellaire (FPC) est une structure du cytosquelette essentielle au parasite, qui apparaît dense aux électrons en microscopie électronique (Lacomble et al., 2009a; Bonhivers et al., 2008b). Le FPC est décrit comme une structure en « anneau » ou « fer à cheval », d'environ 500 nm de diamètre, qui resserre la poche flagellaire au site de sortie du flagelle (Field and Carrington, 2009; Lacomble et al., 2009a; Bonhivers et al., 2008b) (Figure 23). Il permet une jonction membranaire entre la membrane du flagelle, celle de la poche flagellaire et la membrane plasmique. Il peut également agir en tant que barrière (Bonhivers et al., 2008b; Field and Carrington, 2009).

La structure du collier rappelle plusieurs autres structures présentes dans différents organismes. Tout d'abord, celle des desmosomes de type *macula*

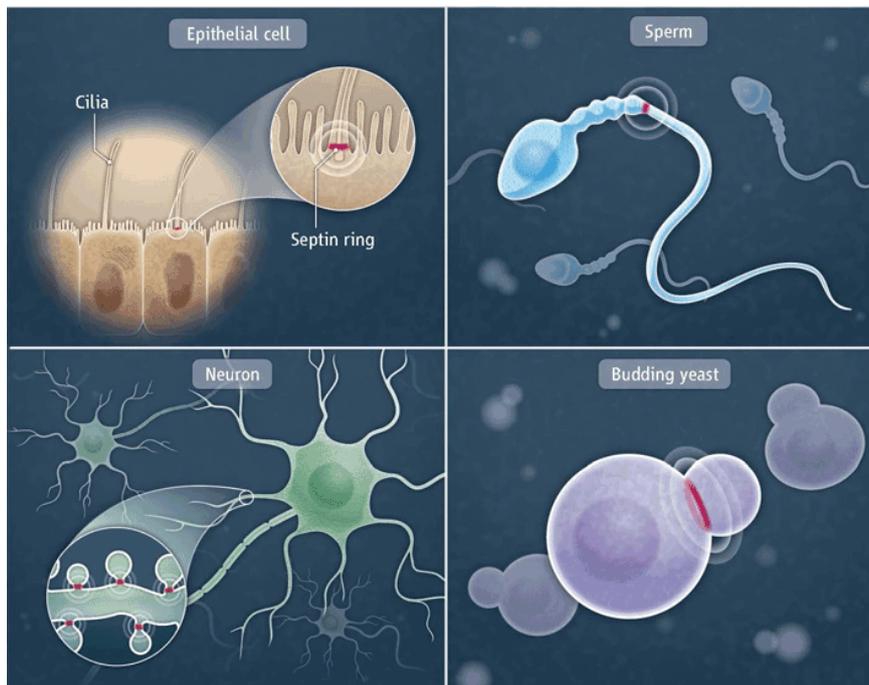


Figure 25 : Les anneaux de septines.

Barrière de diffusion de septines, présente à la base des cils chez les cellules épithéliales, à l'annulus des spermatozoïdes, à la base des épines dendritiques des neurones ainsi qu'à la jonction entre la cellule mère et le bourgeon fille chez la levure. Issu de : Barral Y, « Septins at the Nexus », 2010.

adherens (Bonhivers et al., 2008b; Delva et al., 2009). Ce sont des jonctions entre deux membranes, impliquant des protéines du cytosquelette.

Une structure en anneau est également retrouvée à la base de la zone de transition des cils primaires (Hu et al., 2010), mais aussi à la jonction entre le bourgeon fille et la cellule mère chez les levures (Beise and Trimble, 2011), à l'annulus des spermatozoïdes (Barral, 2010; Mostowy and Cossart, 2012) ou encore à la base des épines dendritiques des neurones (Barral, 2010) (Figure 25). Cette structure, formée de septines constitue une barrière de diffusion (Barral, 2010; Beise and Trimble, 2011; Hu et al., 2010; Mostowy and Cossart, 2012). Toutefois, il est important de noter que les septines ne sont pas retrouvées uniquement à la base des cils primaires, mais aussi le long de l'axonème, ce qui leur confère également un rôle dans le contrôle de la biogenèse des cils (Ghossoub et al., 2013). Les septines font partie de la famille des GTPases et possèdent en plus du site de liaison du GTP, un domaine coiled-coil. Ces deux domaines interviennent dans la polymérisation des septines, permettant ainsi la formation d'une barrière de diffusion. L'ancrage de cette barrière est assuré par l'interaction des septines avec le phosphatidylinositol polyphosphate présent au niveau des membranes (Hu et al., 2010; Mostowy and Cossart, 2012).

Bien que la structure annulaire formée par les septines ressemble à celle du collier de la poche flagellaire, aucun homologue de séquence des septines n'est retrouvé au sein du génome de *T. brucei*. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la présence chez ce parasite d'un homologue fonctionnel.

L'analyse protéomique d'un extrait flagellaire de *T. brucei* a été menée au sein de l'équipe par Bonhivers M. et coll. (Bonhivers et al., 2008b). Pour cela, des souris ont été immunisées avec des protéines issues d'un extrait flagellaire de *T. brucei*, préalablement séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les sera ainsi obtenus ont été testés par immunofluorescence sur des parasites. Les anticorps reconnaissant des structures particulières du parasite ont été sélectionnés et l'étude des antigènes correspondants a été menée, permettant la découverte de nouvelles protéines du cytosquelette de *T. brucei*. Parmi ces protéines, est présente BILBO1, la première protéine du collier de la poche flagellaire à avoir été identifiée (Bonhivers et al., 2008b).

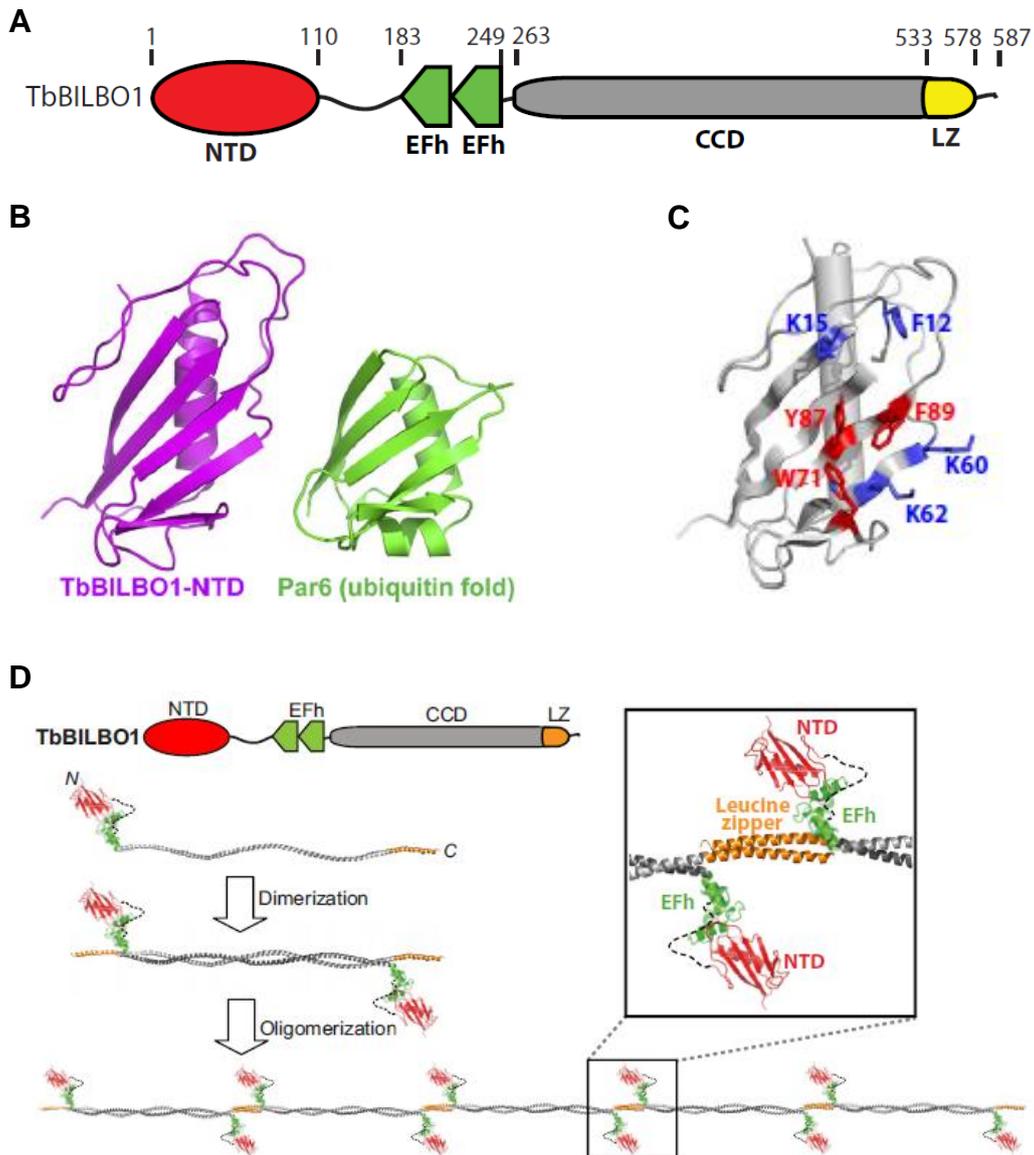


Figure 26 : BILBO1.

A. Schéma de la structure primaire de BILBO1. NTD = domaine N-terminal, EFh = EF-hand, CCD = domaine coiled-coil et LZ = leucine zipper. **B.** Structure du domaine NTD de BILBO1 en comparaison au domaine PB1 (ubiquitin-like) de Par6. **C.** Acides aminés conservés dans le « patch » sur le domaine NTD de BILBO1. **D.** Mécanisme putatif d'assemblage de BILBO1. Deux molécules forment un dimère antiparallèle via leur domaine CCD. Les dimères s'assemblent en filaments par leur domaine LZ. Issu de : Vidilaseris et coll., « Structure of the TbBILBO1 Protein N-terminal Domain from *Trypanosoma brucei* Reveals an Essential Requirement for a Conserved Surface Patch », 2013 et de Vidilaseris et coll., « Assembly Mechanism of *Trypanosoma brucei* BILBO1, a Multidomain Cytoskeletal Protein », 2014.

1. BILBO1

BILBO1 est la première et l'unique protéine du collier de la poche flagellaire à avoir été identifiée (Bonhivers et al., 2008b). Elle est retrouvée dans les divers protéomes flagellaires de *T. brucei* (Broadhead et al., 2006; Ralston et al., 2009; Subota et al., 2014) publiés à ce jour, ce qui reflète une forte connexion entre le flagelle et le collier de la poche flagellaire.

Cette protéine de 67,3 kDa est codée par le gène *Tb927.11.12150* présent sur le chromosome 11 (Bonhivers et al., 2008b). Des analyses bioinformatiques suggèrent que BILBO1 est composée de quatre domaines : un domaine N-terminal ou NTD (aa. 1-110), deux motifs EF-hand en tandem (aa. 183-249), un large domaine coiled-coil en C-terminal (aa. 263-578) ainsi qu'un motif leucine zipper en C-terminal (aa. 534-578) (Vidilaseris et al., 2014b) (Figure 26A).

Des homologues de BILBO1 sont retrouvés chez tous les kinétoplastidés (Bonhivers et al., 2008b). Bien que la séquence reste très conservée entre chaque espèce, une insertion de 6 acides aminés est retrouvée dans la région « linker » (lien entre le NTD et les EF-hand) chez *T. brucei* et *T. cruzi* alors que cette insertion n'est pas présente chez les leishmanies (Vidilaseris et al., 2014b). Cependant aucun homologue n'est retrouvé chez les autres organismes eucaryotes.

Une analyse fonctionnelle de BILBO1 réalisée par Bonhivers M. et coll. a permis de mettre en évidence le caractère essentiel de BILBO1 pour la survie de *T. brucei* (Bonhivers et al., 2008b). Pour étudier la fonction de cette protéine, l'ARN interférence contre BILBO1 a été réalisée. Chez la forme procyclique du parasite, l'ARNi induit une inhibition de la croissance cellulaire qui est accompagnée par l'apparition de cellules aberrantes. En effet, le nouveau flagelle est détaché du corps cellulaire et se positionne au bout de l'extrémité postérieure allongée (Figure 27). Le détachement du flagelle est dû à l'inhibition de la synthèse de la FAZ et du FPC. Quant à l'élongation de l'extrémité postérieure, elle est due à la formation et l'élongation des microtubules sous-pelliculaires vers cette extrémité, ce qui est probablement associé au positionnement aberrant du nouveau flagelle.

Une analyse plus détaillée des phénotypes en microscopie électronique révèle que le flagelle détaché n'est associé à aucune poche flagellaire ni aucun collier (présence de microtubules sous-pelliculaires) (Figure 27). BILBO1 est donc une protéine

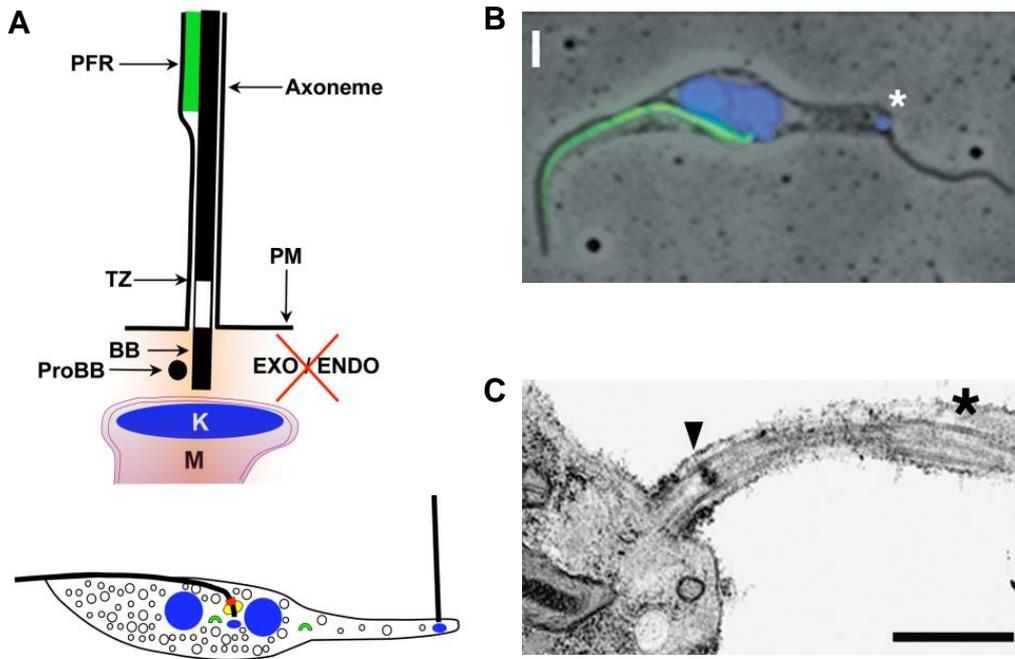


Figure 27 : ARN interférence de BILBO1.

ARNi chez la forme procyclique **A.** Schéma des phénotypes observés après induction : élongation de l'extrémité postérieure présentant un flagelle détaché qui n'est pas associé ni à une poche ni à un collier. **B.** Le flagelle détaché ne possède pas de FAZ (marquage avec L3B2, anti-FAZ (vert)). L'astérisque indique le kinétoplaste qui est situé à l'extrémité postérieure. **C.** Image en microscopie électronique du nouveau flagelle détaché. L'astérisque indique le PFR et la flèche la zone de transition. Issu de : Bonhivers et coll., « Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated », 2008.

essentielle à la biogenèse du collier mais aussi de la poche flagellaire. L'absence de poche flagellaire au niveau du flagelle détaché induit une inhibition de l'activité endo- et exocytique ce qui entraîne une accumulation de vésicules dans le cytoplasme. Seule la poche associée à l'ancien flagelle conserve une activité d'endo- et d'exocytose.

Chez la forme sanguine, l'ARNi de BILBO1 est létale et les phénotypes associés sont différents de ceux observés chez la forme procyclique. En effet, 12h après induction de l'ARNi, les cellules deviennent rondes et sont incapables de se diviser.

Une étude plus récente menée par Gang Dong (Max F. Perutz Laboratories, Autriche) et coll. a permis de mettre en lumière la fonction des différents domaines de BILBO1.

Dans une première publication ils ont étudié le rôle du domaine N-terminal de BILBO1 (NTD) (Vidilaseris et al., 2014a). Par des expériences d'immunofluorescence, les auteurs ont pu montrer que le domaine NTD de BILBO1 n'est pas nécessaire à la localisation de BILBO1 au collier de la poche flagellaire. Cependant, la surexpression de BILBO1 délétée de son domaine N-terminal conduit à un effet dominant-négatif. En effet, une inhibition de la croissance et l'apparition de phénotypes similaires à ceux obtenus lors de l'ARNi de BILBO1 (le nouveau flagelle est détaché à l'extrémité postérieure allongée) sont observés. Ces résultats laissent donc penser que le domaine NTD a un rôle fonctionnel pour la protéine. Pour aller plus en détail dans la fonction de ce domaine, les auteurs se sont attachés à résoudre sa structure. Il s'avère que le domaine NTD possède une structure « ubiquitin-like » similaire au domaine PB1 de Par6 (Hirano et al., 2005) (Figure 26B). Cette structure contient un « patch » comportant 4 résidus aromatiques et 3 résidus basiques formant une structure en cratère (Figure 26C). Des mutations de ces différents résidus entraînent des phénotypes similaires à ceux observés lors de la délétion du domaine NTD ou de l'ARNi de BILBO1. Ces résidus sont donc essentiels à la fonction de BILBO1 (Vidilaseris et al., 2014a).

Dans une seconde publication, ils se sont attachés à étudier le rôle des autres domaines de BILBO1 (Vidilaseris et al., 2014b). Ils ont montré que :

- Les domaines EF-hand de BILBO1 sont homologues à la protéine humaine calmodulin-like hCLP et sont capables de lier le calcium, ce qui entraîne un changement de conformation de la protéine.
- Le long domaine coiled-coil, quant à lui est impliqué dans la formation d'homodimères antiparallèles.
- Le motif leucine zipper est nécessaire mais pas suffisant pour l'adressage de BILBO1 au collier de la poche flagellaire. Il est également responsable de l'oligomérisation de BILBO1.

Compte tenu de toutes ces données, les auteurs proposent un modèle d'oligomérisation de BILBO1. Dans un premier temps, BILBO1 forme des homodimères antiparallèles *via* son domaine coiled-coil, les domaines NTD et EF-hand étant projetés vers l'extérieur du dimère. La délétion des domaines NTD et EF-hand n'influence pas la capacité de dimérisation de BILBO1. La formation des oligomères se fait ensuite *via* l'interaction des leucines zipper, de différents dimères, entre eux (Figure 26D). Ce mécanisme d'assemblage de BILBO1 permet la formation de longs filaments linéaires. Il a aussi été observé que deux filaments de BILBO1 peuvent interagir entre eux (Vidilaseris et al., 2014b).

2. Les partenaires de BILBO1

Les données présentées dans le paragraphe ci-dessus montrent que le collier de la poche flagellaire est essentiel à la survie du parasite, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle. Il paraît donc intéressant de caractériser cette structure par l'étude de ses constituants : BILBO1 et ses partenaires.

Afin de mieux comprendre la structure et la biogénèse du FPC, un crible en double-hybride chez la levure a été réalisé contre une banque génomique de *T. brucei*, en utilisant BILBO1 comme appât. Cela nous a permis d'identifier plusieurs partenaires potentiels de BILBO1 au sein de ce parasite. La caractérisation de chacun de ces partenaires devrait donc nous permettre de mieux comprendre le collier. Au cours de ma thèse, je me suis attachée à caractériser deux de ces

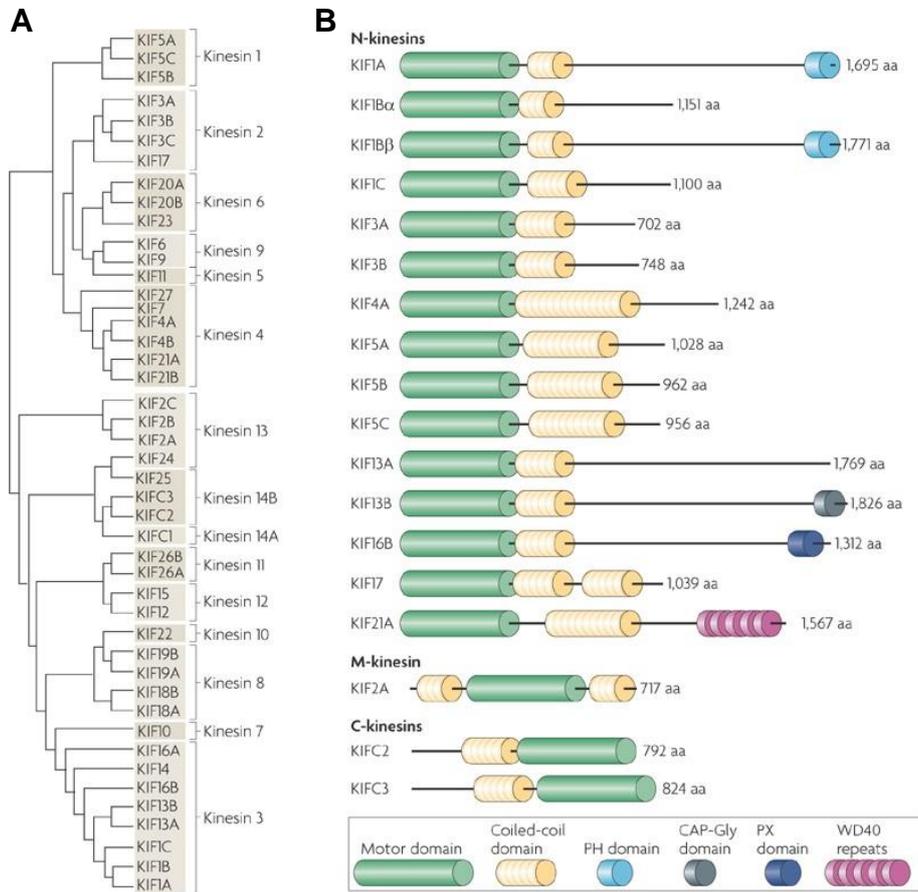
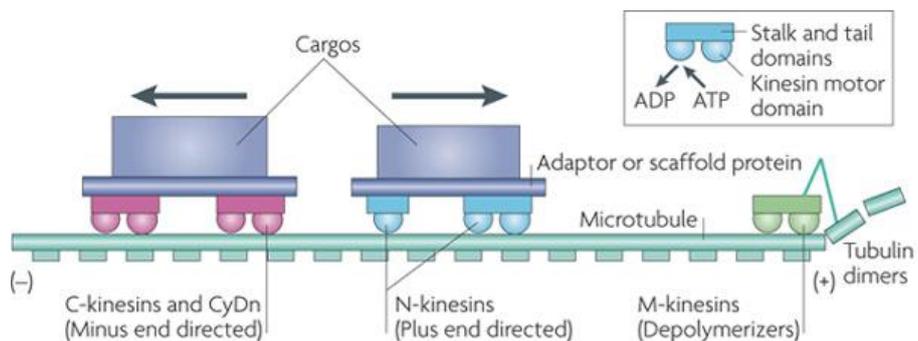


Figure 28 : Arbre phylogénique et structure des principales kinésines.

A. Phylogénie de 45 gènes codants pour des kinésines, retrouvés dans le génome de la souris. **B.** Structure de la plupart des kinésines : composées d'un domaine moteur et d'un domaine coiled-coil. Issu de : Hirokawa et coll., « Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport », 2009.



partenaires potentiels : FPC5 annotée comme kinésine putative et FPC9 une synaptotagmine potentielle.

IV. Les kinésines

a. Classification

La superfamille des kinésines est un groupe contenant de nombreuses protéines de fonctions diverses et présentes chez tous les eucaryotes. Le nombre croissant et la grande diversité des kinésines ont entraîné un certain nombre de confusions au sein de la communauté scientifique puisqu'il n'y a pas de règles pour leur annotation. La décision a donc été prise de créer une nomenclature standardisée pour faciliter la communication entre les chercheurs (Lawrence et al., 2004). Pour cela, les kinésines sont regroupées en familles, chaque famille étant appelée « Kinésine » suivi d'un nombre allant de 1 à 14, correspondant aux nombres de familles (Figure 28). Pour les grandes familles des sous-familles ont été créées et sont annotées avec des lettres : A, B ... Cependant le nom individuel des kinésines déjà découvertes est resté inchangé pour éviter toute confusion. Certaines kinésines ne peuvent pas être classées dans l'une de ces familles et sont donc considérées comme kinésines orphelines.

Les kinésines peuvent également être classées en fonction de la position de leur domaine moteur au sein de la protéine (Vale and Fletterick, 1997) (Figure 28), ce qui leur confère des fonctions différentes (Figure 29). En effet, trois cas sont possibles :

- Les kinésines de type N qui possèdent leur domaine moteur en N-terminal de la protéine et qui assurent le transport antérograde : de l'extrémité négative vers l'extrémité positive des microtubules. Ce type de kinésines représente la majorité des familles (1 à 12).
- Les kinésines de type C sur lesquelles le domaine moteur est positionné en C-terminal et qui assurent le transport rétrograde, c'est-à-dire de l'extrémité positive vers l'extrémité négative. C'est le cas des membres de la famille 14.
- Les kinésines de type M aussi appelées Kin-I (internal) possèdent un domaine moteur central. Ces kinésines sont responsables de la dépolymérisation des microtubules et font partie de la famille 13.

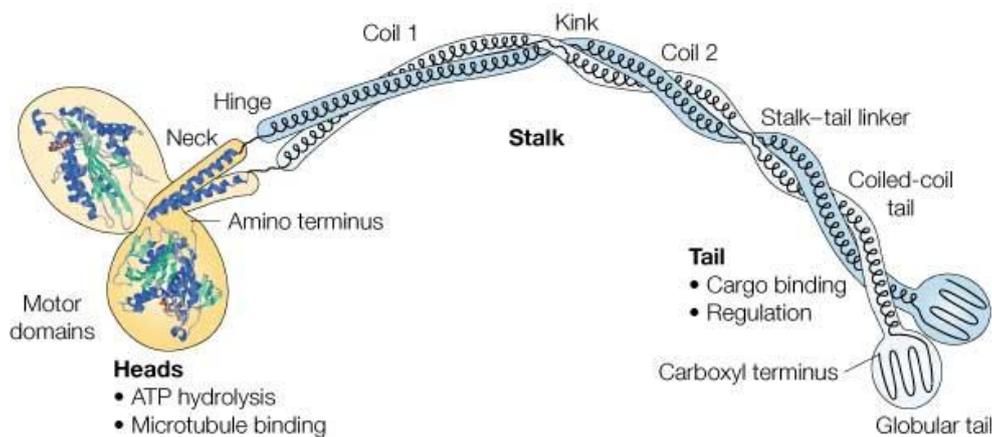


Figure 30 : Structure de la kinésine conventionnelle : KHC.

Exemple de structure d'une kinésine avec le cas de la kinésine conventionnelle (KHC, kinésine-1) qui forme des homodimères. Elle est composée d'une tête en N-terminal contenant le domaine moteur capable d'hydrolyser l'ATP, d'une région « stalk » qui assure la dimérisation et d'une région « tail » responsable de la liaison des « cargos ». Issu de : Woehlke et coll., « Walking on two heads: the many talents of kinesin », 2000.

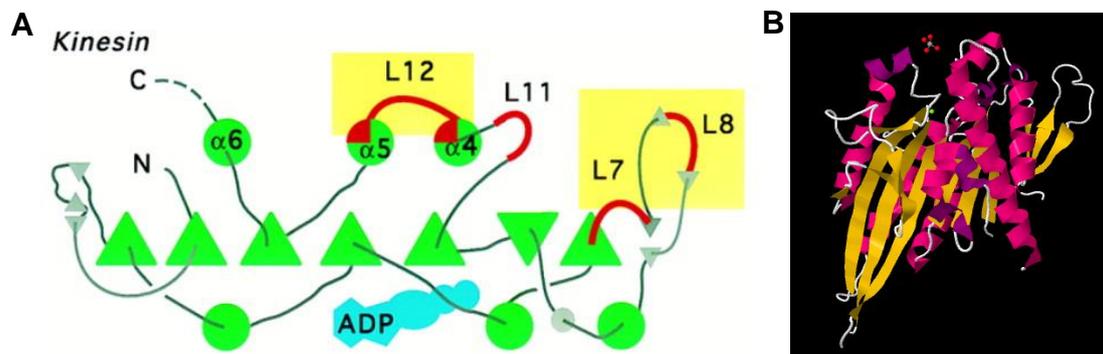


Figure 31 : Le domaine moteur des kinésines.

A. Schéma de la structure du domaine moteur de la kinésine. Issu de : Woehlke et coll., « Microtubule Interaction Site of the Kinesin Motor », 1997. **B.** Structure cristallographique du domaine moteur de la kinésine KIF1A murine. Issu de : RCSB Protein Data Bank.

b. Structure

Les kinésines ont une structure commune. Elles se composent d'un domaine moteur très conservé au sein d'une même famille, ainsi que des régions « stalk » (tige) et « tail » (queue) qui elles sont divergentes d'une kinésine à l'autre, parfois même au sein d'une même famille (Figure 30).

Le domaine moteur aussi appelé tête, d'environ 360 acides aminés, est composé du cœur catalytique et de la région « neck-linker » (cou). Il est responsable de l'activité ATPase des kinésines et reste très conservé au sein d'une même famille.

Le cœur catalytique contient à la fois le site de liaison de l'ATP mais aussi celui aux microtubules. Il est composé d'un feuillet β de 8 brins en sandwich entre 3 hélices α de part et d'autre. Les brins β sont tous parallèles excepté $\beta 5$ et $\beta 6$ et sont organisés comme suit : $\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 8$ - $\beta 3$ - $\beta 7$ - $\beta 6$ - $\beta 4$ - $\beta 5$. On retrouve d'un côté de ce feuillet les hélices et boucles $\alpha 1$, $\alpha 2a$ -L5- $\alpha 2b$ et $\alpha 3$ -L9- $\alpha 3a$ et de l'autre côté $\alpha 4$ -L12- $\alpha 5$ et $\alpha 6$ (Sack et al., 1997). Cette structure permet la formation de la poche accueillant l'ATP. Elle est similaire à celle retrouvée chez les myosines et les protéines G. Elle se compose de quatre motifs (Sack et al., 1997) (Figure 31) :

- N1 (GxxxxGKT/S) aussi appelé motif Walker A, retrouvé à la fin du brin $\beta 3$ et formant la boucle P-loop qui lie les atomes d'oxygène des phosphates β et γ de l'ATP.
- N2 (NxxSSR) aussi appelé Switch-I, retrouvé en N-terminal de $\beta 6$ et sur $\alpha 3a$.
- N3 (DxxGxE) aussi appelé Switch-II, retrouvé en C-terminal du brin $\beta 7$. Les Switch-I et II sont des senseurs du phosphate γ et sont les premiers à répondre à l'hydrolyse de l'ATP.
- N4 (RxRP), placé en C-terminal de $\beta 1$ et assurant la liaison au nucléoside par interaction avec l'adénine.

Le cœur catalytique contient aussi le domaine de liaison aux microtubules. Bien qu'il ne semble pas y avoir de séquence consensus impliquée dans la liaison aux microtubules chez les protéines se liant à ces derniers, il semble néanmoins que chez les kinésines, certaines régions conservées soient impliquées dans la liaison aux microtubules. En effet, suite à l'étude de la liaison aux microtubules de plusieurs mutants, Woehlke et ses collaborateurs ont montrés que les régions : $\alpha 5$ -L12- $\alpha 4$,

L11, L7 et L8 pourraient être impliquées dans la liaison des kinésines avec les microtubules (Woehlke et al., 1997).

Le domaine moteur contient également une courte région « neck-linker » spécifique à chaque famille et essentielle dans le choix de la direction du mouvement de la kinésine ainsi que dans la régulation de l'activité (Endow and Waligora, 1998).

La région « stalk » située au centre est constituée d'une hélice α formant un domaine coiled-coil permettant la dimérisation des kinésines.

La région « tail » retrouvée en C-terminal des kinésines de type N peut posséder une grande variabilité même au sein d'une famille, contrairement au domaine moteur. Cette région est impliquée dans la liaison avec les « cargos ». La grande variabilité trouvée au sein de ce domaine « tail » peut expliquer la grande diversité des « cargos » transportés par les kinésines et les différentes fonctions qu'elles exercent.

c. Activité et fonctions

i. Transport de « cargos »

Du fait de leur grande diversité, les kinésines possèdent de nombreuses fonctions au sein des cellules (Miki et al., 2005). En effet, les kinésines de type N assurent le transport antérograde le long des microtubules par hydrolyse de l'ATP, alors que les kinésines de type C assurent le transport rétrograde. Elles transportent tout type de « cargos » : vésicules, organites, complexes protéiques et acides nucléiques (Miki et al., 2005). Cette fonction de transport leur assure également un rôle majeur dans la biogenèse des cils et des flagelles. En effet, la construction de ces derniers est assurée par le transport intraflagellaire (IFT) qui correspond à un transport bidirectionnel assuré par une kinésine et une dynéine. La kinésine se charge d'amener les composants nécessaires à la pointe du flagelle pour l'élongation de ce dernier alors que la dynéine permet le recyclage de la kinésine et d'autres composants aux corps basaux (Figure 20).

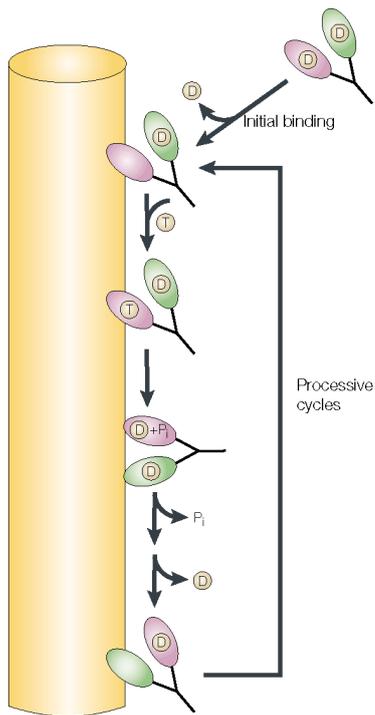


Figure 32 : Mécanisme de déplacement des kinésines.

La première étape consiste en l'attachement d'une des têtes de la kinésine liée à l'ADP. L'ADP est immédiatement libéré ce qui induit une forte interaction entre la tête de la kinésine et la tubuline. Une molécule d'ATP se lie à la tête « vide » et l'hydrolyse de cet ATP entraîne un basculement vers l'avant de la seconde tête qui va à son tour se lier aux microtubules alors que la première se détache. Issu de : Woehlke et coll., « Walking on two heads: the many talents of kinesin », 2000.

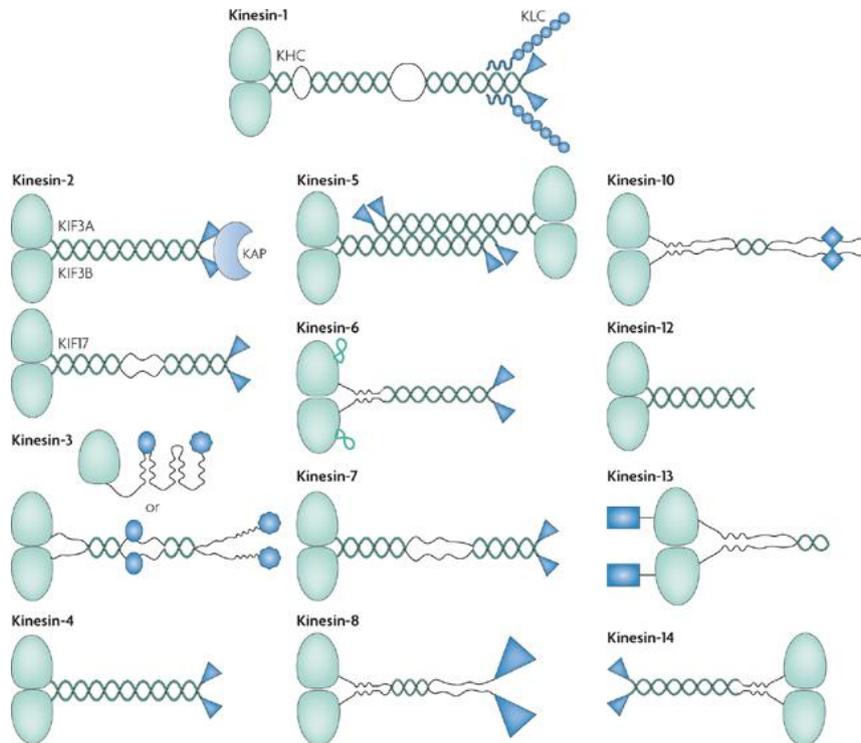


Figure 33 : Oligomérisation des différentes familles de kinésines.

Issu de : Verhey et coll., « Traffic control: regulation of kinesin motors », 2009.

Les kinésines sont des enzymes qui transforment l'énergie chimique issue de l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique afin de se mouvoir le long des microtubules (Gilbert et al., 1995). Le pas des kinésines sur les microtubules est de 8 nm et correspond à la distance entre deux sous-unités de β -tubuline. En effet, elles se lient uniquement à la sous-unité β bien qu'elles recouvrent en partie la sous-unité α . Dans le cas de la kinésine conventionnelle (kinesin heavy chain, KHC), nous savons également qu'elle possède une activité processive qui lui permet de se déplacer sur de longues distances (plus de 100 sous-unités de tubuline) sans se dissocier des microtubules, à une vitesse d'environ 0,6-0,8 $\mu\text{m/s}$. Nous savons aussi que la présence de microtubules stimule d'environ 1000 fois l'activité ATPase de kinésines.

Pour se déplacer sur les microtubules, les kinésines adoptent le mécanisme suivant : l'une des deux têtes de la kinésine liée à l'ADP va se fixer sur les microtubules. L'ADP est alors immédiatement libéré ce qui induit une forte interaction entre cette tête de la kinésine et la tubuline β . Une molécule d'ATP va alors se lier au domaine moteur de la tête « vide » déjà liée aux microtubules et l'hydrolyse de cet ATP entraîne un basculement vers l'avant de la seconde tête (liée à l'ADP) qui va à son tour se lier aux microtubules alors que la première se détache (Woehlke and Schliwa, 2000) (Figure 32). La seconde tête va suivre le même cheminement que la première et l'enchaînement de ces étapes pour chaque tête permet aux kinésines de se déplacer sur les microtubules comme si elles marchaient pas à pas.

Il faut aussi savoir que la majorité des kinésines ne fonctionnent pas en tant que monomère (KIF1A) mais en tant qu'homodimères, hétérotrimères (famille 2), homotétramères (famille 5) ou hétérotétramères (KIF5, famille 1) (Miki et al., 2005) (Figure 33). La présence de deux domaines moteurs (liés par dimérisation) est nécessaire à une activité processive. En effet, cela permet à la kinésine de rester constamment en contact avec le microtubule sur lequel elle se déplace.

Dans le cas de la kinésine monomérique l'interaction avec les microtubules serait maintenue grâce à une boucle (k-loop) chargée positivement qui interagirait avec la partie C-terminale de la tubuline (chargée négativement), permettant ainsi de garder le domaine moteur à proximité des microtubules. Cependant d'autres études ont montré que cette kinésine serait capable de dimériser et qu'elle opérerait pour un état transitoire de dimère pour se déplacer le long des microtubules (Rashid et al., 2005).

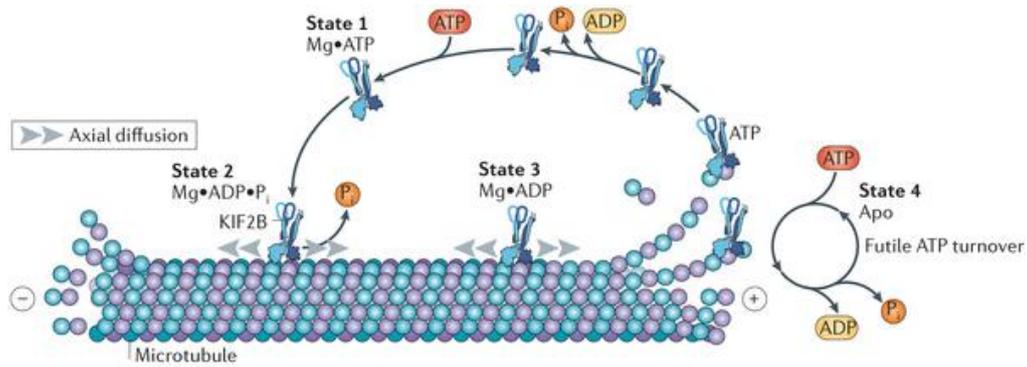


Figure 34 : Dépolymérisation des microtubules.

La kinésine se fixe au motif E-hook des tubulines puis diffuse vers l'une des extrémités au bout de laquelle elle va supprimer des dimères de tubulines. Pour cela elle utilise l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP. Issu de : Cross et coll., « Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins », 2014.

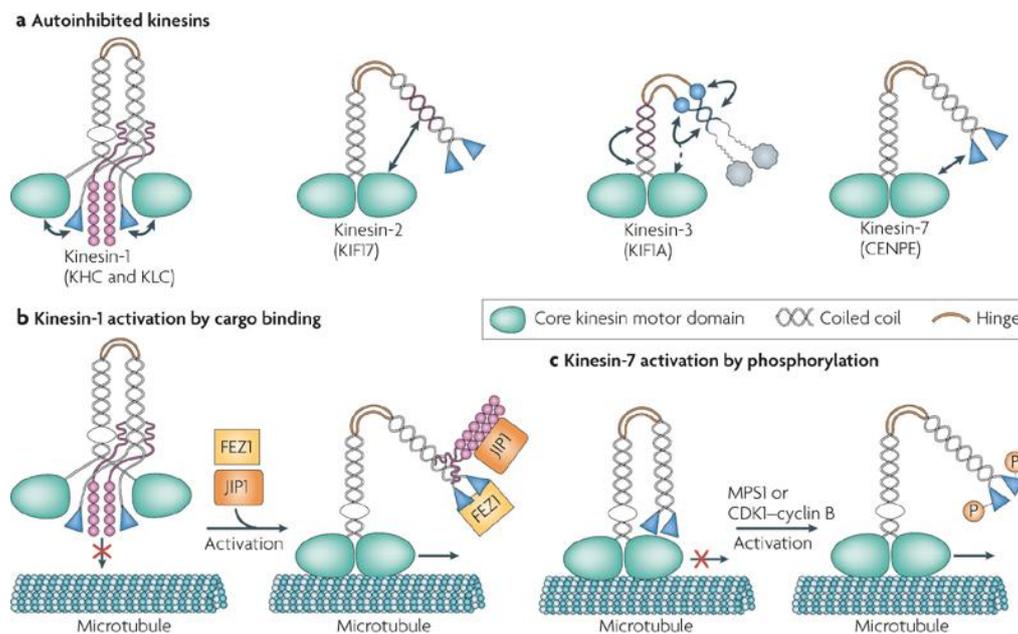


Figure 35 : Mécanismes de régulation des kinésines.

A. Forme inactive de différentes kinésines, due à un repliement de la protéine de telle sorte que le domaine C-terminal ou le domaine central viennent masquer le domaine moteur. **B.** Levée de l'auto-inhibition de la kinésine-1 par la liaison de deux cargos. **C.** Activation de la kinésine-7 par phosphorylation du domaine « tail ». Issu de : Verhey et coll., « Traffic control: regulation of kinesin motors », 2009.

De plus, les kinésines ont aussi un rôle important dans la mitose et la méiose car elles assurent le mouvement des chromosomes et du fuseau mitotique (Miki et al., 2005).

ii. Dépolymérisation des microtubules

Les microtubules constituent un réseau extrêmement dynamique dont la régulation est nécessaire à la cellule. En effet, la demi-vie des microtubules en interphase est d'environ 5 minutes alors qu'elle est de seulement 10 secondes au niveau du fuseau mitotique (Saxton et al., 1984). Il est donc nécessaire que les microtubules soient dépolymérisés rapidement. C'est là qu'interviennent les kinésines de type M (famille 13) qui ont la capacité de dépolymériser les microtubules, mais pas de transporter des « cargos » le long de ces derniers. Pour ce faire, elles s'associent aux microtubules *via* une interaction avec le domaine E-hook des tubulines et diffusent d'un côté ou de l'autre jusqu'à atteindre une des extrémités. Une courbure des microtubules a alors lieu et la kinésine utilise l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP en ADP pour enlever des dimères de tubuline que ce soit à l'extrémité positive ou négative des microtubules (Walczak et al., 2013) (Figure 34). Les domaines N- et C-terminal qui entourent le domaine moteur sont impliqués dans la dimérisation, la localisation cellulaire et la régulation de l'activité.

iii. Régulation des kinésines

L'activité des kinésines doit être régulée pour éviter l'hydrolyse futile d'ATP en l'absence de « cargo » ainsi que l'encombrement inutile des microtubules (Verhey and Hammond, 2009). Cette régulation est également nécessaire à la libération du « cargo » à l'endroit voulu (Verhey and Hammond, 2009). Pour cela plusieurs mécanismes ont été mis en lumière :

- L'auto-inhibition (Figure 35) semble être le mécanisme principal rencontré pour l'inhibition des kinésines. En effet, plusieurs familles de kinésines (1, 2, 3 et 7) sont régulées par ce phénomène. Dans ce cas, les kinésines sont capables d'adopter deux conformations : une repliée (compacte) et une

étendue (linéaire) (Hackney et al., 1992). Il s'avère que la forme repliée correspond à la forme inactive de la kinésine, dans laquelle une région non motrice de la protéine vient masquer le cœur catalytique. Dans le cas de la kinésine-1 il a été montré que le peptide QIAKPIRP présent sur la région « tail » inhibe l'activité de cette kinésine en interagissant avec le motif Switch-I du domaine moteur (Dietrich et al., 2008; Wong et al., 2009). Pour les kinésines KIF17 (famille 2) et CENPE (famille 7) c'est également une interaction entre le domaine C-terminal et le domaine moteur qui entraîne l'inhibition (Espeut et al., 2008). Dans le cas des kinésines KIF1A et KIF13B (famille 3) l'inhibition est assurée par une interaction entre un fragment interne à la protéine et le domaine moteur (Hammond et al., 2009). Pour les autres familles de kinésines le mécanisme d'inhibition n'a pas été étudié mais il est fort probable que ce soit aussi un mécanisme d'auto-inhibition.

Ce mécanisme d'auto-inhibition peut être levé par la liaison de la région « tail » au « cargo » (Coy et al., 1999) ou bien par phosphorylation (Figure 35).

- La phosphorylation peut soit réguler l'association et la dissociation entre la kinésine et son « cargo », soit réguler la liaison de la kinésine aux microtubules. Par exemple, dans le cas des kinésines-5, la phosphorylation du résidu Thr937 en C-terminal par la kinase CDK1 (cyclin-dependent kinase 1) augmente la liaison aux microtubules (Cahu et al., 2008). En ce qui concerne les kinésines-7, la phosphorylation de la région « tail » par MPS1 (monopolar spindle protein1) ou CDK1 entraîne le décompactage de la protéine, permettant ainsi une augmentation de la motilité le long de microtubules (Espeut et al., 2008).
- La liaison avec des chaînes légères peut aussi être un facteur de régulation des kinésines. C'est par exemple le cas de KIF5 (famille 1) qui s'associe en hétérotétramère : 2 chaînes lourdes motrices et 2 chaînes légères.
- La composition des microtubules peut aussi influencer la liaison des kinésines sur ces derniers. En effet, une étude a montré que les modifications post-traductionnelles des microtubules ont un rôle sur la liaison des kinésines (Hammond et al., 2008) : certaines sont influencées par l'acétylation ou la détyrosination (kinésine-1), d'autres par la polyglutamylation (kinésine-3). Les

MAPs (protéines associées aux microtubules) quant à elles pourraient inhiber la liaison entre kinésines et microtubules mais cela reste encore à démontrer.

iv. Maladies

Du fait de leurs nombreuses fonctions, les kinésines sont également associées à certaines maladies. En effet, des mutations dans les kinésines sont à l'origine de maladies neurodégénératives telle que la maladie de Charcot-Marie-Tooth (KIF1B β) ou la paraplégie spastique héréditaire (KIF5A) (Duncan and Goldstein, 2006; Salinas et al., 2008). Il a également été montré que l'altération de l'expression des kinésines était à l'origine de nombreux cancers. Par exemple, une altération de KIF3, KIF1B et KIF14 est observée dans des cas de cancer du sein, ou encore une altération de KIF14 et KIF4A dans certains cancers des poumons. Il s'avère que les modifications d'expression de nombreuses kinésines sont impliquées dans un grand nombre de cancers (Yu and Feng, 2010).

d. Autres fonctions

En plus des fonctions « classiques » connues des kinésines, d'autres fonctions complètement différentes ont été mises en évidence. En effet, c'est par exemple le cas chez le parasite *Trypanosoma brucei*. Il a été montré que la kinésine TbKHC1 (une kinésine orpheline) était sécrétée dans le milieu extracellulaire et jouait un rôle dans l'activation de l'activité arginase promouvant ainsi la synthèse de trypanothion (De Muylder et al., 2013) favorable à la croissance du parasite. Dans ce cas, l'arginine n'est pas utilisée par une NO synthase qui intervient dans la voie de mort du parasite par production de composés cytotoxiques mais par une arginase.

Nous pouvons donc supposer qu'au vu du nombre des kinésines existantes chez ce parasite, d'autres fonctions encore inconnues pourraient leur être associées.

e. Les kinésines chez *Trypanosoma brucei*

Chez *T. brucei*, près de 60 protéines sont annotées comme kinésine ou kinésine putative dans la base de données TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (Aslett et al., 2010). Cependant, seulement 45 gènes codent pour des kinésines chez les mammifères (Hirokawa et al., 2009). La présence d'un nombre supérieur de kinésines chez ce parasite pourrait être à l'origine de nouvelles fonctions pour ces dernières. De plus, la classification établie par B. Wickstead et K. Gull révèle la présence de deux nouveaux groupes de kinésines, spécifiques des *Kinetoplastidae* : Kinetoplastid group 1 et Kinetoplastid group 2 (Wickstead and Gull, 2006).

A ce jour, plusieurs kinésines présentes chez ce parasite ont déjà été caractérisées et arborent diverses fonctions, par exemple :

- Kinesin^{CaaX} (Tb927.10.12440) est une kinésine retrouvée uniquement chez les *Kinetoplastidae*. Il a été montré que cette kinésine est farnésylée et qu'elle est essentielle à la survie de la forme sanguine de *T. brucei*. Elle se localise près du noyau et du kinétoplaste, et joue un rôle dans la ségrégation de ces derniers (Engelson et al., 2011).
- TbKIN-C (Tb927.8.2630) est elle aussi spécifique des *Kinetoplastidae* (Kinetoplastid group 2). Cette kinésine est distribuée dans toute la cellule et enrichie au niveau de l'extrémité postérieure (tubuline α tyrosinée). Elle est impliquée dans le maintien de la morphologie cellulaire (Hu et al., 2012b).
- TbKIN-D (Tb927.11.10760) est localisée dans tout le corps cellulaire. Elle est responsable de la régulation du corset sous-pelliculaire et est donc impliquée dans le maintien de l'architecture cellulaire. Il a également été montré que TbKIN-D pouvait interagir avec TbKIN-C (Hu et al., 2012a).
- TbKif13-1 (Tb09.160.2260) est nécessaire à la croissance de la forme sanguine et de la forme procyclique. Cette kinésine est capable de dépolymériser les microtubules et elle joue un rôle dans la régulation du fuseau mitotique (Chan et al., 2010; Dubessay et al., 2006).
- Les kinésines de la famille 9 : TbKIF9A (Tb927.7.6290) qui est localisée à l'axonème et est impliquée dans la motilité. TbKIF9B (Tb927.7.7260) se localise à l'axonème mais aussi au corps basal et est impliquée dans la synthèse du PFR (Demonchy et al., 2009b).

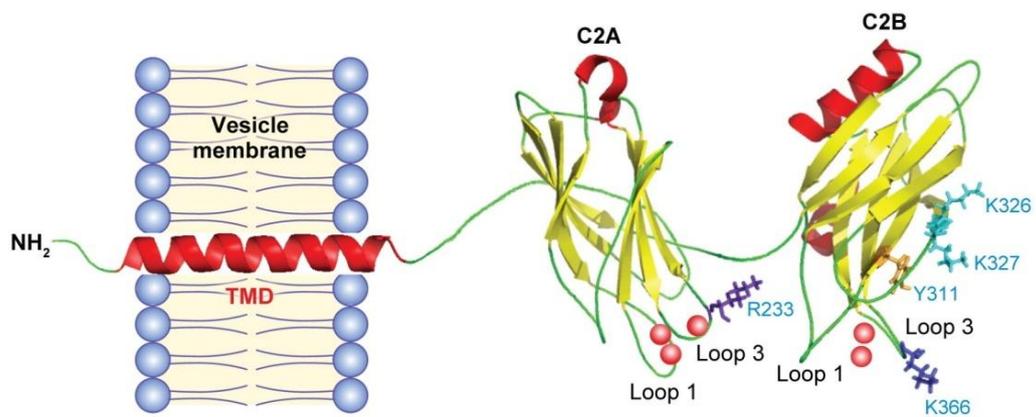


Figure 36 : La synaptotagmine.

Schéma de la structure générale des synaptotagmines composées : d'un court domaine N-terminal intra-vésiculaire, d'un domaine transmembranaire et de deux domaines C2 (C2A et C2B). Issu de : Chapman ER., « How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release ? », 2008.

- TbKHC1 (Tb927.6.4390) est une kinésine orpheline qui n'est pas nécessaire à la prolifération cellulaire. Cependant, cette kinésine est sécrétée et est impliquée dans l'activation de l'activité arginase, favorisant ainsi la croissance des parasites chez l'hôte (De Muylder et al., 2013).

Dans cette thèse, je m'attache à caractériser l'une des kinésines potentielle de *T. brucei*, que nous avons nommé FPC5.

V. Les synaptotagmines

a. Structure

Les synaptotagmines (Syt) forment une famille de protéines membranaires impliquées dans le trafic intracellulaire, dont l'isoforme la mieux caractérisée est Syt1. Elles partagent toutes une structure commune composée d'un domaine transmembranaire unique et de deux domaines C2 (Figure 36), homologues au domaine régulateur C2 de la PKC.

Prenons le cas précis de Syt 1 qui est composée de :

- un domaine N-terminal intra-vésiculaire court, sur lequel sont présents des sites de glycosylation. Deux résidus subissent une O-glycosylation (Fukuda, 2002; Perin et al., 1991) et un résidu une N-glycosylation (Perin et al., 1991), c'est aussi le cas de Syt 2. Cette dernière modification serait responsable de la localisation de Syt 1 sur les vésicules synaptiques (Han et al., 2004).
- un domaine transmembranaire unique. A la jonction entre ce domaine et la zone cytoplasmique se trouvent 5 résidus cystéine (2 sur le domaine transmembranaire et 3 dans la zone cytoplasmique) qui sont des sites potentiels de palmitoylation et de liaison avec d'autres protéines (Heindel et al., 2003), permettant la formation de dimères. Les dimères de synaptotagmines joueraient un rôle dans la prévention de la dégradation, seuls les monomères semblent dégradés.
- un domaine « linker » de liaison entre le domaine transmembranaire et le premier domaine C2. Ce domaine est très variable entre les synaptotagmines que ce soit en séquence ou en longueur (de 43 aa. pour Syt 8 à 417 aa. pour Syt 7). Il porte un site de phosphorylation par la caséine kinase II, cependant

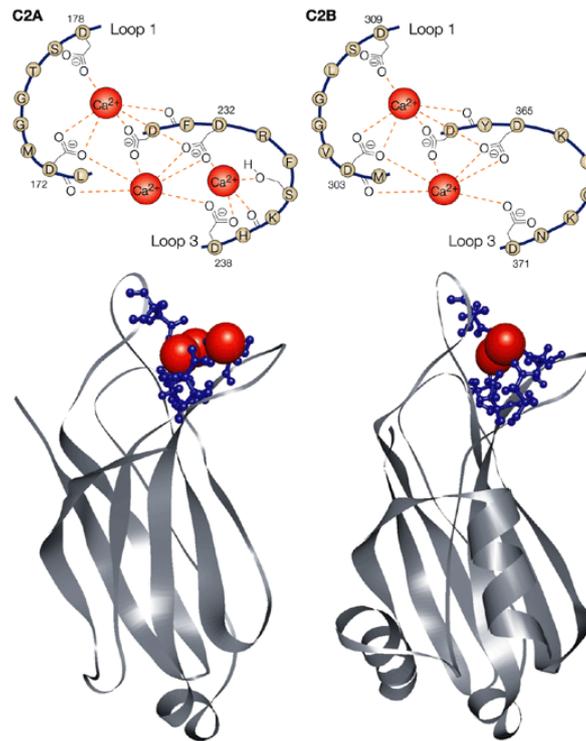


Figure 37 : Les domaines C2 de la synaptotagmine.

Modélisation des deux domaines C2 présentant 8 feuillets β antiparallèles. Les boucles reliant les feuillets peuvent lier 3 ions calcium (rouge) dans le cas de C2A et 2 dans le cas de C2B. Issu de : Chapman ER., « Synaptotagmin : A Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis ? », 2002.

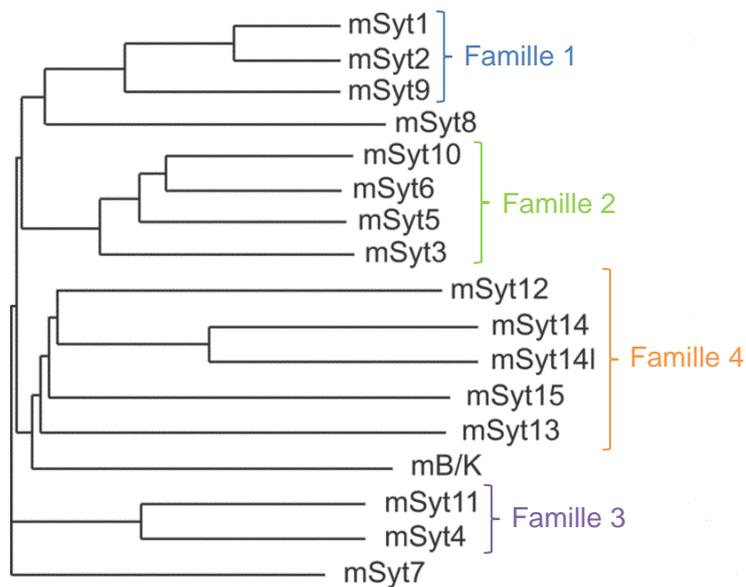


Figure 38 : Arbre phylogénique des synaptotagmines.

Alignement des différentes isoformes de synaptotagmine retrouvées chez la souris. Elles sont regroupées en quatre familles. Modifié à partir de : Gustavsson et coll., « Calcium-sensing beyond neurotransmitters: functions of synaptotagmins in neuroendocrine and endocrine secretion », 2009.

cette phosphorylation n'a jamais été montrée comme ayant un effet fonctionnel (Davletov et al., 1993). On retrouve aussi au centre de ce domaine un site de clivage à la trypsine (Perin et al., 1991).

- deux domaines C2 (de 130-140 aa. chacun), notés : C2A et C2B. Ils sont composés de 8 feuillets β reliés les uns aux autres par des boucles. Ces feuillets sont disposés de façon antiparallèle : 4 feuillets faisant face aux 4 autres (Sutton et al., 1995; Ubach et al., 1998). Au « sommet » des domaines C2, deux des trois boucles sont impliquées dans la liaison au calcium *via* leurs résidus aspartate qui possèdent des charges négatives (Shao et al., 1998). Le domaine C2A est capable de lier 3 ions calcium alors que le C2B ne peut en lier que 2 (Fernandez et al., 2001) (Figure 37). Ces domaines ont une fonction majeure pour les synaptotagmines : ils sont capables de lier les phospholipides et les protéines t-SNARE (SNAP-25 et syntaxine 1) de façon dépendante ou pas du calcium.
- un domaine C-terminal qui chez Syt 1 est impliqué dans la liaison avec la neurexine 1 α et la calmoduline (Perin, 1994; Perin, 1996).

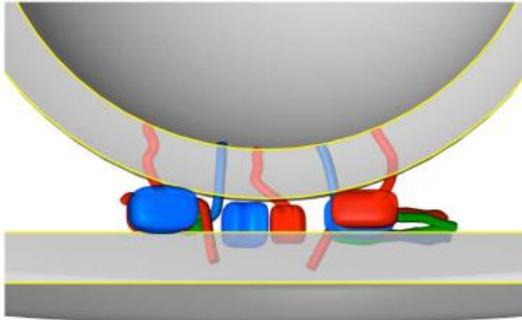
b. Classification

Les synaptotagmines représentent une famille de protéines présentes sous de nombreuses isoformes chez les eucaryotes supérieurs. En effet, seize isoformes Syt 1 à Syt 16, sont décrites chez l'homme et la souris (Craxton, 2004) et 15 chez le rat (Fukuda, 2003). L'homologie entre les isoformes réside majoritairement dans leur domaine C2.

Les isoformes peuvent être classées en familles qui varient en fonction des critères choisis : l'homologie des séquences protéiques des domaines C2A et C2B (Rickman et al., 2004a), la position et le nombre de jonctions introns/exons sur le gène (Südhof, 2002) ou la similitude des séquences peptidiques de l'ensemble de la protéine. Grace à ce dernier type de comparaison, quatre familles se dessinent (Figure 38) :

- la première composée de Syt 1, Syt 2 et Syt 9. Ces synaptotagmines sont retrouvées dans le cerveau, plus précisément sur les vésicules synaptiques, où elles jouent un rôle de senseur calcique.

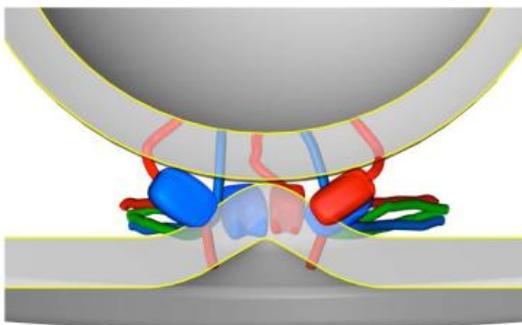
i) docked stage



Ca^{2+}



ii) Ca^{2+} -induced buckling



iii) hemifusion stage

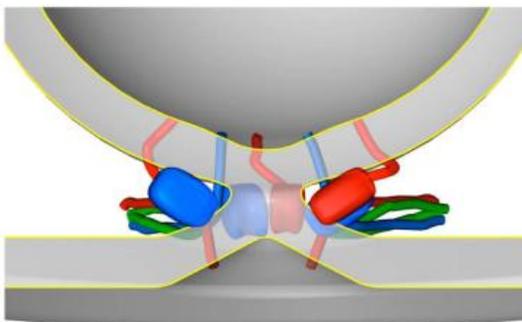


Figure 39 : Mécanisme de la fusion membranaire.

Etape 1 : l'arrimage de la vésicule sur la membrane cible par formation du complexe SNARE (vert). Etape 2 : l'amorçage, un influx calcique entraîne l'insertion des domaines C2 de la synaptotagmine (ovales bleus et rouges) dans la membrane de manière calcium dépendante. Ceci induit une courbure et un rapprochement des membranes. Etape 3 : la fusion. Les deux membranes ainsi rapprochées vont fusionner et former un pore, libérant le contenu de la vésicule. Issu de : Martens et coll., « How synptotagmin promotes membrane fusion », 2007.

- la deuxième comportant Syt 3, Syt 5, Syt 6 et Syt 10, qui sont localisées à la membrane plasmique et sont capables de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium.
- la troisième qui englobe Syt 4 et Syt 11, qui sont caractérisées par la substitution d'un résidu aspartate (qui lie le calcium) sur leur domaine C2A ; elles sont retrouvées dans la région de l'appareil de Golgi.
- la quatrième constituée de Syt 12, Syt 13, Syt 14 et Syt 15, qui ne possèdent pas l'ensemble des résidus aspartate impliqués dans la liaison au calcium

Deux isoformes sont en marge de ces quatre familles : Syt 7 qui d'un point de vue protéique est proche de Syt 4 et Syt 11, et Syt 8 assez proche de Syt 1 (Rickman et al., 2004b).

Toutefois, il semblerait que toutes les synaptotagmines ne soient pas capables de lier le calcium. Les Syt 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 et 10 le sont mais pas les Syt 4, 8, 11, 12, 13, 14 et 15. En effet, on peut observer chez ces synaptotagmines des substitutions au niveau des résidus impliqués dans la liaison au calcium, que se soit sur un (Syt 4 et 11) ou sur les deux domaines C2 (Syt 8, 12 et 13).

c. Fonction : la fusion membranaire

Le fait que la majorité des synaptotagmines sont localisées dans le cerveau et notamment sur les vésicules synaptiques laisse penser qu'elles ont un rôle majeur dans la libération de neurotransmetteurs. La libération de ces molécules implique le phénomène de fusion membranaire qui fait à la fois appel aux protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor) et aux synaptotagmines. Les SNARE sont divisées en deux familles :

- les v-SNARE : synaptobrevine, présente à la membrane de la vésicule,
- les t-SNARE : SNAP-25 et syntaxine-1, retrouvées sur la membrane « cible ».

Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine homologue de 70 résidus, appelé motif SNARE.

Le mécanisme de fusion membranaire (Martens et al., 2007) se déroule en plusieurs étapes (Figure 39) :

- l'arrimage des vésicules à la membrane cible, mettant en jeu des complexes protéiques répondant à un signal contrôlé par des GTPases. L'interaction entre les synaptotagmines et les SNARE de manière indépendante du calcium participe également à l'arrimage des vésicules.
- l'amorçage se fait par l'interaction des protéines SNARE entre elles mais aussi par la liaison du calcium sur les domaines C2 de la synaptotagmine. Ces domaines pénètrent alors dans la membrane cible, induisant une courbure, ce qui favorise le rapprochement des membranes.
- la fusion : une fois rapprochées, les deux membranes vont fusionner, ce qui entraîne la formation d'un pore permettant la libération dans le milieu extracellulaire du contenu de la vésicule.

Dans la base de données TriTrypDB (Aslett et al., 2010), peu de protéines sont annotées comme synaptotagmine putative : une seule chez *T. brucei*, quatre pour les différentes sous-espèces de *T. cruzi*, une chez *T. evansi* et une chez *C. fasciculata*. Aucune de ces protéines n'a été caractérisée. Ici, nous nous attachons à étudier l'une d'entre elles : celle retrouvée chez *T. brucei*, et que nous avons nommé FPC9.

VI. Objectifs

Le parasite *Trypanosoma brucei* est responsable de trypanosomiases Africaines en Afrique sub-Saharienne. Les sous-espèces *Trypanosoma brucei gambiense* et *Trypanosoma brucei rhodesiense* sont la cause de la maladie du sommeil chez l'homme. Quant à la sous-espèce *Trypanosoma brucei brucei* responsable de la maladie appelée Nagana, elle touche le bétail et est à l'origine de pertes économiques extrêmement importantes. Du fait de la variation antigénique du parasite, la vaccination n'est pas envisageable et les traitements actuels sont toxiques et difficiles à mettre en place. Il paraît donc urgent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques de manière à développer de nouveaux médicaments.

Compte tenu des données obtenues précédemment au laboratoire concernant BILBO1 (Bonhivers et al., 2008b), le collier de la poche flagellaire semble être un bon candidat. Cependant, tout reste encore à découvrir concernant sa composition ainsi que sa formation. Bien que des études récentes (Vidilaseris and Dong, 2014; Vidilaseris et al., 2014a; Vidilaseris et al., 2014b) aient permis de mettre en lumière un mécanisme possible d'auto-assemblage de BILBO1 nous ne savons toujours pas comment le collier de la poche flagellaire est assemblé.

Partant de ce postulat, des cribles en double-hybride ont été réalisés (par la société Hybrigenics ainsi qu'au laboratoire) afin d'identifier de nouveaux partenaires de BILBO1. Ces cribles ont permis d'identifier plusieurs partenaires potentiels dont FPC5 et FPC9. Au cours de ma thèse je me suis donc attachée à caractériser ces deux protéines de façon à essayer de mieux comprendre la biogenèse du collier.

Pour cela, j'ai dans un premier temps étudié FPC5 : sa localisation et sa fonction dans la cellule par des techniques d'ARN interférence et de surexpression de diverses tronctions. J'ai également étudié son implication dans la structure du collier en regardant sa capacité d'interagir avec les autres partenaires de BILBO1. Enfin une étude de la fonctionnalité de cette protéine *in vitro* a été réalisée.

Concernant FPC9, des données préliminaires ont été obtenues concernant sa localisation, son rôle dans la cellule (ARN interférence et surexpression) et son interaction avec les autres protéines du collier.

La caractérisation de chacune des protéines est détaillée dans des chapitres distincts.

Toutes ces études ont été réalisées sur le parasite *Trypanosoma brucei brucei*, sous-espèce non pathogène pour l'Homme. Cet organisme est un outil de choix. En effet, il est facilement cultivable en laboratoire, que ce soit la forme sanguine ou la forme procyclique. De plus, son génome a été entièrement séquencé ce qui permet de le manipuler génétiquement et ainsi réaliser les analyses de génomique fonctionnelle nécessaires.

Matériel et Méthodes

I. Matériel

a. Les lignées cellulaires

i. Les parasites

Deux souches de *Trypanosoma brucei brucei* ont été utilisées au cours de ma thèse : la première cultivée sous forme procyclique du parasite Tb427 29.13 (Wirtz et al., 1999a) et l'autre cultivée sous forme sanguine Tb427 90.13 (Hirumi et al., 1980). Ces deux souches ont été au préalable manipulées génétiquement de façon à exprimer de manière constitutive l'ARN polymérase T7 « T7RNAP » (apporté par le plasmide pLew13) et le répresseur Tétracycline « TetR » (apporté par les plasmides pLew29 et pLew90, respectivement pour la forme procyclique et pour la forme sanguine). Afin de maintenir la pression de sélection apportée par ces transformations, les parasites doivent être cultivés en présence d'hygromycine et de néomycine.

Le système obtenu permet l'expression de gènes placés sous la dépendance du promoteur T7 de manière inductible *via* la tétracycline (Peacock et al., 2005).

ii. Les bactéries

Deux souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) ont été utilisées. La première *E. coli* XL1-blue (Xia et al., 2011) est utilisée pour le clonage afin d'amplifier les plasmides. La seconde *E. coli* BL21 (DE3) (Jeong et al., 2009) utilisée pour l'expression de protéines recombinantes de manière inductible.

iii. Les cellules de mammifères

Pour l'expression hétérologue de protéines de *T. brucei*, une lignée cellulaire d'origine mammifère a été utilisée : la lignée de cellule d'ostéosarcome humain de type U-2 OS ATCC® Number : HTB-96 (Niforou et al., 2008). Cette lignée provient de cellules prélevées sur le tibia d'une patiente atteinte de cancer des os (ostéosarcome) en 1964. Elle est facilement cultivable en laboratoire et est intéressante car son protéome a été publié en 2008 (Niforou et al., 2008).

iv. Les levures

Pour le double-hybride, deux souches de levures haploïdes sexuellement compatibles ont été utilisées, permettant la formation de levures diploïdes. Ces souches dérivent de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Elles sont toutes deux auxotrophes pour l'adénine, l'histidine, la leucine, le tryptophane et l'uracile. De plus, elles ne possèdent pas le facteur de transcription GAL4.

La souche Y187 de type MAT α est capable de former des levures diploïdes avec la souche Y2HGold de type MATa.

La souche Y2HGold dérive de la souche PJ69-2A (James et al., 1996) et possède en plus des marqueurs d'auxotrophie, 4 gènes rapporteurs sous la dépendance du promoteur GAL4 :

- deux marqueurs d'auxotrophie : gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de l'histidine et de l'adénine,
- un gène de résistance à l'auréobasidine A,
- un gène codant pour l' α -galactosidase, permettant un crible blanc-bleu.

b. Les milieux de culture

i. Pour le parasite

La forme procyclique *Tb427* 29.13 est cultivée sur milieu SDM79 (Semi Defined Medium 1979) (Brun and Schönenberger, 1979) complété de 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté et d'hémine à 3,5 g/l. Afin de maintenir la pression de sélection des antibiotiques sont ajoutés au milieu : hygromycine à 25 μ g/ml et néomycine à 10 μ g/ml. Ce milieu est noté SDM79+HN. Les parasites sont cultivés dans un incubateur à 27°C et maintenus à une densité cellulaire comprise entre $3 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^7$ cellules/ml dans un volume de culture de 10 ml.

La forme sanguine *Tb427* 90.13 est cultivée sur milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) complété de bicarbonate de sodium à 3,024 g/l, d'hypoxanthine à 0,136 g/l, de pyruvate de sodium à 0,110 g/l, de thymidine à 0,039 g/l, de sulfate

Bathocuprone à 0,028 g/l, de β -mercaptoéthanol à 0,25 mM, de L-cystéine à 1,875 mM, de 10% de sérum de veau foetal décomplémenté et de kanamycine à 62,5 μ g/ml. De même que pour la forme procyclique, de l'hygromycine à 5 μ g/ml et de la néomycine à 2,5 μ g/ml sont ajoutés au milieu afin de maintenir la pression de sélection. Ce milieu est nommé IMDM+HN. Les parasites sont cultivés dans un incubateur à 37°C contenant 5% de CO₂. Les cultures sont maintenues entre 2.10⁵ et 1.10⁶ cellules/ml.

ii. Pour les bactéries

Les différentes souches d'*E. coli* sont cultivées sur milieu LB (Lennox L Broth Base) à 37°C sous agitation. Pour la sélection des cellules transformées des antibiotiques sont ajoutés au milieu : ampicilline à 1 mg/ml ou kanamycine à 50 μ g/ml.

iii. Pour les cellules de mammifères

Les cellules U-2 OS sont cultivées dans le milieu DMEM-Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle Medium) complémenté par 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, de pénicilline à 100 unités/ml et de streptomycine à 100 μ g/ml. Les cultures sont maintenues à 37°C sous 5% de CO₂.

iv. Pour les levures

Les levures haploïdes Y187 et Y2HGold sont cultivées indépendamment sur milieu gélosé YPD (Yeast Peptone Dextrose : extrait de levure à 10 g/l, bactopeptone à 10 g/l et dextrose à 20 g/l) complété d'adénine à 40 mg/l. Les cultures sont incubées à 30°C.

Pour le croisement (production de diploïdes), les deux souches haploïdes MAT_a et MAT _{α} sont cultivées ensemble dans le milieu liquide YPDA 2x (Yeast Peptone Dextrose : extrait de levure à 40 g/l, bactopeptone à 40 g/l, dextrose à 80 g/l et adénine à 80 mg/l). La culture est incubée à 30°C sous agitation à 250 rpm.

Les diploïdes obtenus sont sélectionnés sur milieu gélosé SC (Synthétique Complet : YNB (sans acides aminés et sans sulfate d'ammonium) à 1,7 g/l, sulfate d'ammonium à 5 g/l, CSM à 0,59 g/l et dextrose à 20 g/l) complété d'adénine à 40 g/l, d'histidine à 20mg/l et d'uracile à 20 mg/l. ce milieu est appelé SC-L-W. L'absence de leucine et de tryptophane permet de sélectionner les diploïdes contenant les vecteurs pGADT7 et pGBKT7.

c. Les vecteurs

i. Chez les parasites

Différents vecteurs ont été utilisés chez *T. brucei* afin de réaliser l'ARN interférence et des surexpressions avec ou sans étiquette. Dans tous les cas les vecteurs sont linéarisés pour leur intégration dans une région non-transcrite du génome par recombinaison homologue.

Le vecteur pLew100 (Wirtz et al., 1999a) permet l'expression du gène d'intérêt placé sous la dépendance du promoteur GPEET (promoteur de la procycline, un des seuls promoteurs identifiés et caractérisés chez *T. brucei*) de façon inductible. En effet, en absence de tétracycline, le répresseur TetR va inhiber la transcription du gène placé sous la dépendance du promoteur GPEET en se liant à l'opérateur tétracycline. De plus, ce vecteur possède le gène *BLE* de résistance à la phléomycine sous la dépendance du promoteur T7, permettant la sélection des transformants. Son intégration dans le génome se fait par recombinaison homologue au niveau de la région intergénique non-transcrite de l'ARN ribosomique 18S. Ce vecteur est utilisé pour l'ARN interférence de type tige-boucle ou la surexpression de protéines sans étiquette.

Les vecteurs pLew100-X-myc, pLew100-X-GFP et pLew100-GFP-X ont été construits au laboratoire à partir du vecteur pLew100. Ils permettent l'expression d'une protéine fusionnée à une étiquette c-Myc (3xc-Myc) en C-terminal ou à une étiquette GFP (Green Fluorescent Protein) en N-terminal ou C-terminal.

Le vecteur p2T7-177 (Wickstead et al., 2002a) possède deux promoteurs T7 placés de part et d'autres du gène d'intérêt qui sont inductibles par la tétracycline. Cette conformation permet de transcrire à la fois le brin sens et le brin anti-sens conduisant ainsi à la formation d'un ARN double brin spécifique du gène étudié. Ce vecteur est donc utilisé pour réaliser l'ARN interférence chez le parasite, de manière inductible. L'intégration de ce vecteur dans le génome se fait au niveau des régions répétées présentes sur les mini-chromosomes.

Le vecteur pHD1336 (Alibu et al., 2005; Biebinger et al., 1997) est utilisé pour l'ARN interférence de type tige-boucle. Le gène d'intérêt est placé sous la dépendance du promoteur EP (promoteur de la procycline) et est exprimé de manière inductible. Il s'intègre dans la même région du génome que le pLew100.

Le vecteur pZJM (Wang et al., 2000), tout comme le p2T7-177 possède deux promoteurs T7 opposés placés de part et d'autre du gène d'intérêt. Il permet donc l'expression inductible d'un ARN double brin utilisé pour l'ARN interférence. L'intégration de ce vecteur se fait dans les régions non-transcrites du génome.

ii. Chez les bactéries

Plusieurs vecteurs ont été utilisés pour la production de protéines recombinantes avec différentes étiquettes.

Le vecteur pET28a(+) (Novagen) (Pearson et al., 1999) est utilisé chez la bactérie pour l'expression d'une protéine d'intérêt fusionnée en N-terminal et/ou C-terminal à une étiquette contenant 6 histidines.

Le vecteur pMAL-c2X (New England Biolabs) (Maina et al., 1988) permet l'expression par les bactéries d'une protéine d'intérêt fusionnée en N-terminal à une étiquette MBP (Maltose Binding Protein). Cette étiquette a pour rôle de faciliter le repliement de la protéine à laquelle elle est fusionnée et ainsi d'améliorer la production de protéines solubles. En plus de la MBP on trouve un site de clivage spécifique pour une protéase : le Facteur Xa, permettant d'éliminer l'étiquette.

Le vecteur pGEX-6P-1 (GE Healthcare) (Kaelin Jr. et al., 1992) quant à lui permet l'expression d'une protéine recombinante fusionnée en N-terminal à une étiquette GST (Gluthatione S-Transferase). L'étiquette GST permet de faciliter le repliement de la protéine à laquelle elle est fusionnée et ainsi d'améliorer la production de protéines solubles. On retrouve également un site de clivage spécifique de la protéase PreScission qui permet de séparer la protéine d'intérêt de l'étiquette.

iii. Chez les cellules de mammifères

Deux vecteurs ont été utilisés pour l'expression avec ou sans étiquette.

Le vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen) (Guo et al., 2000) permet l'expression dans les cellules mammifères d'une protéine d'intérêt. Le gène codant pour cette protéine est placé sous la dépendance du promoteur CMV (Cytomégalovirus) (Andersen et al., 2011).

Le vecteur pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen) dérive du pcDNA3.1 et est utilisé pour l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée en C-terminal à une étiquette GFP.

iv. Chez les levures

Deux vecteurs sont utilisés chez la levure. Le premier, le pGADT7 AD permet d'exprimer la protéine d'intérêt fusionnée au domaine d'activation (AD) du facteur de transcription GAL4 (Folter and Immink, 2011). Le gène codant pour la protéine de fusion est placé sous la dépendance du promoteur constitutif *ADH1* (DeMarini et al., 2001). En amont du domaine AD de GAL4 est présente une séquence NLS (nuclear localization signal, séquence d'environ 10 acides aminés riches en arginine, lysine et histidine) (Kalderon et al., 1984) qui permet l'adressage de la protéine de fusion au noyau. Ce plasmide a été utilisé pour transformer les levures Y187.

Le second vecteur, le pGBKT7 permet d'exprimer la protéine d'intérêt fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (BD) du facteur de transcription GAL4 (Folter and Immink, 2011). Tout comme pour le pGADT7 AD, l'expression de la protéine de

fusion est placée sous la dépendance du promoteur *ADH1* (DeMarini et al., 2001). Ce plasmide a été utilisé pour transformer les levures Y2HGold.

II. Méthodes

a. Biologie moléculaire

i. Construction des vecteurs

Afin de construire les différents vecteurs, deux techniques ont été utilisées. La première méthode consiste à amplifier l'insert par PCR, à l'aide d'amorces contenant les sites de restriction présents au site d'insertion sur le vecteur. L'insert est dans un premier temps intégré dans le vecteur de sous-clonage pCR™-Blunt II-TOPO®, en utilisant le kit « Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit » (Invitrogen) et selon les recommandations du fournisseur. Le vecteur obtenu est ensuite digéré par les endonucléases de restriction appropriées, pendant 2 heures à 37°C. Dans le cas de double digestions, elles sont réalisées de façon consécutive. L'insert digéré est purifié après migration sur gel d'agarose, grâce au kit « Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification » (GE Healthcare), selon les recommandations du fournisseur. Les inserts ainsi purifiés sont ligués dans les vecteurs adéquats par la T4 DNA ligase (Proméga), toute la nuit à 16°C.

L'autre méthode de clonage consiste à amplifier le gène d'intérêt par PCR (Advantage® HD Polymerase, Clontech), en utilisant des amorces contenant une région chevauchante avec le vecteur receveur. L'insertion dans le vecteur a été faite par recombinaison *via* l'utilisation du kit « In-Fusion® HD Cloning Kit » (Clontech), selon les recommandations du fournisseur.

ii. Séquençage

Afin de vérifier les vecteurs construits, ils ont été séquencés *via* l'utilisation du kit « BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » (Applied Biosystems) et selon les recommandations du fournisseur. 200 à 400 ng de vecteurs ont été utilisés pour la réaction de séquençage : 30 cycles de 10 secondes à 96°C, 5 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C. L'ADN a été ensuite précipité par de l'éthanol absolu additionné d'EDTA 12,5 mM et d'acétate de sodium 3 M, pH5.2, puis lavé avec de l'éthanol 70%. Cette étape a pour but d'éliminer les sels ainsi que les dNTP et ddNTP non incorporés. Le séquençage a été réalisé par la Plateforme de Génomique

Fonctionnelle de Bordeaux. Les séquences ont été analysées avec le logiciel Autoassembler.

iii. Transformation des bactéries

Les bactéries thermocompétentes ont été transformées par choc thermique. Pour cela, elles ont été incubées avec le vecteur contenant l'insert, 30 minutes sur glace, puis 1 minute à 42°C, suivi de 2 minutes sur glace. Elles ont été ensuite reprises dans 900 µl de milieu LB et placées 1 heure à 37°C. La suspension bactérienne a été étalée sur milieu gélosé : LB_Ampicilline ou LB_Kanamycine (selon le vecteur utilisé), et incubée toute la nuit à 37°C.

iv. RT-PCR semi-quantitative

La première étape consiste à extraire les ARN totaux de *T. brucei*. Pour cela 10⁸ cellules ont été collectées et reprises dans 500 µl de TRIzol RNA (PRIME). Après incubation 5 minutes à température ambiante, 100 µl de chloroforme ont été ajoutés et le tout mélangé au vortex pendant 15 secondes. Le mélange a été centrifugé à 12 000 g pendant 20 minutes à 4°C. On obtient alors deux phases, la phase aqueuse contient les ARN, elle a donc été collectée et mélangée à 250 µl d'alcool isopropylique. L'ensemble a été incubé à -80°C pendant 1 heure avant d'être centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot obtenu a été lavé avec 500 µl d'éthanol 70% puis centrifugé à 7 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot final a été repris dans 50 µl d'eau DEPC et la concentration en ARN de l'échantillon a été évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un nanodrop (1 unité d'absorbance correspond à 40 µg/ml d'ARN).

Avant de réaliser la RT-PCR, les ARN doivent être débarrassés des molécules d'ADN qui contaminent l'échantillon. Pour cela, 10 µg d'ARN ont été traités avec 2U de DNase-TURBO (Ambion) pendant 30 minutes à 37°C. La concentration en ARN a été à nouveau évaluée après traitement à la DNase.

5 ng d'ARN ont été utilisés comme matrice pour la réaction de RT-PCR via le kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA polymerase

(Invitrogen) en utilisant le programme : 30 minutes à 55°C (synthèse ADNc), 2 minutes à 94°C (dénaturation), puis 25 cycles : 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 58°C et 50 secondes à 68°C (amplification).

Une quantité identique de chaque échantillon a alors été déposée sur gel qui après migration a été coloré au BET pour permettre la visualisation de l'ADN. La quantité relative d'ADN a été évaluée *via* le logiciel ImageJ. Afin de vérifier que la quantité d'échantillon déposée sur gel était la même, une réaction de RT-PCR a été réalisée avec un ARN de référence : l'ARN 18S (Brenndörfer and Boshart, 2010).

Des amorces spécifiques de chaque gène ont été utilisées : FPC5 (5'-CGTTAAGTGACGAGATACTG -3' et 5'-ACTACCTCGGCTAAAACGTTG -3'), FPC9 (5'-GGAACCTGTTGTAGTTGTCCC -3' et 5'-TTGGACACGACGTTTAGTGAC -3') et ARN 18S (5'-ACGGAATGGCACCACAAGAC-3' et 5'-GTCCGTTGACGGAATCAACC-3').

b. Le double hybride

Le double-hybride est une technique permettant d'étudier l'interaction entre deux protéines. Il peut être réalisé chez les levures, les bactéries ou les cellules mammifères. Dans notre cas il sera réalisé chez la levure *via* le système Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech). Il est basé sur la reconstitution de l'activité du facteur de transcription GAL4. Pour ce faire, deux protéines de fusion ont été créées : l'une a été fusionnée au domaine activateur de GAL4 (AD), on l'appelle aussi « proie » et l'autre a été fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (BD), on l'appelle « appât ». Afin d'étudier l'interaction dans les deux sens, chaque protéine a été fusionnée à tour de rôle au AD et au BD : c'est à dire protéine 1 fusionnée au AD vs protéine 2 fusionnée au BD (sens 1) et protéine 2 fusionnée au AD vs protéine 1 fusionnée au BD (sens 2). Si les deux protéines testées interagissent entre elles, il y a alors rapprochement des deux domaines du facteur de transcription ce qui permet l'activation de la transcription des gènes rapporteurs placés sous la dépendance de promoteurs régulés par GAL4. Les gènes rapporteurs présents dans le système utilisé sont :

- le gène *ADE2*, qui code pour l'aminimidazole ribonucléotide-carboxylase (AIR-carboxylase) intervenant dans la voie de biosynthèse de l'adénine. Ce gène est placé sous la dépendance du promoteur G2.
- le gène *AUR1-C*, code pour l'inositol-phosphoryl-céramide synthase qui confère la résistance à l'action de l'auréobasidine A, un anti-fongique. Ce gène est placé sous la dépendance du promoteur M1.
- le gène *HIS3*, code pour l'imidazole-glycérol-phosphate déshydratase, une enzyme qui intervient dans la voie de biosynthèse de l'histidine. Ce gène est placé sous la dépendance du promoteur G1.
- le gène *MEL1*, code pour l' α -galactosidase, une enzyme capable d'hydrolyser le X- α -Gal afin de produire un composé coloré en bleu. Ce gène est placé sous la dépendance du promoteur M1.

Les interactions ont été testées sur cinq milieux de sélection différents plus ou moins stringents : SC-L-W-H (sans leucine, tryptophane et histidine), SC-L-W-A (sans leucine, tryptophane et adénine), SC-L-W+AurA (sans leucine, tryptophane, additionné d'auréobasidine A à 125 ng/ml), SC-L-W+X- α -Gal (sans leucine, tryptophane, additionné de X- α -Gal à 40 μ g/ml) et SC-L-W-H-A+AurA+X- α -Gal (sans leucine, tryptophane, histidine, adénine et additionné d'auréobasidine A et de X- α -Gal). Tous ces milieux ont la même base : le milieu gélosé SC complété d'uracile. Le milieu le plus sensible est le milieu SC-L-W-H alors que le milieu le plus stringent est le milieu SC-L-W-H-A+AurA+X- α -Gal, dont quatre gènes rapporteurs sont contrôlés en même temps.

Un test en gouttes a été réalisé pour chaque interaction. Pour ce faire, sept dilutions sériées ont été réalisées (10^8 à 10^2 cellules/ml) et des gouttes de 10 μ l de chaque dilution ont été déposées sur les différents milieux d'interaction.

c. Biologie cellulaire

i. Transfection des parasites

Pour la forme procyclique (*Tb427.29.13*), 3.10^7 cellules ont été collectées et transfectées par électroporation (impulsion électrique : 1600 V, 40 μ F et $R=\infty$) avec 10 μ g de plasmide linéarisé par digestion par l'enzyme NotI. La méthode de

transfection utilisée est celle publiée par Bringaud et al. en 1998 (Bringaud et al., 1998). Une fois transfectées les cellules ont été reprises dans 10 ml de milieu SDM79-HN et incubées à 27°C pendant 24 heures. Le lendemain, 5 ml de culture ont été repris dans 45 ml de milieu conditionné (50% de surnageant de culture de *Tb427.29.13* filtré à 0,2 µm additionné de 50% de milieu SDM79-HN frais et de 10% de SVF) auquel ont été ajoutés les antibiotiques nécessaires à la sélection des transformants : phléomycine (5 µg/ml) et/ou blasticidine (10 µg/ml) et/ou puromycine (1 µg/ml). Les cellules ont ensuite été réparties dans une plaque 24 puits à raison de 2 ml par puits et incubées à 27°C.

Chez la forme sanguine *Tb427.90.13*, 1.10^7 cellules ont été collectées et lavées dans 5 ml de cytomix (KCl 120 mM, HEPES 25 mM (pH7.6), K_2HPO_4/KH_2PO_4 10 mM (pH7.6), $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 2 mM (pH7.6), hypoxanthine 1mM, glucose 0.5% et BSA 100 µg/ml). Elles ont ensuite été reprises dans 100 µl de tampon « Amaxa T-Cell buffer » auquel ont été ajoutés 10 µg de plasmide linéarisé par digestion NotI. Les cellules ont été électroporées suivant le programme « T-Cell (CD4+) mouse X-001 » de l'électroporateur AMAXA (Lonza). Après électroporation les cellules ont été reprises dans 50 ml de milieu IMDM-HN et réparties dans deux plaques 24 puits à raison de 1 ml par puits, avant d'être incubées 24 heures à 37°C sous 5% de CO_2 . Le lendemain, l'antibiotique permettant la sélection des transformants a été ajouté à une concentration 2 fois supérieure à celle requise, là encore à raison de 1 ml par puits : phléomycine (2,5 µg/ml) et/ou blasticidine (10 µg/ml) et/ou puromycine (0,1 µg/ml).

Dans les deux cas, la croissance des pré-clones est suivie régulièrement. Pour la forme procyclique la sélection dure environ deux semaines contre une semaine pour la forme sanguine. Une fois un pré-clone sélectionné, il sera soumis à des dilutions limites en plaque 96 puits (10 cellules, 5 cellules, 1 cellule et 0,5 cellules par puits) de manière à sélectionner une lignée clonale.

ii. ARN interférence chez le parasite

L'ARN interférence (ARNi) est basé sur la présence dans les cellules d'ARN double brin (ARNdb) qui sont reconnus par une ribonucléase de type III appelée

Dicer qui clive ces ARN en petits ARN de 21 à 25 nucléotides appelés ARNsi pour small interfering RNA. Les ARNsi sont alors pris en charge par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Le brin sens est libéré alors que le brin anti-sens va cibler l'ARN messager (ARNm) comportant la séquence complémentaire. Il y a alors activation de l'activité nucléase du complexe RISC, ce qui entraîne la dégradation de l'ARNm ciblé et donc éteint l'expression de la protéine pour laquelle cet ARN code. Chez *Trypanosoma brucei*, l'ARNi a été mis en évidence par E. Ullu et C. Tschudi en 1998 (Ngô et al., 1998).

Chez *T. brucei*, deux systèmes peuvent être utilisés pour produire des ARNdb :

- le premier consiste à insérer en aval d'un promoteur, placé sous la dépendance de l'opérateur tétracycline, une séquence sens et une séquence anti-sens spécifiques du gène à cibler et séparées par au moins une cinquantaine de paires de bases. L'ARNdb produit possédera alors une structure tige-boucle. Les plasmides utilisés sont le pLew100 ou le pHD1336.
- le second consiste à intégrer un fragment complémentaire au gène à cibler entre deux promoteurs de sens opposé et placés sous la dépendance de l'opérateur tétracycline. Cette technique permet la transcription de deux transcrits complémentaires qui vont s'associer pour former un ARNdb. Pour cela il faut utiliser le plasmide pZJM ou le plasmide p2T7-177.

Dans les deux cas l'ARNi a été induite par ajout de tétracycline à la concentration de 1 µg/ml. La croissance des cellules non-induites et induites a été suivie chaque jour par comptage. A chaque passage les cellules ont été diluées pour atteindre 3.10^6 cellules/ml dans le cas des formes procycliques et 2.10^5 cellules/ml pour les formes sanguines.

Pour diminuer l'expression du gène codant pour la protéine FPC5, une séquence cible de 408 pb (2532 – 2940 pb) a été clonée dans les vecteurs : pLew100 et pZJM Cette séquence a été amplifiée en utilisant les amorces : 5'-GATGTTGGTGAGCTTGAGCA-3' et 5'-GAAGTCGTTGCTGCTTTTCC-3'. Dans le cas du système tige-boucle, la séquence anti-sens utilisée contient 89 pb supplémentaires, de façon à former la boucle, et a été amplifiée avec les amorces 5'-GATGTTGGTGAGCTTGAGCA-3' et 5'-CTCCACAGTGGTACTGAGTGT-3'.

Dans le cas de FPC9, une séquence de 550 pb (956 – 1506 pb) a été utilisée pour diminuer l'expression du gène codant pour cette protéine. La séquence d'intérêt a été amplifiée en utilisant les amorces : 5'-CAAACCTGTTGATGTCCGGTGA -3' et 5'-ACTTGACGTATGGGTCCGAGGAGA -3', puis clonée dans les vecteurs : pLew100, pHD1336 et p2T7-177. Pour la construction tige-boucle, la séquence anti-sens utilisée contient 75 pb supplémentaires et a été amplifiée avec les amorces 5'-CAAACCTGTTGATGTCCGGTGA -3' et 5'-CGCCTCAAAGTTGAAATCAGG -3'.

iii. Surexpression chez le parasite

Les parasites ont été dans un premier temps transfectés avec l'un des plasmides suivants : pLew100 (surexpression sans étiquette), pLew100-X-myc, pLew100-X-GFP ou pLew100-GFP-X. Une fois les transformants sélectionnés la surexpression a été induite par ajout journalier de tétracycline à 1 µg/ml. Pour suivre la croissance de cette lignée, à la fois non induite et induite, 3.10^6 cellules/ml ont été mises en culture et comptées chaque jour. Après chaque comptage les cellules ont été diluées afin de revenir à la concentration de 3.10^6 cellules/ml.

iv. Lipofection des cellules U-2 OS

La première étape a consisté à mettre en culture 5.10^4 cellules sur des lamelles dans des plaques 24 puits, ceci 24 heures avant la lipofection. Le lendemain, un mélange contenant : 2 µl de lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) et 0,5 µl de vecteur (pcDNA3 ou pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO) le tout dans 100 µl final d'OPTI-MEM[®] (Invitrogen) a été incubé 30 minutes à température ambiante. Ce mélange a ensuite été déposé goutte à goutte sur les cellules aux préalable reprises dans 200 µl d'OPTI-MEM. Après incubation 2 heures à 37°C sous % de CO₂, le surnageant des cellules a été remplacé par 500 µl de milieu DMEM. Les cellules ont ensuite été replacées en culture à 37°C sous 5% de CO₂.

d. Cytométrie en flux

10⁶ cellules ont été collectées par centrifugation puis lavées en PBS. Elles ont ensuite été resuspendues délicatement dans de l'éthanol 80% et placées 30 minutes à -20°C. Après centrifugation, le culot de cellules a été réhydraté 15 minutes à température ambiante dans du PBS. Les noyaux et kinétoplastes ont été colorés 15 minutes à température ambiante, avec du DAPI 1 µg/ml dans du tampon de coloration (100 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂ et 0.1% NP-40). Les cellules ont été analysées avec le cytomètre BD FACSCanto™ II (BD Biosciences) et les résultats traités avec le logiciel Flowing Software 2.

e. Biochimie

i. Expression et purification de protéines recombinantes

La souche *E. coli* BL21 a été transformée par choc thermique par différents vecteurs d'expression : pET28a(+), pGEX-6P-1 et pMAL-c2X, pour permettre l'expression de protéines recombinantes étiquetées respectivement : 6-histidines, GST ou MBP. La veille de l'expression, une pré-culture a été réalisée dans 10 ml de milieu LB (Lysogeny Broth) additionné soit d'ampicilline (100 µg/ml) soit de kanamycine (50 µg/ml) selon le vecteur utilisé. Le lendemain, cette pré-culture a permis d'ensemencer 250 ml de milieu frais additionné de l'antibiotique adéquat, à une densité optique de 0,05. La culture a été incubée à 37°C sous agitation et l'absorbance à 600 nm est suivie au cours du temps. Une fois que l'absorbance est comprise entre 0,5 et 0,6 ; l'expression de la protéine recombinante a été induite par ajout d'IPTG (isopropyl-b-thiogalactopyranoside) à 0.2, 0.3 ou 1 mM, pendant 1, 2 ou 3 heures à 37°C. La culture a ensuite été centrifugée 20 minutes à 4 000 g. Le culot obtenu a été traité de façon différente selon la protéine recombinante, chaque traitement est détaillé dans les paragraphes qui suivent.

1. Etiquette histidine

Le culot obtenu après induction a été repris dans 25 ml de tampon A (20 mM Tris-HCl pH7.4, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT et Protease inhibitor cocktail set

III EDTA-free (Calbiochem)) auquel ont été ajoutés le lysozyme à 0,1 mg/ml et 1 mM d'ATP. Les cellules ont été lysées par sonication puis centrifugées 30 minutes à 10 000 g à 4°C. Les protéines solubles sont contenues dans le surnageant et ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (HisTrap FF 1 ml, GE healthcare) *via* l'AKTA purifier. Le surnageant a été chargé sur la colonne à 0.5 ml/minute puis la colonne a été lavée avec 15 ml de tampon A. Les protéines étiquetées histidines ont ensuite été éluées par ajout du tampon B (tampon A + 300 mM imidazole). Les protéines de fusion ainsi purifiées ont été directement stockées à 4°C.

2. Etiquette GST

Le culot obtenu après centrifugation des cellules induites a été repris dans 25 ml de tampon A (50 mM Tris-HCl pH7.4, 250 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT et Protease inhibitor cocktail set III EDTA-free (Calbiochem)) auquel ont été ajoutés le lysozyme à 0,1 mg/ml et 1 mM d'ATP. Les cellules ont ensuite été lysées par sonication puis centrifugées à 10 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les protéines solubles sont contenues dans le surnageant et ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne GSTrap FF 1 ml (GE healthcare) *via* l'AKTA purifier. Le surnageant a été chargé sur la colonne à 0.5 ml/minute puis la colonne a été lavée avec 15 ml de tampon A. Les protéines étiquetées GST ont ensuite été éluées par ajout du tampon B (tampon A + 10 mM glutathion réduit). Les protéines de fusion ainsi purifiées ont été directement stockées à 4°C.

3. Etiquette MBP

Le culot obtenu après centrifugation des cellules induites a été repris dans 25 ml de tampon A (20 mM Tris-HCl pH7.4, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1 mM DTT et Protease inhibitor cocktail set III EDTA-free (Calbiochem)) auquel ont été ajoutés le lysozyme à 0,1 mg/ml et 1 mM d'ATP. Les cellules ont ensuite été lysées par sonication puis centrifugées à 10 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les protéines solubles sont contenues dans le surnageant et ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne une MBP Trap HP 1 ml (GE healthcare) *via* l'AKTA purifier. Le surnageant a été chargé sur la colonne à 0.5 ou 1 ml/minute puis la colonne a été

lavée avec 15 ml de tampon A. Les protéines étiquetées GST ont ensuite été éluées par ajout du tampon B (tampon A + 10 mM maltose). Les protéines de fusion ainsi purifiées ont été directement stockées à 4°C.

4. Echangeuse d'anions

Les protéines recombinantes préalablement purifiées sur colonne de nickel ou colonne MBP ont été diluées de façon à se retrouver dans 50 mM de NaCl. Elles ont ensuite été chargées sur une colonne échangeuse d'anions (HiTrap Q HP, GE Healthcare) puis lavées avec un gradient de 15 ml allant de 50 mM à 100 mM de NaCl. L'éluion a ensuite lieu en deux étapes : la première consiste en un gradient de 100 mM à 700 mM de NaCl sur 25 ml. La seconde étape consiste à passer sur la colonne de 5 ml de tampon à 1M de NaCl.

ii. Gel SDS-PAGE et western blot

Les protéines recombinantes, les cellules et les cytosquelettes ont été repris dans du tampon dénaturant noté SB (sample buffer : 40% glycérol, 8% SDS, 200 mM Tris pH6.8, 400 mM DTT et bleu de bromophénol). Dans le cas des cellules et des cytosquelettes, de la benzonase (2U pour 10^8 cellules, Sigma) a été additionnée au SB. Après 5 minutes à température ambiante, les échantillons ont été chauffés 10 minutes à 100°C.

Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse SDS-PAGE, sur des gels de polyacrylamide allant de 8% à 12%. Après électrophorèse, les gels peuvent être colorés au bleu de coomassie (10% acide acétique, 50% éthanol et 2,5 g/l bleu de coomassie R250) toute la nuit à température ambiante puis décolorés dans du tampon de décoloration (25% éthanol, 10% acide acétique, eau MilliQ), pour révéler les protéines totales.

Les gels peuvent aussi être utilisés pour transférer les protéines sur membrane PVDF (polyvinylidene fluoride), *via* un système de transfert semi-sec. Après transfert, les membranes ont été incubées 1 heure à température ambiante dans un tampon de blocage TB (5% lait, 0.2% Tween 20 dans du TBS (Tris-base buffered saline)).

Elles ont ensuite été incubées toute la nuit 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TB. Les anticorps primaires qui ont été utilisés sont : l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC5 dilué au 1/1000, l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 dilué au 1/1000, l'anticorps monoclonal de souris anti-PFR2 (L8C4) dilué au 1/1000, l'anticorps polyclonal de lapin anti- « fluorescent protein living colors » (Clontech) dilué au 1/10000, l'anticorps monoclonal de souris 5F2B3 anti-BILBO1 dilué au 1/10, l'anticorps polyclonal de lapin anti-c-Myc (Sigma) dilué au 1/500, l'anticorps monoclonal de souris anti-polyhistidine (Sigma) dilué au 1/3000, l'anticorps monoclonal de souris anti-MBP (New England Biolabs) dilué au 1/20000 et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-GST (Abcam) dilué au 1/5000.

Après 4 lavages de 10 minutes chacun, soit dans du TB, soit avec 1M NaCl (afin de diminuer la fixation aspécifique), les membranes ont été incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué dans du TB. Les anticorps secondaires qui ont été utilisés sont : l'anticorps de chèvre anti-IgG/IgM de souris conjugué à la HRP (Horse Radish Peroxidase, Jackson) dilué au 1/10000, l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Sigma) dilué au 1/10000 et l'anticorps de souris anti-IgG de chèvre conjugué à la HRP (Santa Cruz) dilué au 1/10000.

Après 4 lavages de 10 minutes dans du TB puis 3 lavages de 5 minutes dans du TBS, les membranes ont été incubées 5 minutes dans le tampon de révélation « Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate » (Millipore). Cette technique de révélation est appelée ECL pour enhanced chemiluminescence, elle se traduit par la production d'un composé luminescent résultant de l'activité de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire. La révélation des membranes a été réalisée soit par exposition de ces dernières sur des films auto-radiographiques soit par utilisation de l'appareil ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

iii. Enzyme Linked Inorganic Phosphate Assay

Pour mesurer l'activité ATPase du domaine moteur de FPC5, nous avons utilisé le kit « Kinesin ELIPA biochem kit » fournis par la société Cytoskeleton. Ce kit est basé sur la mesure de changement d'absorbance (330 – 360 nm) qui a lieu quand le 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine ribonucleoside (MESG) est converti en 2-amino-

6-mercapto-7-methyl purine en présence de phosphate inorganique (Pi). Cette réaction est catalysée par une purine nucléoside phosphorylase (PNP). Sachant qu'une molécule de phosphate inorganique donne une 2-amino-6-mercapto-7-methyl purine, l'absorbance à 360 nm est directement proportionnelle au nombre de molécules phosphate inorganique générées par la réaction ATPase catalysée par la kinésine.

La première étape a consisté à préparer le mélange de réaction composé de : tampon ELIPA (15 mM PIPES pH7 et 5 mM MgCl₂), taxol, microtubules, réactif ELIPA 1 (20 µmoles de 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine riboside) et réactif ELIPA 2 (purine nucleoside phosphorylase). Le mélange a été réparti dans les puits d'une plaque 96 puits auxquels a été ajoutée la kinésine. Juste avant de démarrer la mesure de l'absorbance à 360 nm toutes les 30 secondes, l'ATP a été ajouté dans chaque puits.

f. Imagerie

i. Immunofluorescence

1. Chez les trypanosomes

a. Forme procyclique

Les cellules ont été collectées et lavées en PBS avant d'être déposées 10 minutes sur des lames recouvertes de poly-L-lysine (Sigma). Elles ont ensuite été fixées 10 minutes à température ambiante par du PFA à 3% en PBS puis neutralisées 2 fois 10 minutes par 100 mM de glycine. Après 2 lavages de 5 minutes en PBS, les cellules ont été perméabilisées 10 minutes à température ambiante par du Triton X-100 à 10%. Elles ont ensuite été lavées 2 fois 5 minutes en PBS avant de subir l'immunomarquage.

Pour l'obtention de cytosquelettes une étape supplémentaire est nécessaire. Après dépôt sur lame, les cellules ont été extraites 10 minutes à température ambiante dans du tampon d'extraction (0.25% NP40, 1 mM MgCl₂, 100 mM PIPES pH6.9 en PBS). Après 2 lavages de 5 minutes dans un tampon contenant 100 mM PIPES et 1 mM MgCl₂, les cytosquelettes ont été fixés au PFA comme décrit dans le

paragraphe ci-dessus. L'étape de perméabilisation n'est pas utile, les cytosquelettes ont ensuite été immunomarqués.

Pour l'obtention de flagelles les premières étapes ont été réalisées en tube. Les cellules ont été récoltées et lavées en PBS. Elles ont ensuite été reprises dans du tampon d'extraction pour cytosquelettes (1% NP40, 100 mM PIPES pH6.9 et 1 mM $MgCl_2$) pendant 5 minutes à température ambiante. Après centrifugation de 5 minutes à 5 000 g à 4°C, les flagelles ont été extraits par incubation du culot dans un second tampon d'extraction (1% NP40, 100 mM PIPES pH6.9, 1 mM $MgCl_2$ et 1 M KCl) pendant 15 minutes à 4°C. Après centrifugation de 5 minutes à 5 000 g à 4°C, les flagelles ont été lavés 2 fois dans 100 mM PIPES pH6.9 + 1 mM $MgCl_2$. Ils ont ensuite été déposés sur lame recouverte de poly-L-lysine, fixés au PFA puis immunomarqués.

Pour l'immunomarquage, les cellules, les cytosquelettes ou les flagelles ont ensuite été incubés avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : l'anticorps monoclonal 5F2B3 de souris anti-BILBO1 (Bonhivers et al., 2008b) dilué au 1/5, l'anticorps polyclonal de lapin anti-NTD de BILBO1 (Esson et al., 2012) dilué au 1/50, l'anticorps monoclonal de souris anti-tubuline- α (TAT1) (Woods et al., 1989) dilué au 1/50, l'anticorps polyclonal de lapin anti- « fluorescent protein living colors » (Clontech) dilué au 1/1000, l'anticorps polyclonal de lapin anti-c-Myc (Sigma) dilué au 1/50, l'anticorps de rat anti-tubuline YL1/2 (Kilmartin et al., 1982) (Abcam) dilué au 1/500, l'anticorps monoclonal de souris anti-FAZ1 (L3B2) (Kohl et al., 1999) non dilué, l'anticorps polyclonal de lapin anti-FTZC (Bringaud et al., 2000) dilué au 1/10000, l'anticorps monoclonal de souris anti-TbSAXO (Mab25) (Dacheux et al., 2012) dilué au 1/25, l'anticorps monoclonal de souris anti-corps basal (Mab15) produit au laboratoire et dilué au 1/25, l'anticorps monoclonal de souris anti-corps basal (Mab22) (Bonhivers et al., 2008c) non dilué, l'anticorps monoclonal de souris M10-19 proche de la zone de transition produit au laboratoire et non dilué, l'anticorps monoclonal de souris anti-PFR2 (L8C4) (Kohl et al., 1999) non dilué, l'anticorps monoclonal de souris anti-FPC5 dilué au 1/1000, l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC5 dilué au 1/500 et l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 dilué au 1/100.

Après 2 lavages de 5 minutes en PBS les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS 1 heure à température ambiante. Plusieurs anticorps ont été utilisés : l'anticorps anti-IgG de souris conjugué au FITC (Sigma) dilué au 1/400, l'anticorps anti-IgG de souris conjugué à l'Alexa fluor 594 (Molecular Probes) dilué au 1/400, l'anticorps anti-IgM de souris conjugué au FITC (Jackson) dilué au 1/100, l'anticorps anti-IgM de souris conjugué au Texas red (Jackson) dilué au 1/100, l'anticorps anti-IgG de rat conjugué à l'Alexa fluor 594 (Molecular Probes) dilué au 1/400, l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué au FITC (Sigma) dilué au 1/400, l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa fluor 594 (Molecular Probes) dilué au 1/400 et l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa fluor 647 (Molecular Probes) dilué au 1/400.

Après 2 lavages de 5 minutes en PBS, l'ADN des noyaux et des kinétoplastes a été coloré 4 minutes à température ambiante au DAPI à 10 µg/ml. Pour finir les lames ont été montées avec du « Slowfade light antifade » (Molecular Probes) et observées au microscope Zeiss Imager Z1 (objectif 100X). Les images ont été capturées grâce à la caméra Photometrics Coolsnap HQ2 et au logiciel Métamorph® et traitées avec le logiciel ImageJ.

b. Forme sanguine

Les cellules ont été collectées et lavées en VPBS (NaCl 0.8 mg/ml, KCl 0.22 mg/ml, Na₂HPO₄ 22.7 mg/ml, KH₂PO₄ 4.4 mg/ml, sucrose 15.7 mg/ml et glucose 1.8 mg/ml). Elles ont ensuite été reprises dans du PFA à 3% final pendant 5 minutes à 4°C puis centrifugées 10 minutes à 800 g. Le culot a été repris dans du VPBS et les cellules ont été déposées sur lame. Il faut ensuite laisser sécher complètement la lame pour que les cellules adhèrent puis ces dernières ont été réhydratées 2 fois 5 minutes dans du PBS. Elles ont ensuite été placées 10 minutes dans du méthanol à -20°C pour permettre leur perméabilisation, puis lavées 2 fois 5 minutes en PBS avant d'être immunomarquées.

Pour l'obtention de cytosquelettes, les cellules ont été collectées et lavées en VPBS (NaCl 0.8 mg/ml, KCl 0.22 mg/ml, Na₂HPO₄ 22.7 mg/ml, KH₂PO₄ 4.4 mg/ml, sucrose 15.7 mg/ml et glucose 1.8 mg/ml). Elles ont été ensuite reprises dans du

tampon d'extraction (0.25% NP40, PIPES 100 mM pH6.9, MgCl₂ 1 mM) et déposées immédiatement sur des lames recouvertes de poly-L-lysine. Après 10 minutes, les cytosquelettes ont été lavés 2 fois dans 100 mM PIPES pH6.9 + 1 mM MgCl₂. Ils ont ensuite été fixés au PFA 3% comme pour les formes procycliques et après neutralisation à la glycine, ils ont été immunomarqués.

Pour l'immunomarquage, les cellules ou les cytosquelettes ont ensuite été incubés avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : l'anticorps monoclonal de souris anti-FPC5 dilué au 1/1000 et l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 dilué au 1/100.

Après 2 lavages de 5 minutes en PBS les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS 1 heure à température ambiante. Plusieurs anticorps ont été utilisés : l'anticorps anti-IgM de souris conjugué au FITC (Jackson) dilué au 1/100 et l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué au FITC (Sigma) dilué au 1/400.

Après 2 lavages de 5 minutes en PBS, l'ADN des noyaux et des kinétoplastes a été coloré 4 minutes à température ambiante au DAPI à 10 µg/ml. Pour finir les lames ont été montées avec du « Slowfade light antifade » (Molecular Probes) et observées au microscope Zeiss Imager Z1 (objectif 100X). Les images ont été capturées grâce à la caméra Photometrics Coolsnap HQ2 et au logiciel Métamorph® et traitées avec le logiciel ImageJ.

2. Chez les cellules U-2 OS

Les lames sur lesquelles ont été cultivées les cellules ont été lavées en tampon EMT (PIPES 60 mM (pH6.9), Hepes 25 mM, EGTA 10 mM et MgCl₂ 10 mM). Les cellules ont ensuite été fixées 10 minutes à température ambiante avec du PFA 3% en tampon EMT, puis neutralisées avec 100 mM de glycine en PBS durant 10 minutes. Une fois lavées 2 fois 5 minutes en PBS, les cellules ont été perméabilisées

dans un tampon contenant 0.1 % de saponine et 10 % de SVF en PBS, pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été immunomarquées.

Pour obtenir des cytosquelettes, les cellules ont été extraites après le premier lavage en tampon EMT. Pour cela, elles ont été incubées dans le tampon d'extraction (0.5 % Triton-X100 et 10 % glycérol en tampon EMT) pendant deux minutes à 37°C. Elles ont ensuite subi les étapes de fixation, neutralisation et perméabilisation décrites dans le paragraphe ci-dessus. Les cellules ainsi obtenues sont dites extraites et vont pouvoir être immunomarquées.

Pour l'immunomarquage, les cellules ont été dans un premier temps incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire. Plusieurs anticorps primaires ont été utilisés : l'anticorps monoclonal 5F2B3 de souris anti-BILBO1 dilué au 1/20 ; l'anticorps de souris anti-tubuline- α DM1A (Sigma T9026) dilué au 1/500 et l'anticorps polyclonal de lapin anti- « fluorescent protein living colors » (Clontech 632460) dilué au 1/1000.

Après 2 lavages de 5 minutes chacun en tampon PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante. Les différents anticorps secondaires qui ont été utilisés sont : l'anticorps anti-IgM de souris conjugué au Texas red (Jackson) dilué au 1/100 ; l'anticorps anti-IgG de souris conjugué à l'Alexa fluor 647 (Molecular Probes) dilué au 1/400 et l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué au FITC (Sigma) dilué au 1/400.

Après 2 nouveaux lavages en PBS de 5 minutes, l'ADN des noyaux a été marqué au DAPI à 0.25 μ g/ml pendant 4 minutes à température ambiante. Pour finir, les lamelles ont été montées sur des lames avec du « Slowfade Gold antifade » (Molecular Probes) et après 24 heures de séchage, elles ont été observées au microscope Zeiss Imager Z1 (objectif 63X). Les images ont été capturées grâce à la caméra Photometrics Coolsnap HQ2 et au logiciel Métamorph[®] et traitées avec le logiciel ImageJ.

ii. Comptages automatiques

Les cellules ont été récoltées puis lavées 3 fois en PBS. Elles ont ensuite été reprises en PBS à une concentration de 4.10^6 cellules/ml avant d'être déposées 10 minutes sur une lame Superfrost. Les cellules ont ensuite été fixées 10 minutes à température ambiante avec 2% de PFA en PBS. Les lames ont été placées 30 minutes à -20°C dans du méthanol pour perméabiliser les cellules puis réhydratées 5 minutes dans du PBS. Les cellules ont été traitées 1 heure à température ambiante avec 50 $\mu\text{g/ml}$ de RNase A (Sigma) puis les noyaux et les kinétoplastes ont été colorés 2 minutes à température ambiante avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de DAPI et 40 $\mu\text{g/ml}$ d'iodure de propidium. Les lames ont été lavées 3 fois en PBS puis montées avec du Slowfade gold antifade (Molecular Probes). Pour finir, elles ont été observées au microscope Zeiss Imager Z1 (objectif 40X). Les images ont été capturées grâce à la caméra Photometrics Coolsnap HQ2 et au logiciel Métamorph[®] et traitées avec le logiciel ImageJ.

iii. Microscopie électronique

Les cellules ont été récoltées par centrifugation puis resuspendues dans du PBS sur du « Nescofilm ». Les cellules ont ensuite été adsorbées sur des grilles recouvertes de carbone, 15 minutes à température ambiante.

Pour obtenir des flagelles, les cellules sur les grilles ont été extraites 15 minutes à température ambiante dans du tampon PEME (100 mM PIPES, 1 mM MgSO_4 , 0.1 mM EDTA, 2mM EGTA (pH6.9)) additionné de 1% de NP40. Après lavage en tampon PEME, les cellules ont été extraites dans du tampon PEME additionné de 1% NP40 et de 1 M KCl, pendant 20 minutes à 4°C . Les flagelles ont ensuite été lavés 4 fois 5 minutes à température ambiante dans du tampon PEME et fixés avec du PFA 2%, 5 minutes à température ambiante. Après 4 lavages de 5 minutes à température ambiante dans 100 mM glycine en PBS, les grilles ont été incubées 2 fois 10 minutes dans du tampon de saturation (0.1% BSA, 0.1% Tween 20 en PBS). Elles ont ensuite été incubées 4 heures à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les anticorps primaires qui ont été utilisés sont : l'anticorps monoclonal de souris anti-FPC5 dilué au 1/250 et l'anticorps monoclonal 5F2B3 de souris anti-

BILBO1 (Bonhivers et al., 2008b) non-dilué. Après 2 nouvelles incubations de 10 minutes dans du tampon de saturation, les grilles ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgM de souris conjugué à des billes d'or de 15 nm (British Biotech) dilué au 1/50. Les grilles ont été ensuite transférées 5 minutes dans du tampon de saturation puis 2 fois 5 minutes dans du PBS. Elles ont ensuite été fixées avec 2.5% de glutaraldehyde et colorées négativement avec un ratio 1:1 de NanoVan (Méthylamine Vanadate) et NanoW (Méthylamine Tungstate – Nanoprobes). Les échantillons ont été observés au microscope électronique MET FEI TECNAI 12 TEM.

FPC5 un nouveau partenaire de BILBO1

Ce chapitre fait l'objet d'une publication en cours de préparation.

Dans le but de mieux comprendre la biogenèse et l'organisation du collier de la poche flagellaire de *Trypanosoma brucei*, des partenaires de BILBO1 ont été recherchés par la technique du double-hybride. Pour ce faire, BILBO1 a été fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 - ceci afin de servir d'appât - alors qu'une banque d'ADN génomique de *T. brucei* a été fusionnée au domaine d'activation de ce même facteur de transcription.

Ce crible a été réalisé par la société Hybrigenics et a permis d'identifier des partenaires potentiels de BILBO1 : parmi eux, une protéine que nous avons appelée FPC5.

Puisqu'aucune donnée concernant FPC5 n'était retrouvée dans la littérature, j'ai donc au cours de ma thèse cherché à caractériser cette protéine en étudiant son interaction avec BILBO1, sa localisation, son rôle chez le parasite, ainsi que sa fonctionnalité.

I. Carte d'identité de FPC5

FPC5 est codée par le gène *Tb927.7.3000*, d'une longueur de 4029 paires de bases (pb) et présente dans le génome en une seule copie, sur le chromosome 7. La protéine codée par ce gène a une taille de 1342 acides aminés (aa.) soit une masse moléculaire d'environ 151 kDa. L'étude du niveau de transcription entre les différentes phases du cycle cellulaire montre que le taux d'ARNm de FPC5 augmente légèrement lors de la phase S (Archer et al., 2011). De plus, le taux d'ARNm de FPC5 est très légèrement plus élevé chez la forme procyclique que chez la forme sanguine (Jensen et al., 2009).

Contrairement à BILBO1, FPC5 n'est retrouvée dans aucun des protéomes flagellaires de *T. brucei* (Broadhead et al., 2006; Ralston et al., 2009; Subota et al., 2014). De plus, le phosphoprotéome réalisé sur les formes sanguines (Nett et al., 2009) révèle 4 sites de phosphorylations : S284, T286, S287 et T295.

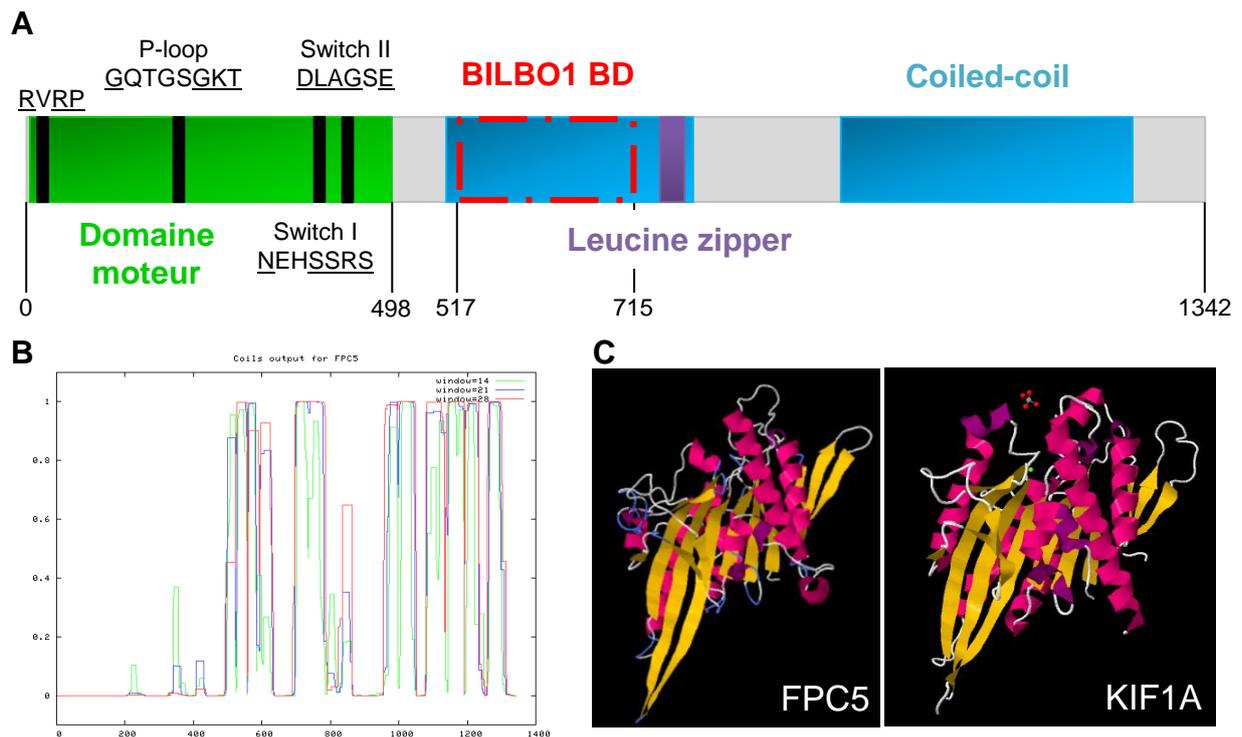


Figure 40 : Structure de FPC5.

A. Schéma de la structure primaire de FPC5 qui contient deux régions coiled coil prédites (bleu), la première contenant le domaine de liaison à BILBO1 (rouge) identifié en double-hybride par la société Hybrigenics. Une séquence leucine zipper (violet) ainsi qu'un domaine moteur en N-terminal (vert), contenant les sites de liaison à l'ATP (noir). Les résidus soulignés sont ceux conservés. **B.** Prédiction des domaines colied-coil par le serveur COILS. **C.** Prédiction de la structure 3D du domaine moteur de FPC5 (gauche) par le logiciel Phyre2. Similarités importantes avec la structure cristallographique du domaine moteur de KIF1A murin (droite, RCSB Protein Data Bank). En effet, on retrouve les 6 hélices α et les 7 feuillets β qui forment le site catalytique.

Dans la base de données TriTrypDB (Aslett et al., 2010) (<http://tritypdb.org/tritypdb/>) FPC5 est annotée comme kinésine putative, ce qui la rend particulièrement intéressante car dans le crible double-hybride peu de protéines trouvées avaient une fonction putative.

Nous avons donc utilisé plusieurs logiciels de prédiction de façon à mettre en lumière les différents domaines de FPC5. Le serveur InterPro (Hunter et al., 2012) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) nous a permis d'identifier un domaine moteur (Figure 40A) commun aux kinésines, présent sur l'extrémité N-terminale de la protéine (aa. 4-498). La localisation du domaine moteur en N-terminal est caractéristique des kinésines assurant le transport antérograde. En regardant plus en détail, il s'avère que l'on retrouve dans ce domaine moteur prédit les quatre motifs impliqués dans la liaison à l'ATP : P-loop (GQTGSGKT), Switch-I (NEHSSRS), Switch-II (DLAGSE) et le motif N4 (RVRP).

Le serveur COILS (Lupas et al., 1991) (www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) nous a permis de mettre en évidence la présence de deux régions potentiellement riches en domaines coiled-coil (aa. 501-862 et aa. 952-1304, Figure 40B). Les domaines coiled-coil sont retrouvés chez de nombreuses protéines de fonctions diverses et sont impliqués dans l'oligomérisation de protéines. Ils sont composés de 2 ou plusieurs hélices α capables de s'enrouler l'une autour de l'autre. Chaque tour d'hélice est composé de 7 acides aminés notés de *a* à *g*. L'interaction entre les hélices est possible grâce aux résidus *a* et *d* qui permettent d'établir des interactions hydrophobes. Quant aux résidus *e* et *g*, ils sont chargés et permettent des interactions ioniques.

En revanche, le serveur TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) ne prédit aucun domaine transmembranaire.

Une prédiction de la structure tridimensionnelle du domaine moteur de FPC5 a été réalisée à l'aide du serveur Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009) (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/index.cgi). La structure obtenue présente de grandes similitudes avec des structures déjà connues, telle que celle du domaine moteur de la kinésine KIF1A murine (Figure 40C). En effet, on retrouve les 6 hélices α ainsi que les 7 feuillets β qui forment la « poche » permettant d'accueillir l'ATP et contenant : les motifs Ploop, Switch-I et II et N4.

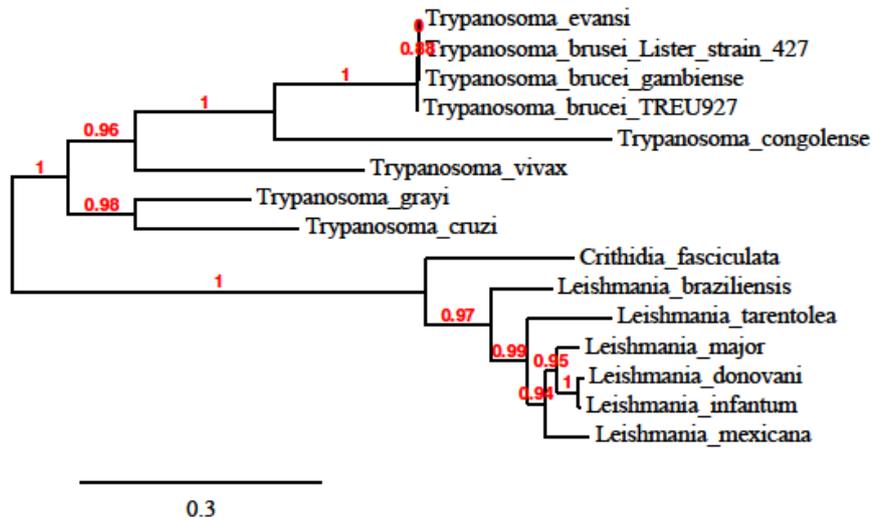


Figure 41 : Homologues de FPC5 chez les *Kinetoplastidae*.

Arbre phylogénétique des 15 homologues de FPC5 chez les *Kinetoplastidae*, réalisé avec le logiciel Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>).

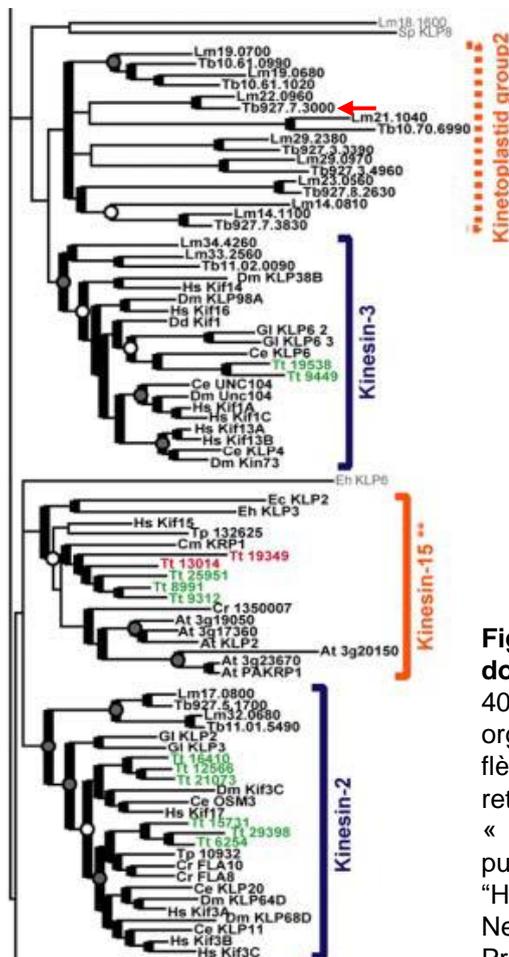


Figure 42 : Arbre phylogénétique des domaines moteur de kinésines.

400 séquences provenant de 19 organismes différents ont été utilisées. La flèche rouge indique FPC5 qui est retrouvée dans un nouveau groupe : « kinetoplastid group 2 ». Issu de la publication : Wickstead et coll., « A "Holistic" Kinesin Phylogeny Reveals New Kinesin Families and Predicts Protein Functions », 2006.

De part sa fonction putative de kinésine, FPC5 possède des homologues chez les autres *Kinetoplastidae* mais aussi chez les eucaryotes.

En effet, chez les autres *Kinetoplastidae* on retrouve des homologues avec une identité comprise entre 33 et 100% (*T. brucei* spp. \approx 100%, *T. evansi* \approx 100%, *T. congolense* \approx 52%, *T. grayi* \approx 50%, *T. vivax* \approx 47%, *T. cruzi* \approx 47%, *C. fasciculata* \approx 35% et *Leishmania* spp. entre 33 et 35%). Lorsque l'on regarde l'arbre phylogénétique (Figure 41), deux branches évolutives semblent se dessiner : la première contenant les espèces du genre *Trypanosoma* et la seconde celles du genre *Leishmania* ainsi que *C. fasciculata*.

De plus, d'après la classification de Wickstead *et al.* (Wickstead and Gull, 2006) FPC5 appartiendrait à une nouvelle famille de kinésines spécifiques des *kinetoplastidae* « kinetoplastid group 2 » (Figure 42), suggérant peut être une nouvelle fonction pour les kinésines de ce groupe. En effet, le nombre de kinésines putatives retrouvées chez *T. brucei* est nettement supérieur à celui chez l'homme, respectivement 58 (donnée TriTrypDB) contre 45. Cependant le « kinetoplastid group 2 » est proche des familles 2 et 3, qui sont respectivement impliquées dans le transport intraflagellaire - rôle dans la biogénèse des cils et des flagelles - et le transport d'organites. Une implication de FPC5 dans une de ces voies n'est donc pas à exclure.

II. FPC5 une protéine des corps basaux

a. Production d'un anticorps polyclonal

Afin d'étudier FPC5, un anticorps polyclonal a été produit chez le lapin. Pour cela, FPC5 fusionnée à une étiquette 6-histidines en C-terminal a été exprimée chez la bactérie *E. coli* BL21. Des tests de solubilité ont montré que la protéine de fusion est insoluble. Le culot contenant la protéine a donc été repris dans un tampon dénaturant à 8 M d'urée pour solubiliser les protéines présentes dans les corps d'inclusion. Les protéines ainsi solubilisées ont été purifiées par affinité sur colonne de nickel puis dialysées contre 6 M d'urée. FPC5::His purifiée a ensuite servi à immuniser des lapins pour produire un anticorps polyclonal.

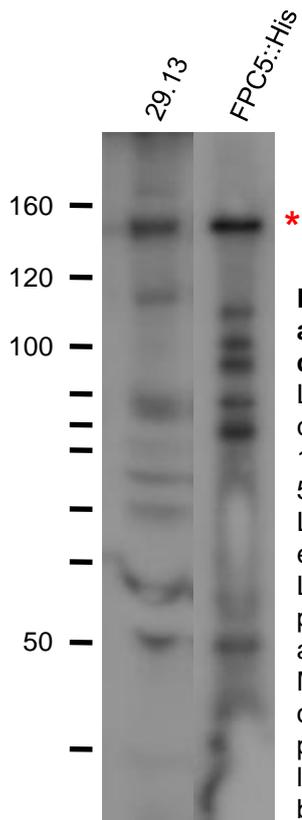


Figure 43 : Western blot avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC5.

L'anticorps est testé sur des cytosquelettes provenant de 10^7 cellules *Tb427* 29.23 et 50 ng de FPC5::His purifiée. Le poids moléculaire attendu est 151 kDa (astérisque). L'anticorps reconnaît la protéine recombinante mais aussi la protéine endogène. Malgré l'utilisation d'inhibiteurs de protéases la protéine semble dégradée car l'anticorps reconnaît plusieurs bandes.

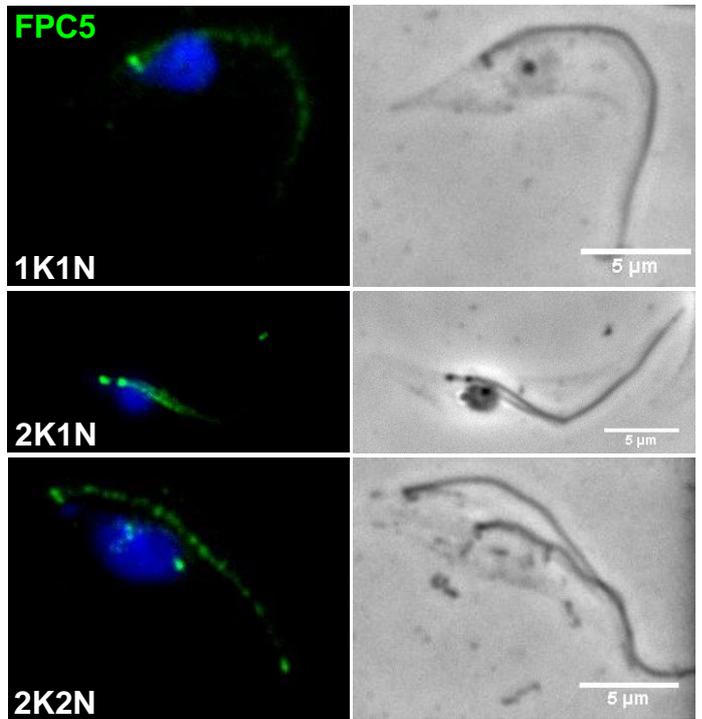


Figure 44 : Localisation de FPC5 dans les formes procycliques.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *Tb427* 29.13. Les cytosquelettes sont marqués avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC5 (vert). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). FPC5 semble se trouver aux corps basaux mais aussi sur le flagelle.

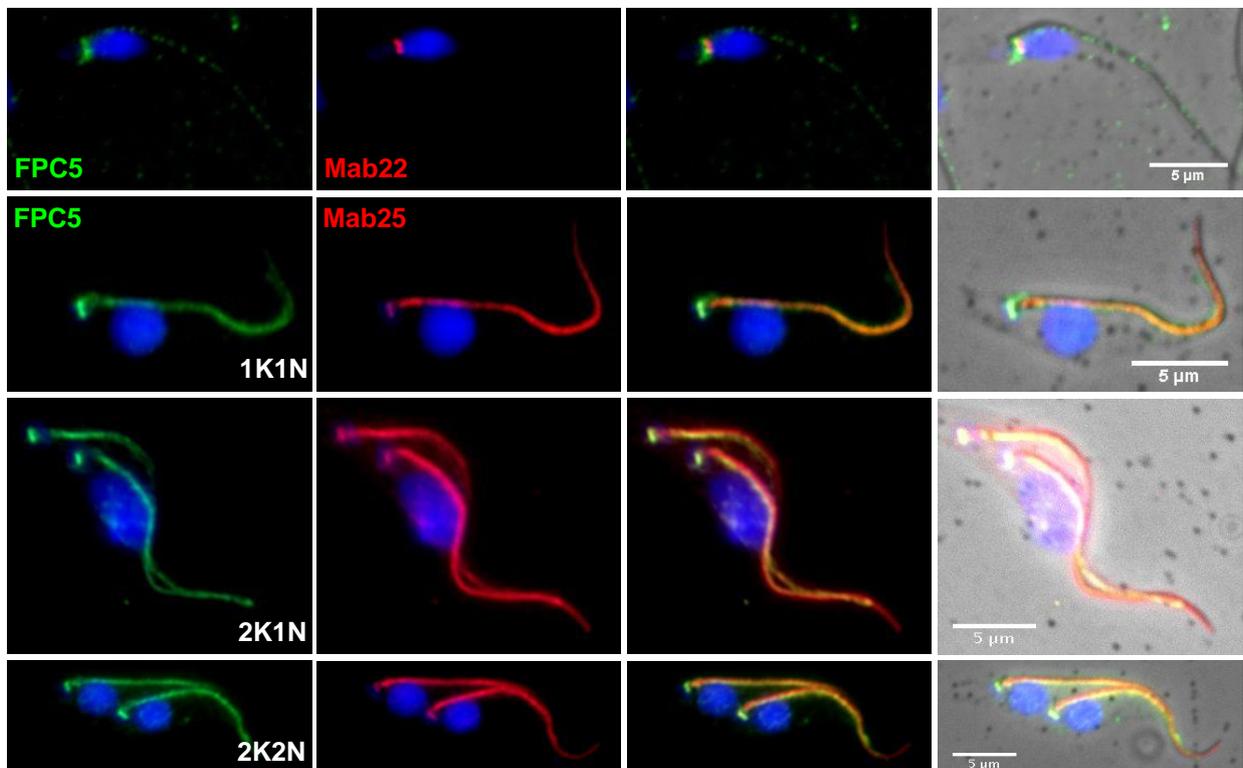


Figure 45 : Localisation de FPC5.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *Tb427* 29.13. Les cytosquelettes sont marqués avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC5 (vert) et l'anticorps Mab22 (rouge) ou l'anticorps Mab25 (rouge). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). FPC5 est colocalisée avec Mab25 sur l'axonème.

L'anticorps a été testé à la fois par immunofluorescence (traité dans le paragraphe suivant) et par western blot. Par cette dernière technique, l'anticorps est capable de reconnaître la protéine recombinante purifiée. On observe une bande à la taille attendue ≈ 151 kDa mais aussi des bandes à des tailles inférieures correspondant à la dégradation de la protéine (Figure 43), bien que des inhibiteurs de protéases aient été ajoutés à la préparation. L'anticorps a aussi été testé sur des cytosquelettes de parasites. Dans ce cas il reconnaît aussi une bande à la taille attendue (Figure 43). D'autres bandes sont marquées, elles peuvent correspondre, soit à des produits de dégradation de FPC5, soit à une fixation aspécifique de l'anticorps sur d'autres protéines du parasite. Là aussi, des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés pour éviter la dégradation des protéines. Nous avons également testé le lavage des membranes de western blot avec 1M NaCl pour éliminer la fixation aspécifique de l'anticorps mais cela n'a rien changé au profil obtenu.

Bien que pas complètement propre (reconnaissance de plusieurs bandes) l'anticorps polyclonal anti-FPC5 produit chez le lapin fonctionne en western blot (bande plus intense à la taille attendue) et va donc nous permettre de suivre la protéine lors de l'ARN interférence ou de la surexpression.

b. Localisation de FPC5 via l'utilisation d'anticorps

La localisation de FPC5 a été étudiée de différentes façons : soit par immunofluorescence directe sur les parasites de référence *Tb427 29.13* en utilisant l'anticorps anti-FPC5 polyclonal de lapin ou un anti-FPC5 monoclonal de souris, soit par immunofluorescence sur des parasites modifiés pour exprimer de manière endogène FPC5 étiquetée c-Myc en C-terminal ou modifiés pour surexprimer FPC5 étiquetée GFP (Green Fluorescent Protein) en N-terminal.

Dans ce paragraphe nous détaillons la localisation de FPC5 par l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette protéine. Le premier est l'anticorps polyclonal de lapin produit au laboratoire. Des immunofluorescences ont été réalisées en marquant des cytosquelettes de la forme procyclique avec cet anticorps polyclonal de lapin anti-FPC5. Il révèle une localisation dans la région des corps basaux ainsi qu'au niveau

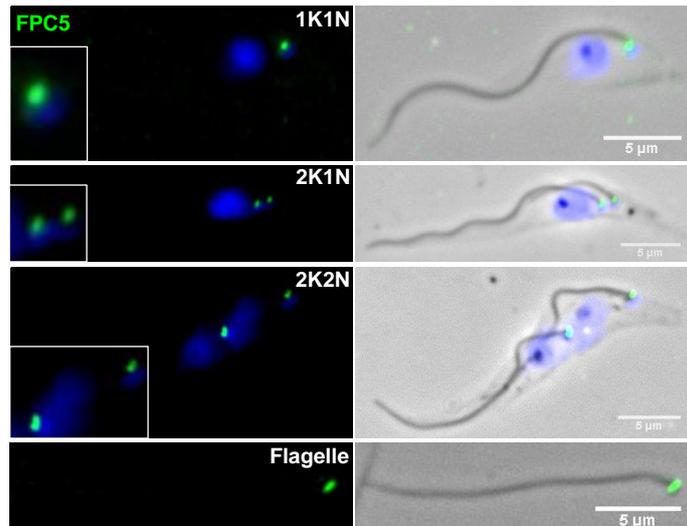


Figure 46 : Localisation de FPC5 dans les formes procycliques.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes et des flagelles de *Tb427 29.13*. Les cytosquelettes et les flagelles sont marqués avec un anticorps monoclonal de souris anti-FPC5 (vert). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). L'anticorps monoclonal montre une localisation uniquement dans la zone des corps basaux.

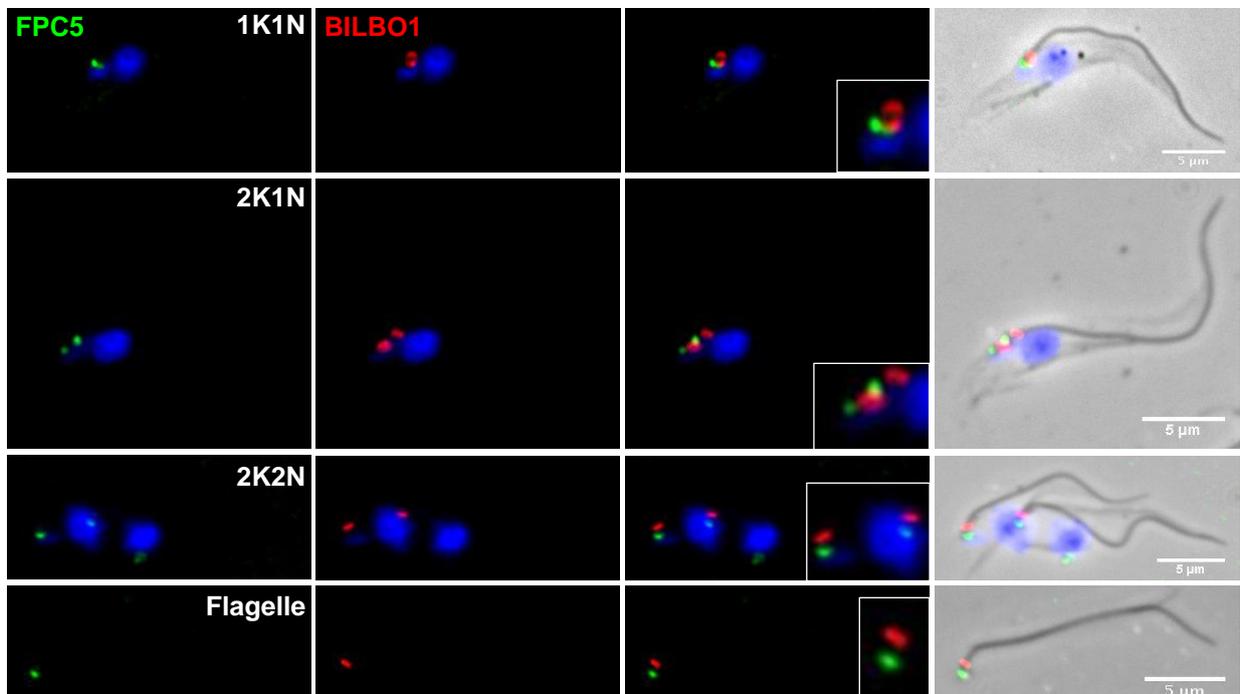


Figure 47 : Localisation de FPC5.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes et des flagelles de *Tb427 29.13*. Les cytosquelettes et les flagelles sont marqués avec un anticorps monoclonal de souris anti-FPC5 (vert) et un anticorps de lapin anti-BILBO1 (rouge). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). Par ces expériences nous n'observons pas colocalisation entre FPC5 et BILBO1.

du flagelle (Figure 44). Pour aller plus en détail dans la localisation de FPC5 nous avons réalisé un comarquage avec un marqueur des corps basaux : Mab22 (Bonhivers et al., 2008c) et de l'axonème : Mab25 (Dacheux et al., 2012). On observe alors une colocalisation entre l'anti-FPC5 et Mab25 mais aussi entre l'anti-FPC5 et Mab22 (Figure 45). FPC5 semble donc être localisée aux corps basaux mais aussi sur l'axonème ce qui est similaire à la localisation des protéines impliquées dans le transport intraflagellaire (IFT). FPC5 pourrait donc jouer un rôle dans ce transport.

Afin de confirmer cette localisation, un autre anticorps produit chez la souris et obtenu dans le cadre d'une collaboration a été utilisé. Le paragraphe ci-dessous s'attache à décrire la localisation obtenue avec cet anticorps.

Une collaboration avec le Professeur Klaus Ersfeld (Laboratory of Molecular Parasitology, Department of Genetics, University of Bayreuth, Allemagne), nous a permis d'acquérir un second anticorps anti-FPC5 : un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le domaine C-terminal (aa. 820 – fin) de FPC5. Cet anticorps utilisé pour marquer des cytosquelettes de *T. brucei* forme procyclique révèle une localisation de FPC5 dans la région des corps basaux, proche du kinétoplaste (Figure 46). Cette localisation reste la même quelle que soit la phase du cycle cellulaire (1K1N, 2K1N et 2K2N). De plus un marquage réalisé sur des flagelles de forme procyclique montre également un signal aux corps basaux suggérant que FPC5 est une protéine flagellaire (Figure 46).

Pour étudier plus en détail la localisation de FPC5 nous avons réalisé des comarquages de FPC5 avec différentes structures de la cellule : le collier de la poche : monoclonal anti-BILBO1 (Bonhivers et al., 2008b), la zone de transition : anti-FTZC (Bringaud et al., 2000) et les fibres de transition qui entourent le corps basal mature : YL1/2 (Kilmartin et al., 1982; Stephan et al., 2007). FPC5 ayant été trouvée par un crible en double-hybride utilisant BILBO1 comme appât nous pouvions nous attendre à une colocalisation entre les deux partenaires. Or, ce n'est pas le cas. En effet, par cette technique FPC5 n'est pas colocalisée avec BILBO1 au collier de la poche flagellaire (Figure 47). En revanche, une colocalisation est observée avec YL1/2 dans la région des corps basaux (Figure 48). FPC5 est donc une protéine des corps basaux. Cependant, pour des dilutions plus faibles de

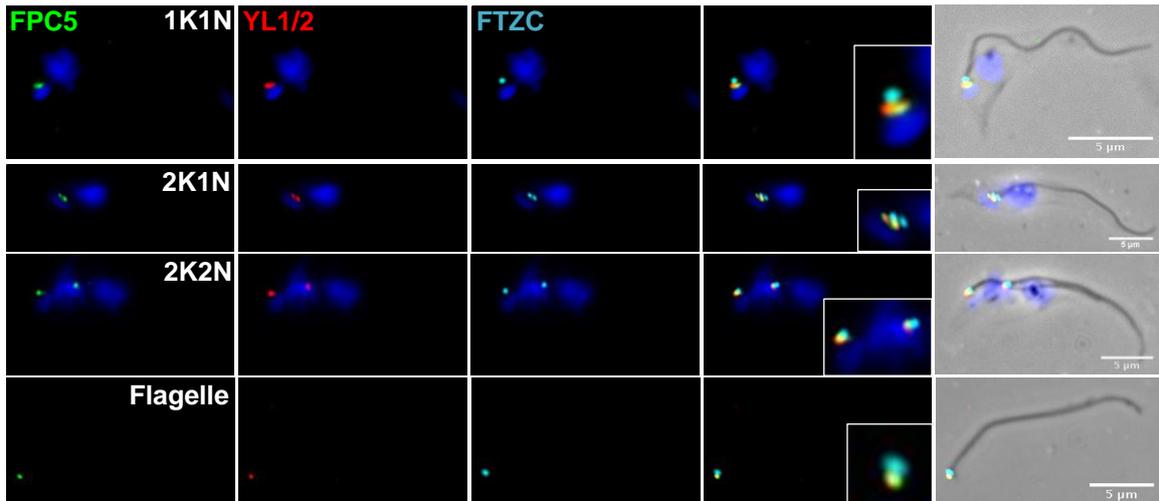


Figure 48 : FPC5 est localisée aux corps basaux.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes et des flagelles de *Tb427 29.13*. Les cytosquelettes et les flagelles sont marqués avec un anticorps monoclonal de souris anti-FPC5 (vert), YL1/2 (rouge) et un anticorps anti-FTZC (cyan). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). On observe une colocalisation entre FPC5 et YL1/2 mais pas entre FPC5 et FTZC. Cela signifie que FPC5 est localisée aux corps basaux.

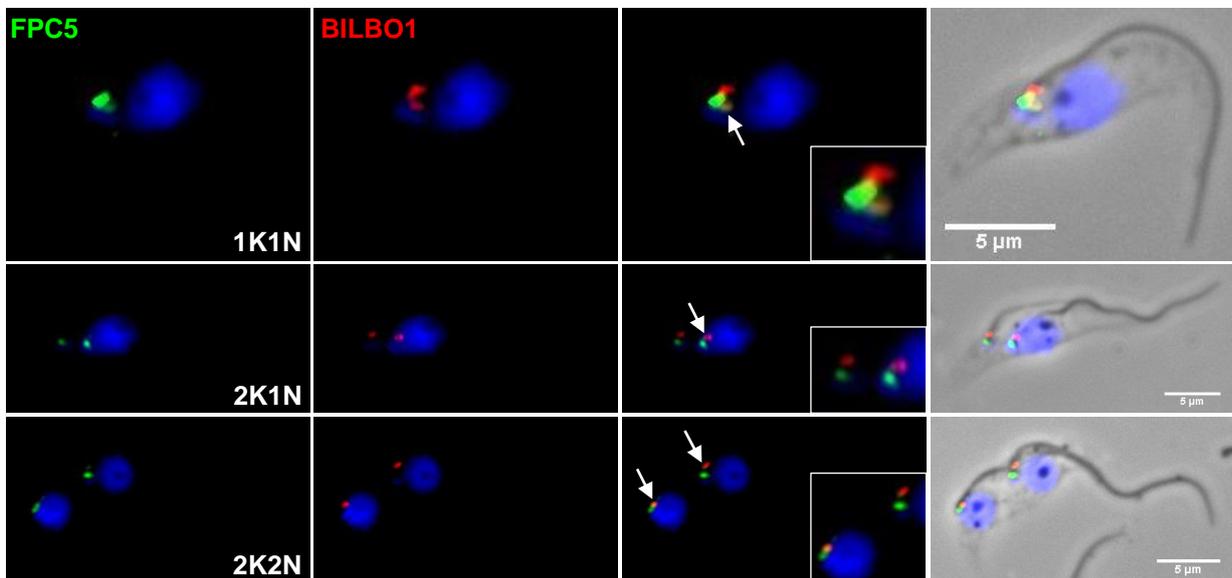


Figure 49 : FPC5 est partiellement colocalisée avec BILBO1.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes et des flagelles de *Tb427 29.13*. Les cytosquelettes et les flagelles sont marqués avec l'anticorps monoclonal de souris anti-FPC5 (vert) dilué au 1/250 et l'anticorps anti-BILBO1 (rouge). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). On observe une colocalisation partielle entre FPC5 et BILBO1 sur certaines cellules (flèche), dans le cas d'une dilution plus faible de l'anti-FPC5.

l'anticorps monoclonal anti-FPC5 (1/250 au lieu de 1/1000) nous observons une colocalisation partielle entre FPC5 et BILBO1, uniquement sur certaines cellules (Figure 49). Nous pouvons donc supposer que FPC5 interagit avec BILBO1 dans des temps très courts, difficiles à visualiser par immunofluorescence, ou bien, que le nombre de FPC5 impliquées dans l'interaction FPC5-BILBO1 au collier est très faible en comparaison aux FPC5 localisées aux corps basaux et donc difficilement détectable par immunofluorescence. L'étude de l'interaction entre BILBO1 et FPC5 est décrite dans le chapitre III.

Cependant, pour aller plus en détail dans la localisation de FPC5 chez la forme procyclique, nous avons décidé de réaliser des expériences de microscopie électronique. Pour cela, une préparation de flagelles de *Tb427 29.13* a été marquée avec l'anticorps anti-FPC5 de souris. Il s'avère que dans tous les cas on retrouve un marquage au niveau du corps basal mature (Figure 50). Le corps basal immature quant à lui n'est pas toujours marqué (Figure 50). Ceci peut être dû à un problème d'orientation de ce dernier qui empêcherait de visualiser le marquage. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par les expériences d'immunofluorescence. FPC5 est donc retrouvée au niveau des corps basaux.

De plus, on peut également observer un marquage plus faible au niveau du collier de la poche flagellaire (Figure 50). Cette localisation est donc en faveur d'une interaction entre FPC5 et BILBO1. En effet, par cette technique on peut remarquer que le marquage au niveau du collier est nettement plus faible que celui au niveau des corps basaux. Pour confirmer la colocalisation entre FPC5 et BILBO1 au collier, des comarquages pourront être réalisés en microscopie électronique.

De plus, des expériences préliminaires effectuées sur les formes sanguines montrent un signal similaire au niveau des corps basaux (Figure 51) avec cet anticorps anti-FPC5 (monoclonal de souris). Des comarquages devront être réalisés pour confirmer cette localisation.

Pour confirmer la localisation de FPC5 aux corps basaux d'autres moyens ont été utilisés et sont décrits dans le chapitre suivant.

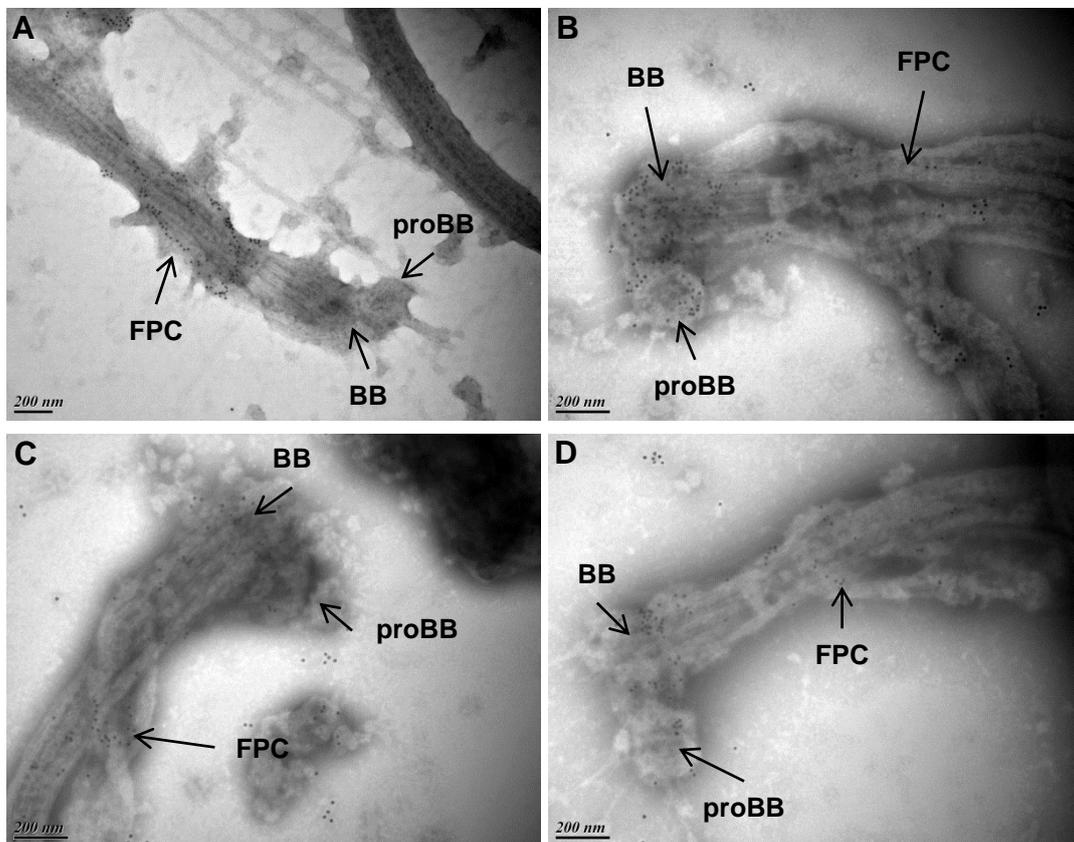


Figure 50 : Localisation de FPC5 par microscopie électronique.

Flagelles de *Tb427* 29.13 marqués avec l'anticorps anti-BILBO1 (A) ou l'anticorps monoclonal de souris anti-FPC5 (B-D). FPC5 est toujours retrouvée au corps basal mature (BB) et parfois sur le corps basal immature (proBB). Il y a également un portion plus faible du marquage au niveau du collier de la poche flagellaire (FPC).

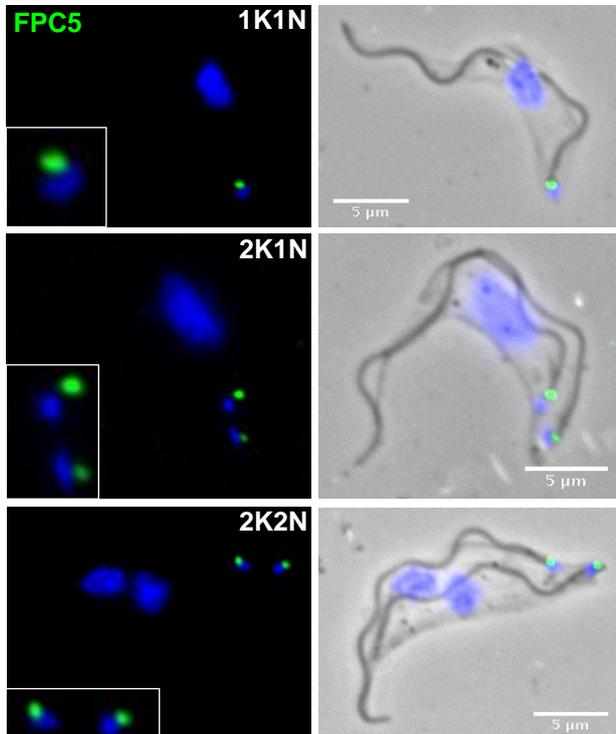


Figure 51 : Localisation de FPC5 dans les formes sanguines.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *Tb427* 90.13. Les cytosquelettes sont marqués avec l'anticorps monoclonal de souris anti-FPC5 (vert). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). Tout comme chez la forme procyclique, FPC5 se trouve dans la région des corps basaux chez la forme sanguine.

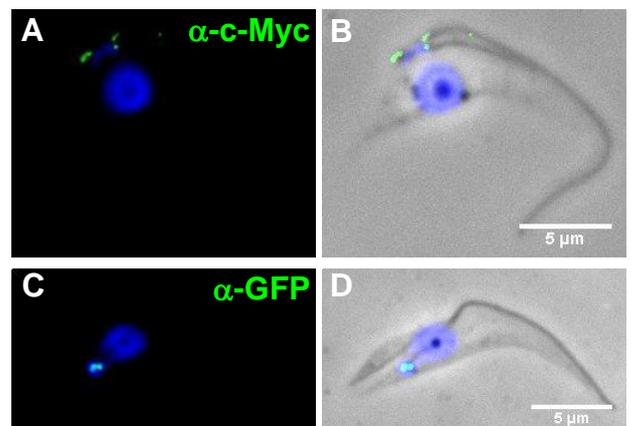


Figure 52 : Localisation de FPC5 étiquetée.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *Tb427* 29.13 exprimant FPC5::myc endogène (A-B) et surexprimant GFP::FPC5 (C-D). Les cytosquelettes sont marqués avec un anticorps anti-c-Myc (A-B) ou anti-GFP (C-D). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). L'ajout d'une étiquette ne change pas la localisation de FPC5 que l'on retrouve aux corps basaux.

c. Localisation de FPC5 étiquetée

Nous avons également étudié la localisation de FPC5 dans deux souches modifiées génétiquement, l'une surexprimant de façon inductible GFP::FPC5 et l'autre qui exprime de manière endogène FPC5::myc. Dans ce paragraphe nous nous attarderons uniquement sur la localisation de ces protéines de fusion. Tout comme avec les anticorps anti-FPC5 on observe une localisation au niveau des corps basaux (Figure 52). Cependant aucun marquage n'est observé, ni au niveau de l'axonème (contrairement au marquage obtenu avec l'anticorps polyclonal), ni au niveau du collier de la poche flagellaire.

Nous pouvons constater que toutes les techniques utilisées pour étudier la localisation de FPC5 révèlent une localisation au niveau des corps basaux.

De plus, les expériences de microscopie électronique montrent qu'une faible proportion de FPC5 semble être localisée au niveau du collier de la poche flagellaire. Ce faible marquage pourrait expliquer l'identification de FPC5 comme partenaire potentiel de BILBO1 lors du crible en double-hybride.

FPC5 semble donc se trouver à la fois aux corps basaux, mais aussi en moindre quantité au collier de la poche flagellaire.

Le marquage au niveau de l'axonème observé avec l'anticorps polyclonal de lapin ne semble donc pas être spécifique. Il est possible que cet anticorps dirigé contre la forme entière de FPC5 reconnaisse d'autres kinésines car le domaine moteur est très conservé. Tout comme en western blot, cet anticorps semble reconnaître d'autres protéines du parasite en immunofluorescence.

III. FPC5 un partenaire de BILBO1

a. Double hybride

Le crible double-hybride réalisé par la société Hybrigenics a permis d'identifier FPC5 comme partenaire potentiel de BILBO1. En effet, ce crible a pu révéler que le fragment aa. 517-715 de FPC5 (nommé par la suite FPC5^{B1BD}) interagit avec

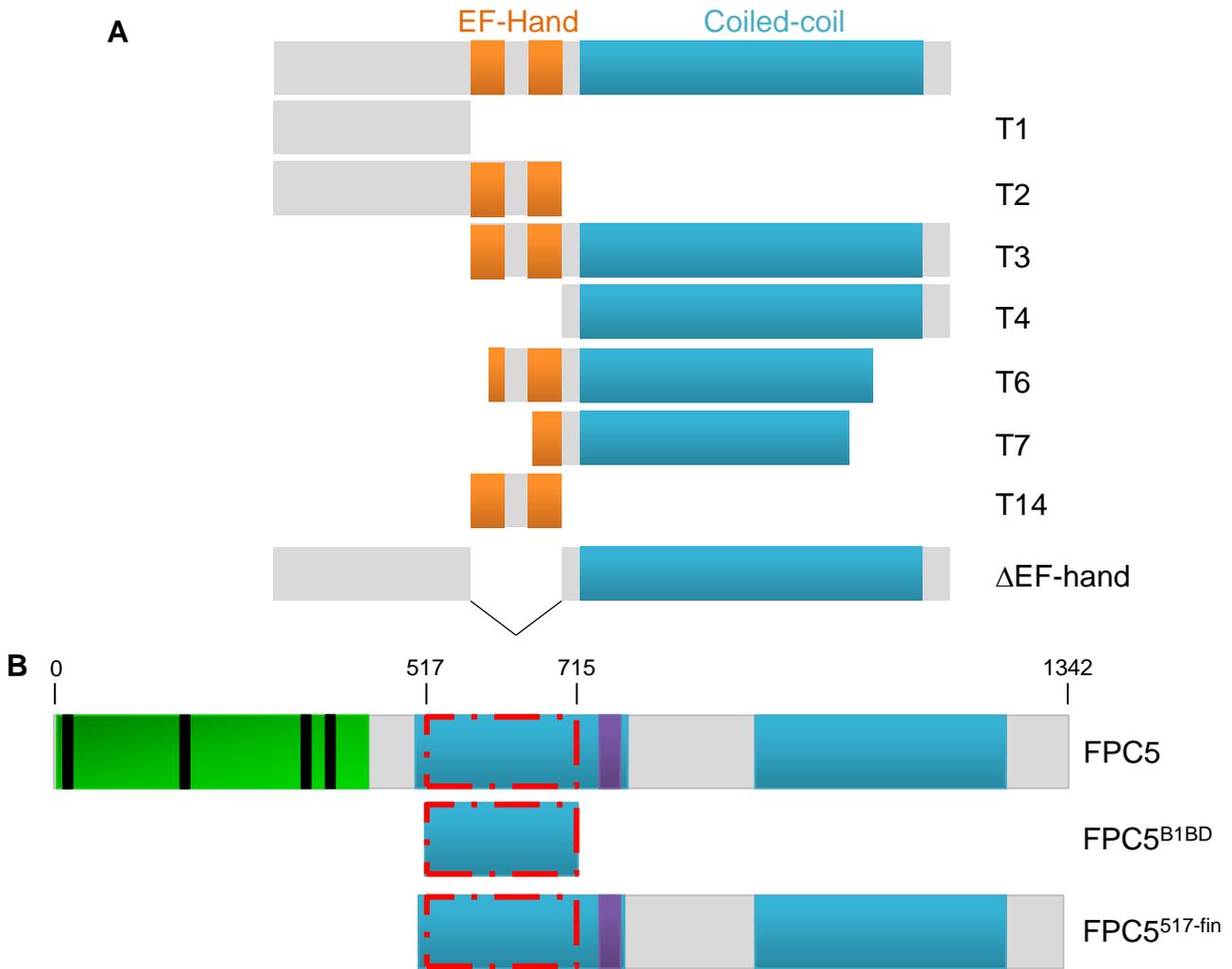


Figure 53 : Troncations utilisées pour le double-hybride entre FPC5 et BILBO1.

A. Troncations de BILBO1 qui possède deux motifs EF-hand (orange) et une région coiled-coil (bleu). **B.** Troncations de FPC5.

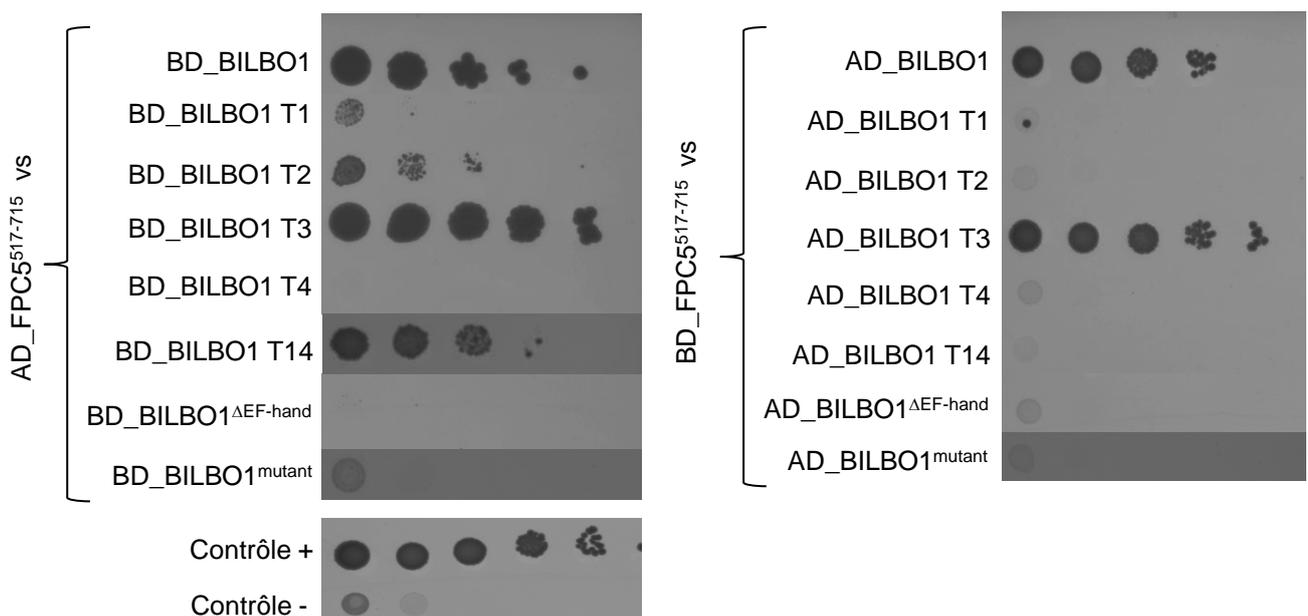


Figure 54 : Test d'interaction entre FPC5 et BILBO1.

Résultat du test d'interaction sur le milieu SC-L-W-H. On observe une interaction entre FPC5⁵¹⁷⁻⁷¹⁵ et les troncations de BILBO1 contenant les domaines EF-hand. Les interactions sont plus fortes quand BILBO1 ou ses troncations sont fusionnées au BD.

BILBO1. Nous avons alors décidé de confirmer cette interaction avec les formes entières de chacune des deux protéines, fusionnées soit au domaine d'activation (AD), soit au domaine de liaison à l'ADN (BD) du facteur de transcription GAL4. Les interactions ont été testées dans les deux sens, et ce sur les cinq milieux de sélection (-H, -A, +AurA, +X α Gal et -H-A+AurA+X α Gal). Malheureusement il s'avère qu'avec les formes entières des protéines, aucune interaction n'a été observée quel que soit le milieu. Plusieurs raisons peuvent expliquer qu'il n'y ait pas d'interactions entre les formes entières : FPC5 possède un domaine potentiel de liaison aux microtubules qui pourrait retenir la protéine dans le cytoplasme des levures, associée aux microtubules. Mais il se peut aussi que des facteurs présents chez la levure inhibent cette interaction ou bien que les protéines de fusion n'adoptent pas les conformations adéquates à l'interaction entre les deux partenaires. On peut aussi penser que les modifications post-traductionnelles de FPC5 ne sont pas les mêmes entre la levure et le parasite, ce qui empêcherait l'interaction entre les deux partenaires potentiels chez la levure.

Nous avons alors décidé de tester le fragment identifié par Hybrigenics lors du crible : FPC5^{B1BD} (Figure 53B). Ce crible a été réalisé uniquement dans un sens : BILBO1 utilisé comme appât (fusionné au BD). Nous avons donc réalisé le test d'interaction dans l'autre sens : BILBO1 fusionnée au domaine AD et FPC5^{B1BD} fusionnée au domaine BD. Dans le sens du crible (BILBO1::BD) il y a une interaction sur tous les milieux de sélection. Cependant dans l'autre sens, l'interaction semble plus faible. En effet, l'interaction est visible sur les milieux les moins stringents -H et +X α Gal (Figure 54). Ceci traduit sûrement une interaction faible entre les deux partenaires.

Pour aller plus en détail dans l'étude de l'interaction entre FPC5 et BILBO1, nous avons testé FPC5^{B1BD} contre des troncations de BILBO1 déjà existantes, notées T1 (N-terminal), T2 (N-terminal + EF-hand), T3 (EF-hand + coiled-coil) et T4 (coiled-coil) (Figure 53A). On observe alors une interaction avec les troncations T2 et T3 de BILBO1 (Figure 54). De manière intéressante on peut noter que ces deux troncations ont en commun les domaines EF-hand. Il semblerait que ces domaines EF-hand soient impliqués dans l'interaction avec FPC5^{B1BD}. Pour valider ces résultats nous avons testé deux autres troncations de BILBO1 notées T6 (une partie du EF-hand1 +

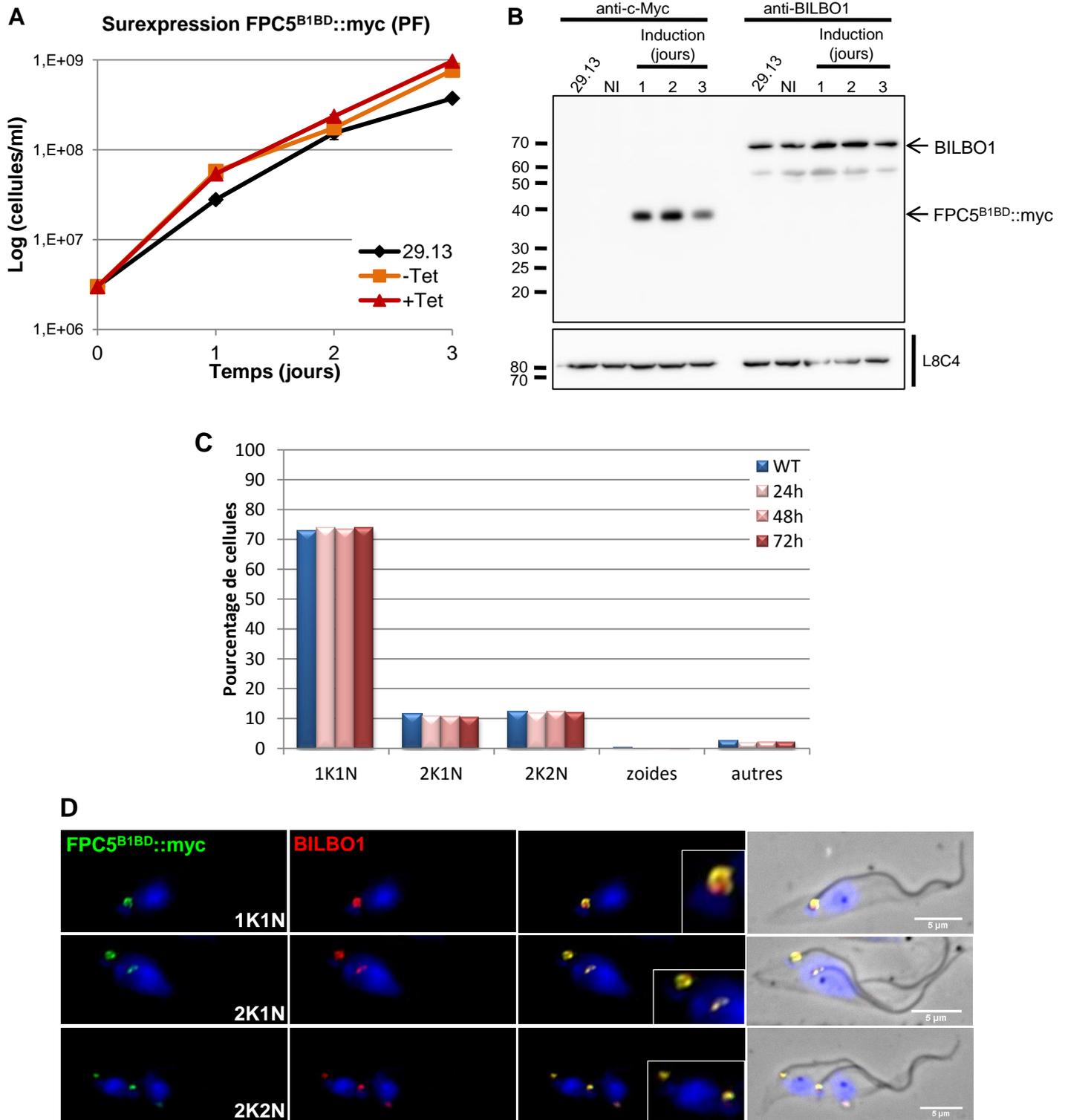


Figure 55 : Surexpression de FPC5^{B1BD}::myc chez la forme procyclique.

A. Courbe de croissance de la souche dite de référence (29.13), de la souche non-induite (-Tet) et de la souche induite pour la surexpression de FPC5^{B1BD}::myc (+Tet). Les souches -Tet et +Tet poussent un peu mieux que la souche de référence **B.** Western blot réalisé sur 10⁷ cytosquelettes avec l'anticorps anti-c-Myc et l'anti-BILBO1. Les tailles attendues sont de 29 kDa pour FPC5^{B1BD}::myc et de 67,3 kDa pour BILBO1. L8C4 est utilisé comme contrôle de charge. Il y a bien surexpression de FPC5^{B1BD}::myc après induction, ce qui n'impacte pas l'expression de BILBO1 **C.** Comptage du contenu en noyaux et kinétoplastes des cellules WT et des cellules induites 24h, 48h et 72h, après coloration au DAPI. **D.** Immunofluorescence sur des cytosquelettes de cellules induites 48h pour la surexpression. Les cellules sont marquées avec l'anti-c-Myc (vert) et l'anti-BILBO1 (rouge). Les noyaux et kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). On observe un colocalisation entre FPC5^{B1BD}::myc et BILBO1.

EF-hand2 + coiled-coil) et T7 (une partie du EF-hand2 + coiled-coil) (Figure 53A), la première ayant une délétion dans le premier motif EF-hand et la deuxième ne possédant qu'une partie du second motif EF-hand. Dans ce cas, les interactions observées précédemment sont abolies (Figure 54). Le résultat obtenu est encore une fois en faveur d'une implication des domaines EF-hand dans l'interaction de BILBO1 avec FPC5^{B1BD}. Nous avons alors créé deux autres troncations : les EF-hand seuls (T14) et BILBO1 délétée des EF-hand (Δ EF-hand) (Figure 53A). La troncation T14 interagit avec FPC5^{B1BD} alors qu'il n'y a plus d'interaction avec le mutant Δ EF-hand (Figure 54).

Tous ces résultats montrent que le domaine de liaison à BILBO1 de FPC5 (identifié par Hybrigenics, FPC5^{B1BD}) interagit avec les motifs EF-hand de BILBO1. Une autre façon de confirmer cette interaction serait de réaliser une co-immunoprécipitation entre FPC5^{B1BD} et BILBO1^{EF-hand} si nous arrivons à produire ces deux fragments de manière soluble.

Afin d'étudier si le calcium est impliqué dans l'interaction entre BILBO1 et FPC5, nous avons testé par double-hybride l'interaction entre FPC5^{B1BD} et un mutant des deux domaines EF-hand de BILBO1. Dans ce mutant, les résidus impliqués dans la liaison au calcium (D194, N198, D202 et D205 pour EF-hand1 et D230, N232 et E241 pour EF-hand2) ont été mutés en alanine. On observe alors une perte d'interaction entre BILBO1^{mutant} et FPC5^{B1BD} (Figure 54). Le calcium paraît donc impliqué dans l'interaction entre BILBO1 et FPC5^{B1BD}. Cependant, nous ne pouvons pas exclure le fait que le mutant adopte une conformation différente, ce qui empêcherait l'interaction entre les deux partenaires.

b. Surexpression du domaine de liaison à BILBO1 (B1BD) chez le parasite

Suite aux résultats obtenus en double-hybride, nous avons voulu tester cette interaction *in vivo*. Pour ce faire nous avons décidé de surexprimer chez le parasite FPC5^{B1BD} avec une étiquette c-Myc en C-terminal. Les résultats présentés ci-dessous sont des données préliminaires obtenues chez la forme procyclique et

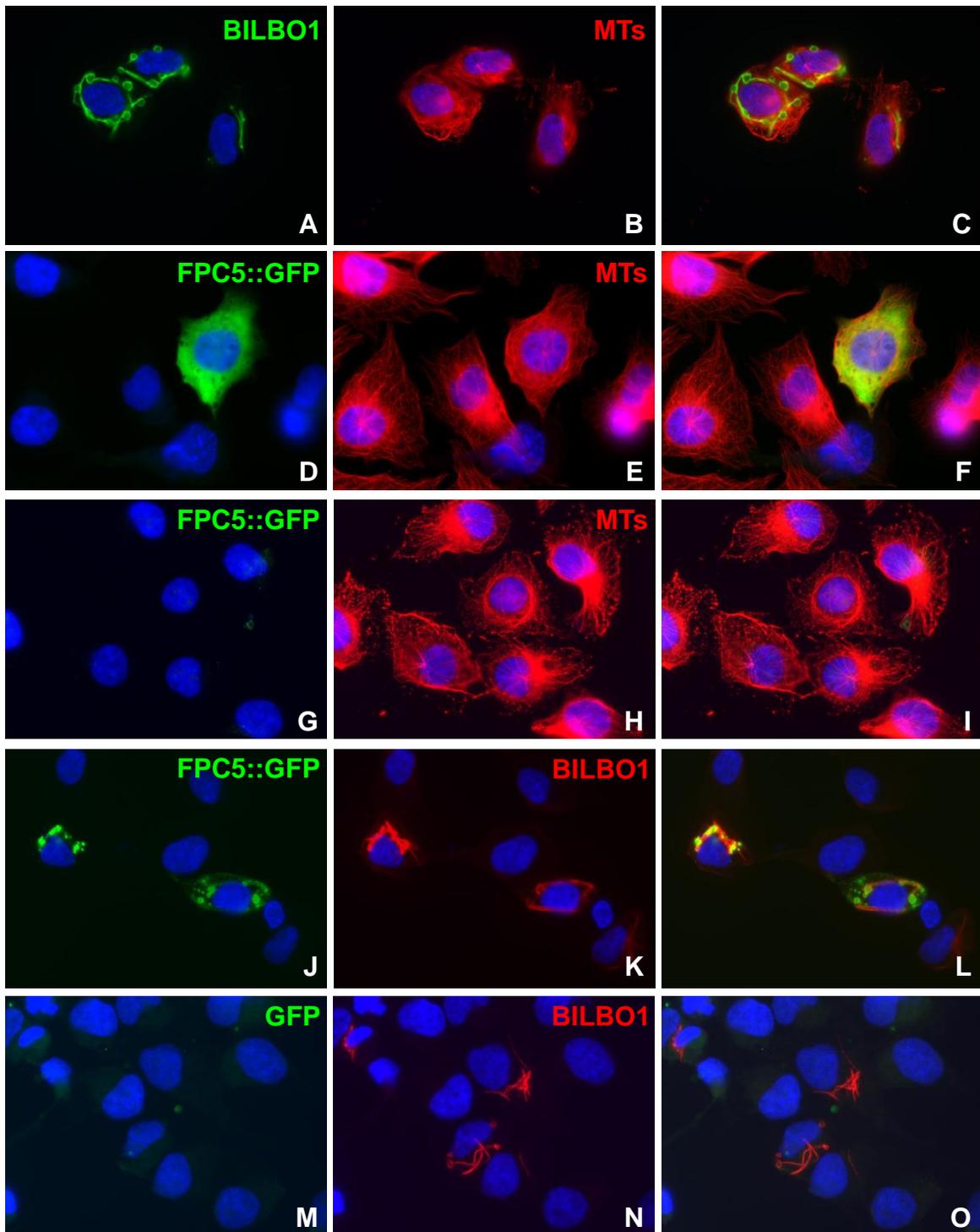


Figure 56 : Expression de BILBO1 et de FPC5 dans les cellules U-2 OS.

A-C. Expression de BILBO1 seule, immunofluorescence sur des cellules extraites au Triton X-100 : anti-BILBO1 (vert) et anti-tubuline (rouge). BILBO1 seule forme des filaments et des anneaux. **D-F.** Expression de FPC5::GFP, immunofluorescence sur cellules entières : fluorescence directe de la GFP (vert) et anti-tubuline (rouge). FPC5::GFP forme des agrégats dans la cellule. **G-I.** Expression de FPC5::GFP, immunofluorescence sur cellules extraites au Triton X-100 : fluorescence directe de la GFP (vert) et anti-tubuline (rouge). Les agrégats formés par FPC5::GFP sont solubles. **J-L.** Co-expression de BILBO1 et FPC5::GFP, immunofluorescence sur des cellules extraites au Triton X-100 : fluorescence directe de la GFP (vert) et anti-BILBO1 (rouge). FPC5::GFP est relocalisée sur les structures de BILBO1 et est retenue dans la fraction insoluble. Il y a une interaction entre FPC5::GFP et BILBO1. **M-O.** Co-expression de BILBO1 et GFP, immunofluorescence sur cellules extraites au Triton X-100 : fluorescence directe de la GFP (vert) et anti-BILBO1 (rouge). Il n'y a pas de signal GFP (qui est soluble). BILBO1 n'interagit pas avec la GFP seule. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu).

uniquement sur des préclones. En effet, malgré deux essais de clonage nous n'avons pas pu obtenir de clones.

Nous nous sommes d'abord intéressés à la localisation de ce domaine. Les expériences d'immunofluorescence révèlent une structure parfois en forme d'anneau proche de la poche flagellaire (Figure 55D). Ce marquage ressemblant étrangement à celui de BILBO1, nous avons décidé de réaliser des comarquages. Il s'avère que FPC5^{B1BD}::myc est parfaitement colocalisée avec BILBO1 (Figure 55D). Ces résultats sont une fois de plus en faveur de l'idée que FPC5 est un nouveau partenaire de BILBO1.

Nous avons vérifié la surexpression de ce domaine par western blot (Figure 55B). Il est surexprimé dès 24 heures d'induction et la quantité de FPC5^{B1BD}::myc augmente de 37% à 48h puis diminue de 23% à 72h (quantification *via* le logiciel ImageJ). De plus, la croissance de cette souche est similaire voir légèrement supérieure à celle des cellules de référence *Tb427 29.13* (Figure 55A). FPC5^{B1BD}::myc n'est donc pas toxique pour la cellule. Il ne semble pas que la surexpression de ce domaine ait un impact sur BILBO1. En effet, la quantification *via* le logiciel ImageJ du western blot réalisé avec l'anticorps anti-BILBO1, ne révèle pas de différences entre les cellules *Tb427 29.13* et les cellules induites 1, 2 et 3 jours (Figure 55B). De plus, par immunofluorescence on peut voir que le signal BILBO1 reste inchangé en comparaison aux cellules de référence. Il apparaît également que cette surexpression n'est associée à aucun phénotype morphologique et que le contenu en ADN est similaire à celui des cellules de références (comptage de cellules colorées au DAPI et à l'iodure de propidium - Figure 55C). Des inductions plus longues, d'une semaine, ne révèlent aucune différence avec les cellules de référence : que ce soit au niveau croissance, phénotypes ou structure de BILBO1.

c. Co-expression de BILBO1 et FPC5 en système hétérologue

Des études précédentes menées au laboratoire ont montré que quand BILBO1 est exprimée dans les cellules mammifères U-2 OS elle forme des polymères de différentes formes : sphères et filaments (données non-publiées) (Figure 56A-C).

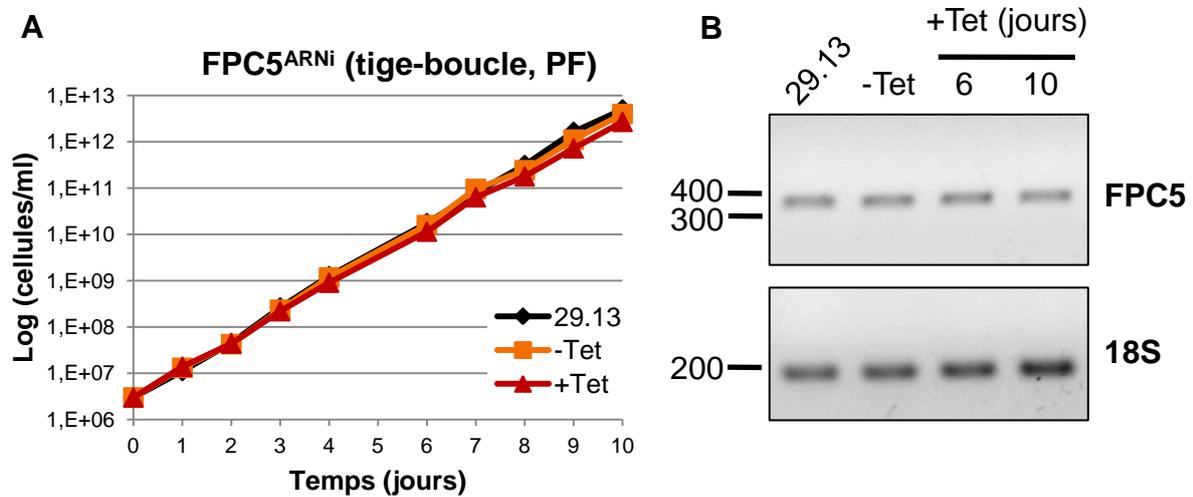


Figure 57 : ARN interférence (tige-boucle) de FPC5 chez la forme procyclique.

A. Courbe de croissance de la souche de référence (29.13), de la souche non-induite (-Tet) et de la souche induite pour l'ARNi de FPC5 (+Tet). Il n'y a pas de différence de croissance. **B.** RT-PCR semi-quantitative. Le taux d'ARN de FPC5 ne diminue pas, même après 10 jours d'induction. Le gène de référence utilisé est celui codant pour la sous-unité 18S de l'ARNr.

Nous avons donc voulu étudier le comportement de FPC5 dans les mêmes conditions. L'anticorps anti-FPC5 (polyclonal de lapin) que nous avons à notre disposition à ce moment ne fonctionnant pas sur ce type de cellules, nous avons choisi d'ajouter une étiquette GFP en C-terminal pour suivre la protéine.

Il s'avère qu'après 24 heures d'expression FPC5::GFP est, soit diffuse dans le cytoplasme, soit forme des agrégats dans les cellules (Figure 56D-F). Cependant, nous n'observons aucune colocalisation avec les microtubules comme on aurait pu s'y attendre de la part d'une kinésine putative. De plus, le signal GFP est observé uniquement dans les cellules entières. Quand on extrait les cellules au Triton X-100 pour garder uniquement le cytosquelette on perd le signal (Figure 56G-I). Ces résultats montrent que FPC5::GFP est soluble dans les cellules U-2 OS.

Une observation plus détaillée à différents temps d'expression devra être réalisée pour étudier l'évolution de la localisation de FPC5 au cours du temps. En effet, nous savons que pour d'autres partenaires de BILBO1, leur localisation change en fonction du temps d'expression (données non publiées). De plus, l'expression de FPC5 sans étiquette pourra être retestée en utilisant l'anticorps monoclonal de souris anti-FPC5.

Nous avons ensuite voulu coexprimer FPC5::GFP et BILBO1 dans ces mêmes cellules pour étudier leur comportement l'une envers l'autre. Dans ce cas, on observe une relocalisation de FPC5::GFP sur les polymères formés par BILBO1 (Figure 56J-L). De plus, cette relocalisation est observée sur des cellules extraites au Triton X-100. Ce qui signifie que l'interaction BILBO1-FPC5::GFP permet de retenir FPC5::GFP dans la fraction insoluble (Figure 56M-O).

Toutes ces données : le double-hybride, la surexpression de FPC5^{B1BD} chez le parasite et la coexpression de BILBO1 et FPC5 en système hétérologue sont en faveur d'une interaction entre BILBO1 et FPC5. Il semble même que cette interaction implique les domaines EF-hand de BILBO1 et la région coiled-coil centrale de FPC5. De plus, le calcium semble aussi jouer un rôle dans cette interaction.

Nous pouvons donc conclure que FPC5 est probablement un nouveau partenaire de BILBO1.

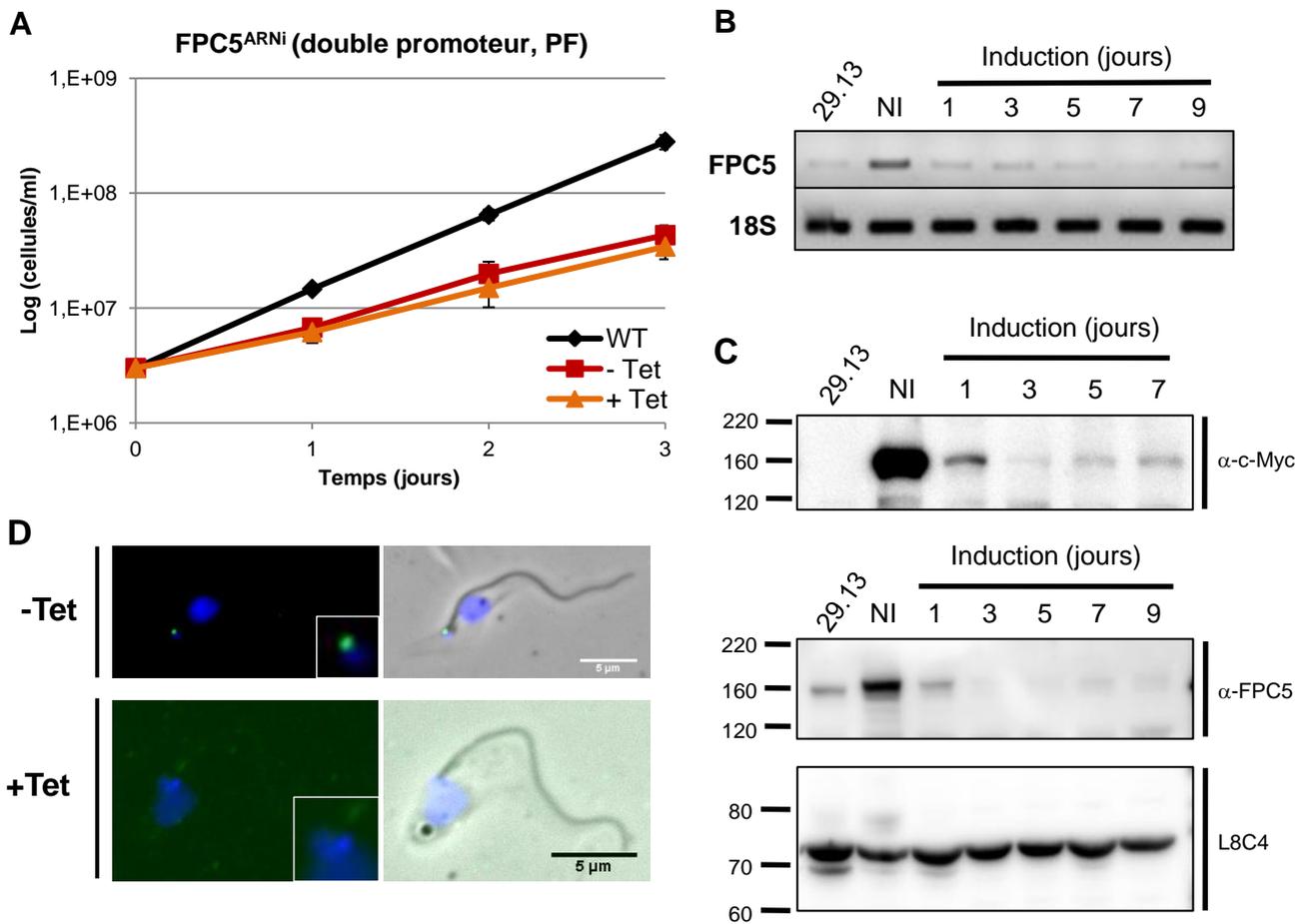


Figure 58 : ARN interférence (double promoteur) de FPC5 chez la forme procyclique.

A. Courbe de croissance. Les cellules non-induites (-Tet) et celles induites pour l'ARNi de FPC5 (+Tet) poussent plus lentement que la souche de référence (29.13). **B.** RT-PCR semi-quantitative. Le taux d'ARN de FPC5 diminue au cours du temps. Le gène 18S est utilisé comme référence. **C.** Western blot réalisé sur 10⁷ cytosquelettes avec l'anticorps anti-c-Myc ou l'anti-FPC5 polyclonal de lapin. La taille attendue est de 151 kDa. Il y a une diminution de la quantité de protéines après induction. L8C4 est utilisé comme contrôle de charge. **D.** Immunofluorescence sur de cytosquelettes de cellules non-induites (-Tet) et induites 72 heures (+Tet) marquées avec un anticorps anti-c-Myc. Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI. Après induction il y a une perte de signal de l'anti-c-Myc, ce qui confirme les résultats obtenus pour la RT-PCR et le western blot.

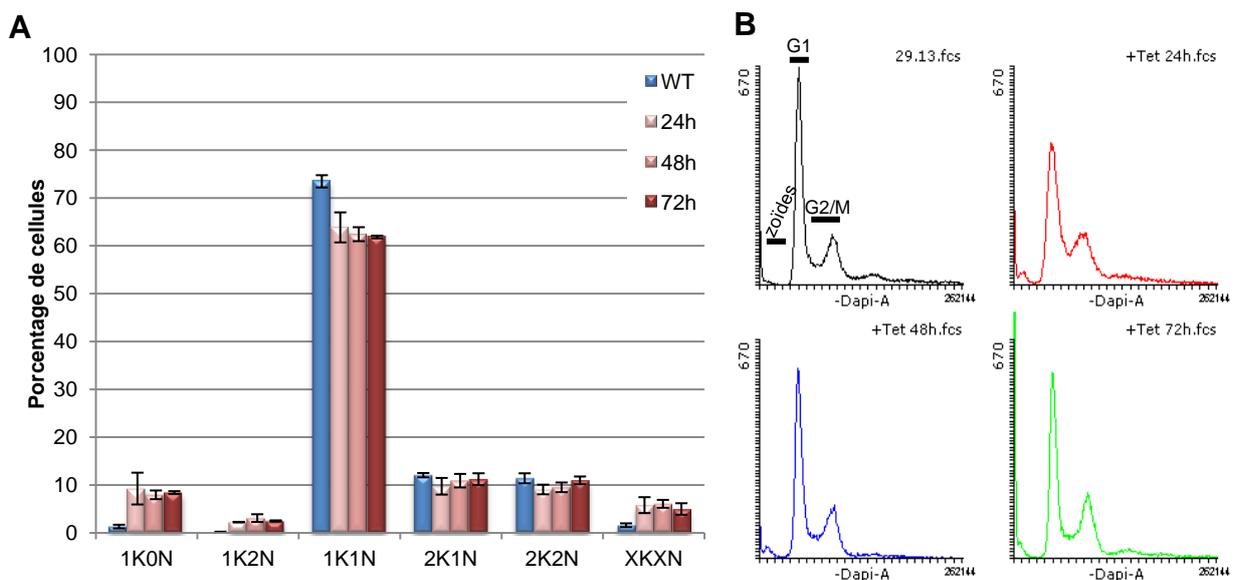


Figure 59 : ARN interférence (double promoteur) de FPC5 chez la forme procyclique.

A. Comptages du nombre de noyaux et de kinétoplastes, colorés au DAPI, dans les cellules WT et les cellules induites après 24h, 48h et 72h (500 cellules comptées, n=3). On observe une diminution du nombre de cellules 1K1N et une apparition des zoïdes, de cellules 1K2N et de cellules multinucléées, traduisant un défaut de cytodivision. **B.** Analyse en cytométrie en flux des cellules présentées en A.

IV. Analyse fonctionnelle

a. ARN interférence

Afin d'étudier le rôle de FPC5 chez le parasite, nous avons réalisé l'ARN interférence contre cette protéine. Cette expérience consiste à réduire l'expression d'une protéine et ainsi observer les effets sur la croissance des parasites et sur d'éventuels phénotypes associés. La réduction de l'expression protéique se fait en amont par la dégradation des ARN messagers spécifiques de la protéine en question.

Pour cela les cellules ont été transformées de façon à produire un ARN double brin, sous forme tige-boucle, spécifique de FPC5. Ce système d'ARN interférence est inductible par ajout de tétracycline. L'analyse a dans un premier temps été réalisée sur la forme procyclique de *T. brucei*. Il s'avère qu'aucun défaut de croissance n'est observé chez les cellules induites en comparaison aux cellules non-induites ou aux cellules de référence *Tb427* 29.13 (Figure 57A). Nous avons alors contrôlé le niveau d'ARN, par RT-PCR semi-quantitative, après plusieurs temps d'induction. On peut voir qu'il n'y a pas de diminution même après 10 jours d'induction (Figure 57B). En effet, la quantification des gels *via* le logiciel ImageJ révèle qu'après 10 jours d'induction le niveau d'ARN correspond à 98% de celui des cellules de référence. D'après ces résultats nous pouvons donc supposer que soit l'ARN interférence n'est pas efficace soit que les cellules ont réverté (Chen et al., 2003) et gardé uniquement le marqueur de sélection nécessaire à leur survie. Cela peut aussi laisser supposer que la protéine est importante et donc que le parasite s'adapte de façon à détourner le système d'ARNi. Afin de confirmer ces résultats, une seconde transfection a été réalisée et les résultats obtenus sont les mêmes que lors de la première expérience.

Nous avons alors décidé d'utiliser un autre système pour réaliser l'ARN interférence : le système double promoteur, lui aussi inductible et permettant la synthèse d'ARN double brin. Ces cellules nous ont été fournies dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Klaus Ersfeld (Laboratory of Molecular Parasitology, Department of Genetics, University of Bayreuth, Allemagne). Deux lignées étaient à notre disposition, une exprimant uniquement l'ARNi contre FPC5 et l'autre qui

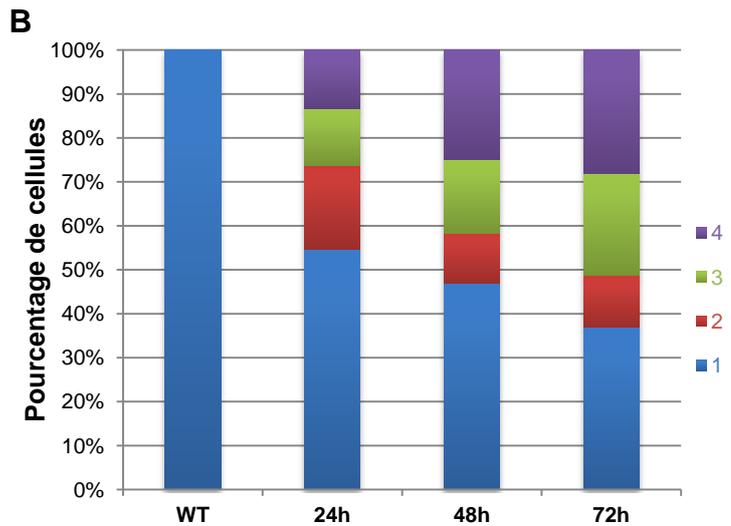
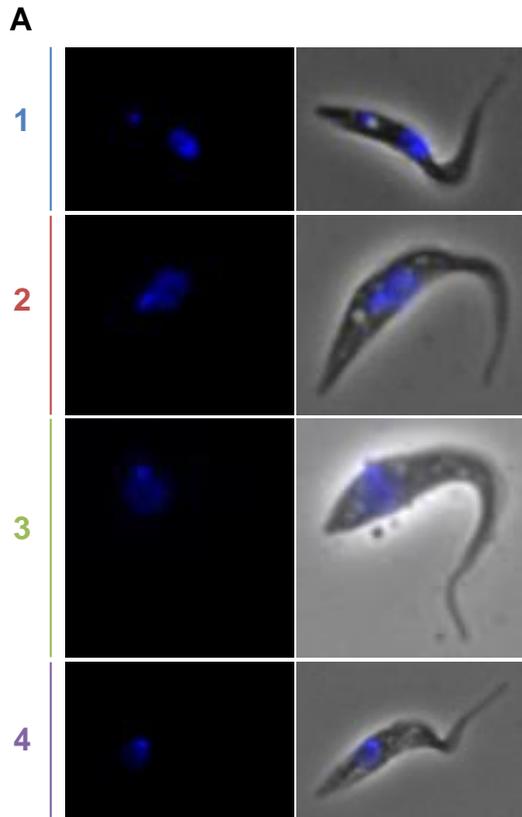


Figure 60 : ARN interférence (double promoteur) de FPC5 chez la forme procyclique.

A. Les différents phénotypes de kinétoplastes mal positionnés. 1, cellule WT. 2, kinétoplaste collé au noyau mais toujours postérieur. 3, kinétoplaste au dessus du noyau. 4, kinétoplaste du côté antérieur au noyau. **B.** Comptage des cellules ayant le kinétoplaste mal positionné, chez la forme WT ou chez les cellules induites 24h, 48h et 72h pour l'ARNi. Après 72h d'induction, plus de 50% des cellules ont un kinétoplaste mal positionné.

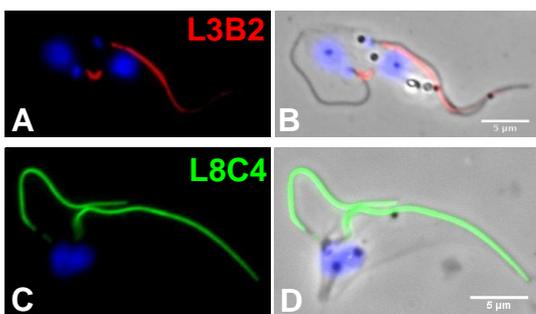
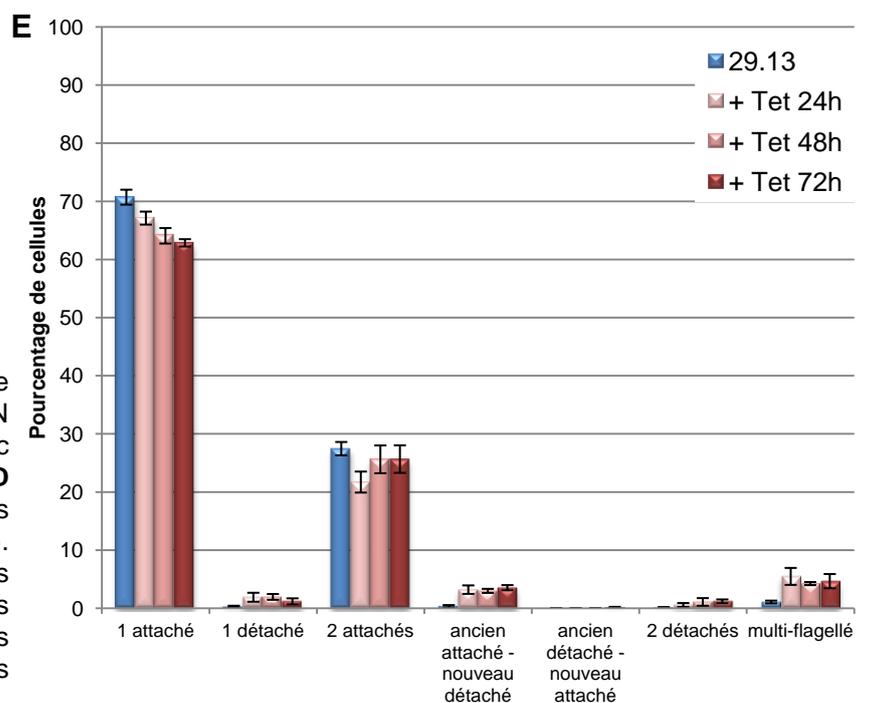


Figure 61 : ARN interférence de FPC5

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de cellules induites (72 heures) pour l'ARN interférence de FPC5. **A-B** Marquage avec l'anticorps L3B2 (FAZ, rouge) ou **C-D** l'anticorps L8C4 (PFR, vert). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). Seule la FAZ n'est pas produite au niveau des flagelles détachés. L'ARNi de FPC5 n'a pas d'effet sur la PFR. **E.** Comptage des cellules possédant un flagelle détaché (500 cellules comptées, n=3).



exprime l'ARNi contre FPC5 qui est étiquetée *in situ* avec une étiquette c-Myc en N-terminal.

Les résultats présentés ci-dessous sont ceux obtenus avec la seconde des deux lignées. Le suivi de la croissance révèle qu'à la fois les cellules non-induites et celles induites ont une croissance ralentie en comparaison aux cellules de référence *Tb427* 29.23 (Figure 58A). Le fait que les cellules non-induites poussent moins bien peut être expliqué par une fuite du promoteur. Cela conduit à la production d'ARN double brin en absence de tétracycline (Alsford et al., 2005; Wickstead et al., 2002b). Ce phénomène proviendrait de l'insertion du vecteur dans des régions transcriptionnellement actives des mégachromosomes. La protéine FPC5 ne semble donc pas essentielle à la survie des parasites. Nous avons contrôlé l'efficacité de l'ARNi au niveau ARN et protéique. Il s'avère qu'il y a à la fois une diminution du taux d'ARN de FPC5 (Figure 58B) mais aussi du niveau de protéines (Figure 58C). Cependant leur niveau n'est jamais nul. En effet, une quantification des gels (logiciel ImageJ) nous permet de voir qu'après 24 heures d'induction il y a une diminution de plus de 50% du niveau d'ARN et au bout d'une semaine il reste moins de 10% d'ARN de FPC5. L'efficacité de l'ARN interférence a également été vérifiée par immunofluorescence avec l'anticorps anti-c-Myc. Après 72 heures d'induction, on observe une perte de signal dans la plupart des cellules (Figure 58D). Ces résultats confirment ceux obtenus par RT-PCR et western blot.

Nous pouvons donc imaginer que le peu de protéines restant soit suffisant à la survie des parasites. Pour avoir une suppression complète de FPC5 il faudrait réaliser un knock-out.

Malgré les observations peu concluantes sur la croissance, nous avons voulu étudier les phénotypes associés. Pour cela, nous avons dans un premier temps analysé le contenu en ADN (nombre de noyaux et de kinétoplastes) des cellules après 24, 48 et 72 heures d'induction en comparaison aux cellules de référence. Ces résultats ont été obtenus par des expériences de cytométrie en flux, mais aussi par des comptages manuels de cellules colorées au DAPI. On observe alors dès 24 heures d'induction une diminution de 12% du nombre de cellules 1K1N ainsi qu'une diminution de 2% des cellules 2K1N et 2K2N. La réduction du nombre de cellules dites normales, est corrélée avec l'apparition de cellules anormales : entre 8% et

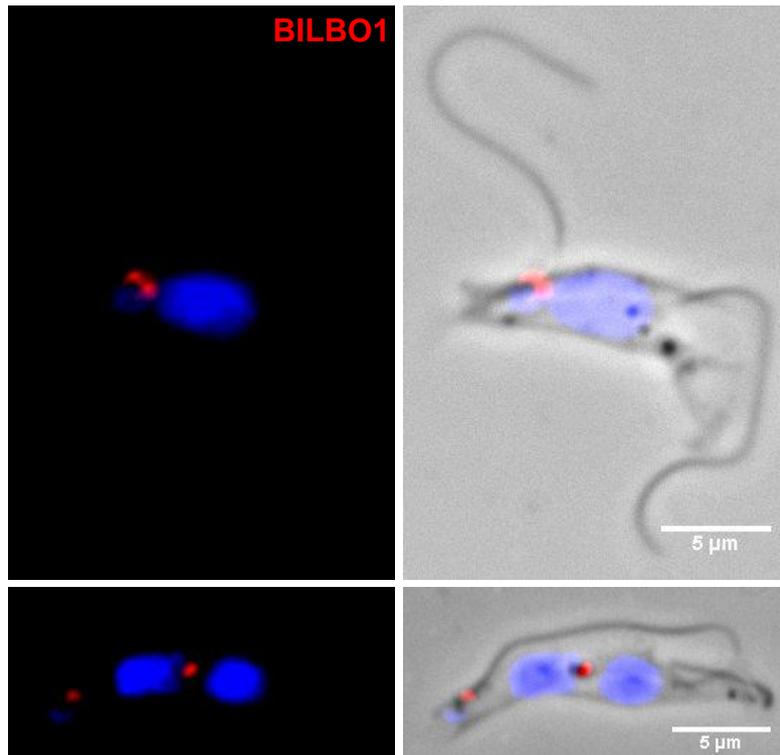
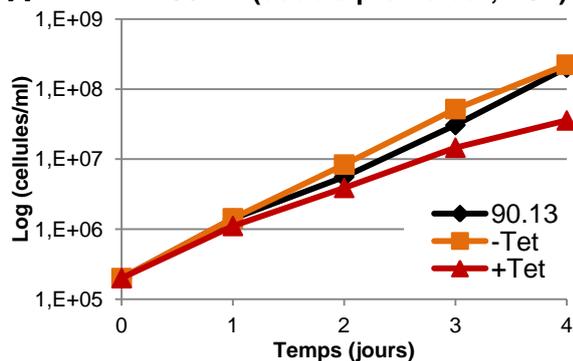


Figure 62 : ARN interférence de FPC5

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de cellules induites (72 heures) pour l'ARN interférence de FPC5. Marquage avec l'anticorps anti-BILBO1 (rouge). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). L'ARNi de FPC5 n'a pas d'effet sur BILBO1

A FPC5^{ARNi} (double promoteur, BSF)



B

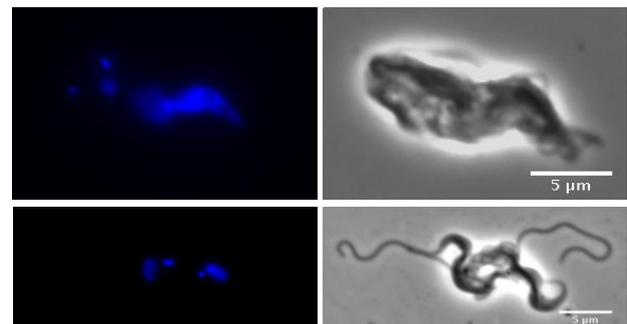


Figure 63 : ARN interférence (double promoteur) de FPC5 chez la forme sanguine.

A. Courbe de croissance de la souche de référence (90.13), de la souche non-induite (-Tet) et de la souche induite pour l'ARNi de FPC5 (+Tet). Les cellules induites poussent légèrement plus lentement. **B.** Observation microscopique de cellules entières fixées, après 72h d'induction. Les noyaux et kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). Après induction il y a apparition de cellules multi-nucléées et de cellules avec des flagelles détachés.

10% de zoïdes, 2% à 3% de cellules 1K2N, ainsi que 3% à 6% de cellules XKXN (Figure 59). La présence de ce type de cellules reflète un défaut de cytodièrese.

Un autre phénotype majeur observé est le mauvais positionnement du kinétoplaste. Pour évaluer l'ampleur de ce phénotype nous avons réalisé des comptages de cellules 1K1N marquées au DAPI et à l'iodure de propidium. Les cellules sont classées en quatre catégories : 1- le phénotype sauvage (WT) pour lequel le kinétoplaste est situé à l'extrémité postérieure et est distant de 2-2,5 μm du noyau, 2- le kinétoplaste est toujours du côté postérieur mais très proche du noyau, 3- le kinétoplaste est au dessus du noyau et 4- le kinétoplaste est du côté antérieur par rapport au noyau (Figure 60A). Dès 24 heures d'induction de l'ARNi, on observe une chute de 45% du nombre de cellules présentant un kinétoplaste correctement positionné. Le nombre de cellules normales ne cesse de diminuer pour atteindre respectivement 47% et 37% après 48h et 72h d'induction. Au niveau des cellules anormales, on observe dans un premier temps une majorité de cellules dont le kinétoplaste est toujours postérieur mais collé au noyau (20%, 11% et 12%, respectivement après 24h, 48h et 72h d'induction). Ce type de cellules évolue ensuite vers des cellules dont le kinétoplaste est positionné au dessus du noyau (13%, 17% et 23%, respectivement après 24h, 48h et 72h d'induction) puis vers des cellules dont le kinétoplaste passe du côté antérieur au noyau (13%, 25% et 28%, respectivement après 24h, 48h et 72h d'induction) (Figure 60B). Ce dernier type de cellules rappelle la forme épimastigote du parasite, rencontrée dans les glandes salivaires de la mouche tsé-tsé. Dans le cas des cellules 2K1N, entre 42% et 63% ont un kinétoplaste du côté postérieur et le second du côté antérieur. Au vu de ces résultats et de la localisation de FPC5 aux corps basaux, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette protéine pourrait être impliquée dans le positionnement et la ségrégation des corps basaux. Un mauvais positionnement de ces derniers, entraînerait alors un mauvais positionnement du kinétoplaste, comme observé ici. En effet, la ségrégation des kinétoplastes est associée à celle des corps basaux (Robinson and Gull, 1991), ces deux structures étant physiquement liées par le complexe TAC (Zhao et al., 2008). De plus, le mauvais positionnement du kinétoplaste et des corps basaux pourrait entraîner un mauvais positionnement de la poche flagellaire et de son collier.

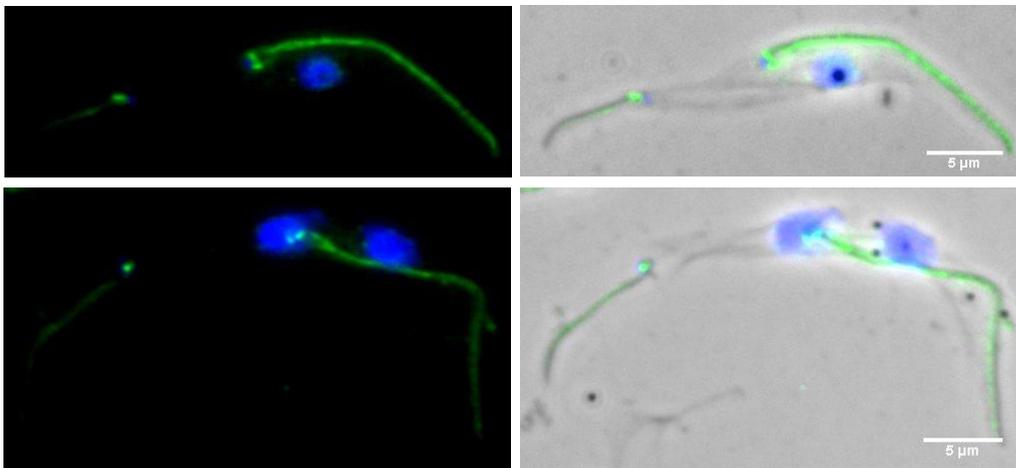


Figure 64 : ARN interférence de BILBO1.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de cellules induites (36 heures) pour l'ARN interférence de BILBO1. Les cytosquelettes sont marqués avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC5 (vert). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). FPC5 est toujours présent aux corps basaux, même au niveau du flagelle détaché à l'extrémité postérieure.

Nous avons également observé, après induction de l'ARNi, l'apparition de cellules avec des flagelles détachés. Ce phénotype reste néanmoins mineur et concerne majoritairement les cellules multi-flagellées qui possèdent leurs flagelles détachés et représentent environ 5% des cellules (Figure 61E). De plus, environ 3% des cellules à l'état 2K2N possèdent leur nouveau flagelle détaché alors que l'ancien est toujours attaché (Figure 61E). Par ailleurs, environ 1% des cellules possèdent les deux flagelles détachés. Nous avons remarqué que ce phénotype de flagelles détachés est associé à une absence de synthèse de la FAZ (Flagellar Attachment Zone), notamment du filament de la FAZ. En effet, par immunomarquage on peut voir qu'il n'y a pas de signal avec l'anticorps L3B2 (Kohl et al., 1999) (FAZ1) au niveau du flagelle détaché alors qu'il y en a un au niveau du flagelle attaché au corps cellulaire (Figure 61A-B). Cependant, le PFR (Paraflagellar rod) marqué avec l'anticorps L8C4 (Kohl et al., 1999) est toujours présent même dans le flagelle détaché (Figure 61C-D). Il semble donc que la présence de flagelles détachés soit due à un défaut de synthèse du filament de la FAZ. De plus, dans la majorité des cas le nouveau flagelle reste très proche de l'ancien, ce qui est également en faveur d'un défaut de ségrégation des corps basaux. Ce phénotype est corrélé avec le mauvais positionnement du kinétoplaste qui pourrait être lié à un mauvais positionnement des corps basaux. FPC5 pourrait donc jouer un rôle dans la synthèse de la FAZ et/ou la ségrégation des corps basaux. Il est également possible que le défaut de synthèse de la FAZ soit la résultante du mauvais positionnement du corps basal. De plus, il est possible que le défaut de cytodierèse observé soit lié au défaut de synthèse de la FAZ. En effet, il a été montré que la FAZ joue un rôle la cytodierèse en définissant le sillon de clivage (Kohl et al., 2003; Robinson et al., 1995).

Etant donné que FPC5 paraît être un partenaire de BILBO1 nous avons analysé l'impact que pouvait avoir l'ARN interférence de FPC5 sur BILBO1. Il s'avère que par immunofluorescence le signal BILBO1 est toujours présent après 72 heures d'induction (Figure 62). Cependant, un western blot devra être réalisé pour vérifier qu'il n'y a pas d'impact sur le niveau d'expression de BILBO1. De plus, une analyse par microscopie électronique pourrait nous permettre d'aller plus en détail sur la structure du collier et de la poche flagellaire dans les cellules induites.

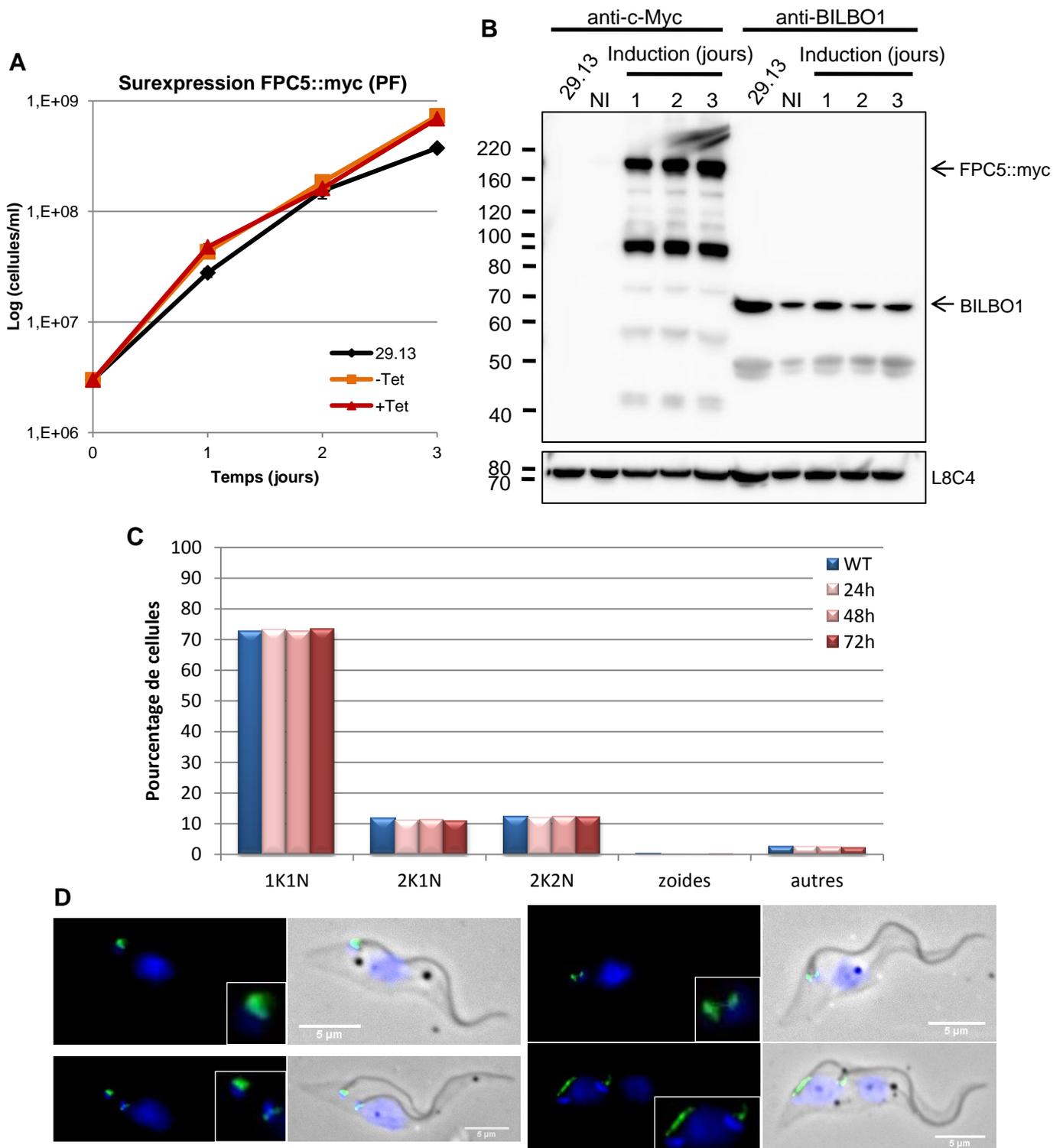


Figure 65 : Surexpression de FPC5::myc chez la forme procyclique.

A. Courbe de croissance de la souche dite de référence (29.13), de la souche non-induite (-Tet) et de la souche induite pour la surexpression de FPC5::myc (+Tet). Les cellules induites poussent un peu mieux que la souche de référence. **B.** Western blot réalisé sur 10^7 cytosquelettes avec l'anticorps anti-c-Myc et l'anti-BILBO1. Les tailles attendues sont de 152 kDa pour FPC5::myc et de 67,3 kDa pour BILBO1. L8C4 est utilisé comme contrôle de charge. Dès 24 heures d'induction FPC5::myc est surexprimé. La surexpression semble avoir un impact sur l'expression de BILBO1. **C.** Comptage du contenu en noyaux et kinétoplastes des cellules WT et des cellules induites 24h, 48h et 72h, après marquage au DAPI. **D.** Immunofluorescence sur des cytosquelettes de cellules induites 48h pour la surexpression. Les cellules sont marquées avec l'anti-c-Myc (vert). Les noyaux et kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). FPC5::myc est localisée aux corps basaux mais aussi dans certaines cellules au début du flagelle.

Nous avons ensuite voulu évaluer l'implication de FPC5 chez la forme sanguine. Pour cela nous avons utilisé le système double promoteur qui a fonctionné chez la forme procyclique. Les résultats présentés ci-dessous sont des données préliminaires qui devront être approfondies. De façon plus visible que chez la forme procyclique, on observe un ralentissement de la croissance pour les cellules induites (Figure 63A). Quant aux cellules non-induites elles ont une croissance similaire à celle des cellules de référence *Tb427* 90.13. Il ne semble donc pas y avoir de fuite dans l'induction. Tout comme chez la forme procyclique, FPC5 ne semble pas être essentielle à la survie chez la forme sanguine. Cependant, la diminution des niveaux d'ARN ainsi que celui de protéines devront être vérifiés.

De plus, une observation au microscope des cellules entières fixées après 72 heures d'induction montre la présence de nombreuses cellules multi-nucléées ainsi que des cellules avec des flagelles détachés (Figure 63B). Pour aller plus en détail une quantification des phénotypes observés devra être réalisée.

Nous avons également voulu étudier la localisation de FPC5 dans des cellules induites pour l'ARN interférence de BILBO1. Nous savons qu'au-delà de 36 heures d'induction les cellules meurent et que le phénotype caractéristique est une élongation de l'extrémité postérieure au bout de laquelle on retrouve le nouveau flagelle détaché (Bonhivers et al., 2008b). Par immunofluorescence (anticorps polyclonal de lapin anti-FPC5) on observe qu'après 36 heures d'induction de l'ARN interférence de BILBO1, FPC5 est toujours présent aux corps basaux, que ce soit au niveau de l'ancien flagelle ou du flagelle détaché (Figure 64). L'ARN interférence de BILBO1 ne semble donc pas avoir d'impact sur la localisation de FPC5 aux corps basaux. Cependant nous savons qu'il n'y a pas de collier au niveau du flagelle détaché, une analyse en microscopie électronique nous permettrait d'étudier en détail le devenir de la partie de FPC5 normalement trouvée au collier.

b. Surexpression chez la forme procyclique

i. Surexpression de FPC5::myc

Pour mieux comprendre le rôle de FPC5 nous l'avons surexprimé avec une étiquette c-Myc en C-terminal (FPC5::myc) dans la forme procyclique du parasite.

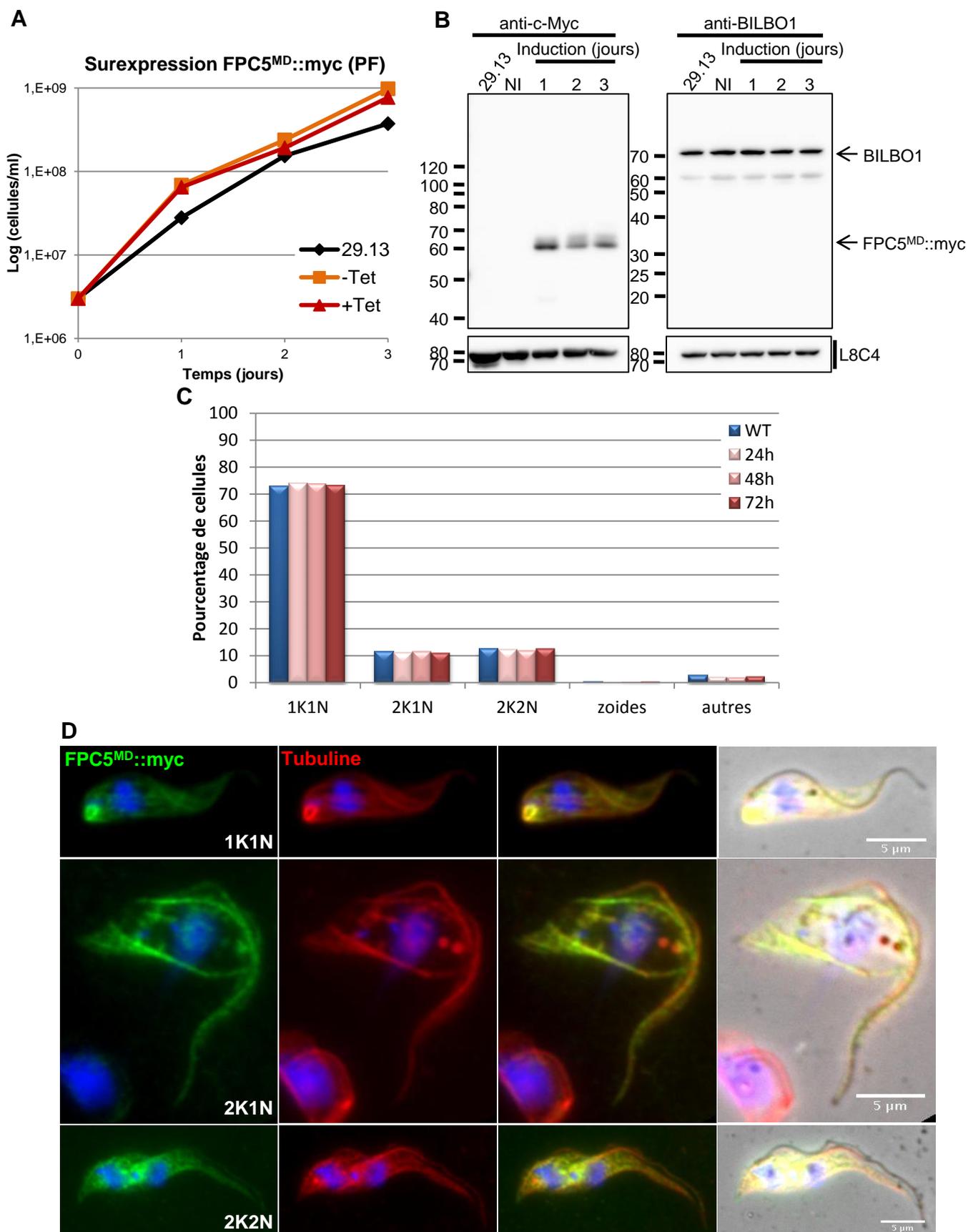


Figure 66 : Surexpression de FPC5^{MD}::myc chez la forme procyclique.

A. Courbe de croissance de la souche dite de référence (29.13), de la souche non-induite (-Tet) et de la souche induite pour la surexpression de FPC5^{MD}::myc (+Tet). Les cellules induites poussent un peu mieux que la souche de référence. **B.** Western blot réalisé sur 10⁷ cytosquelettes avec l'anticorps anti-c-Myc et l'anti-BILBO1. Les tailles attendues sont de 61 kDa pour FPC5^{MD}::myc et de 67,3 kDa pour BILBO1. L8C4 est utilisé comme contrôle de charge. Dès 24 heures d'induction FPC5^{MD}::myc est surexprimé. La surexpression n'a pas d'impact sur l'expression de BILBO1. **C.** Comptage du contenu en noyaux et kinétoplastes des cellules WT et des cellules induites 24h, 48h et 72h, après coloration au DAPI. **D.** Immunofluorescence sur des cytosquelettes de cellules induites 48h pour la surexpression. Les cellules sont marquées avec l'anti-c-Myc (vert) et l'anti-tubuline (rouge). Les noyaux et kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). On observe une colocalisation entre FPC5^{MD}::myc et la tubuline. Le domaine moteur est capable de se lier aux microtubules.

Cette surexpression est inductible à la tétracycline. Les résultats présentés ci-dessous sont des données préliminaires obtenus à partir de pré-clones. Deux clonages ont été réalisés mais aucun ne nous a permis d'obtenir des clones.

Nous avons pu dans un premier temps vérifier par western blot sur des cytosquelettes que la protéine de fusion est surexprimée dès 24 heures d'induction (Figure 65B). Le niveau d'expression reste constant après 48h d'induction puis diminue de 13% après 72h (quantification *via* le logiciel ImageJ). Cependant avec l'anticorps anti-c-Myc on retrouve une bande à la taille attendue (157 kDa) mais également une bande plus basse (90 kDa) ce qui laisse suggérer que FPC5::myc est dégradée malgré l'ajout d'inhibiteurs de protéases (Figure 65B).

Nous avons pu voir précédemment que FPC5 interagit avec BILBO1. Nous avons alors voulu étudier si cette surexpression a un impact sur BILBO1. Un western blot réalisé sur les mêmes échantillons que précédemment avec un anticorps anti-BILBO1 montre une diminution du niveau d'expression de BILBO1 après surexpression de FPC5::myc (Figure 65B). La quantification avec le logiciel ImageJ révèle une diminution entre 36 et 60%. Sur des temps courts (3 jours) FPC5::myc semble donc avoir une influence sur l'expression de BILBO1. Cependant, une étude plus détaillée devra être réalisée afin de voir si cela impacte la structure du collier. Des temps d'induction plus longs devront être analysés.

L'induction de l'expression de la protéine recombinante n'a pas d'impact sur la croissance des cellules (Figure 65A). En effet, les cellules induites ont le même comportement que les non-induites qui poussent légèrement mieux que la souche de référence (*Tb427* 29.13). De plus, aucun phénotype n'est associé à cette surexpression et un comptage des cellules colorées au DAPI et à l'iodure de propidium montre que le contenu en noyaux et kinétoplastes reste inchangé (Figure 65C).

L'étude de la localisation de FPC5::myc réalisée sur des cytosquelettes montre que le marquage avec l'anticorps anti-c-Myc est présent aux niveau des corps basaux (Figure 65D). De plus, avec l'anti-c-Myc on observe un marquage supplémentaire, au début du flagelle, juste après les corps basaux (Figure 65D). Cette localisation est en faveur avec celle obtenue par microscopie électronique. En

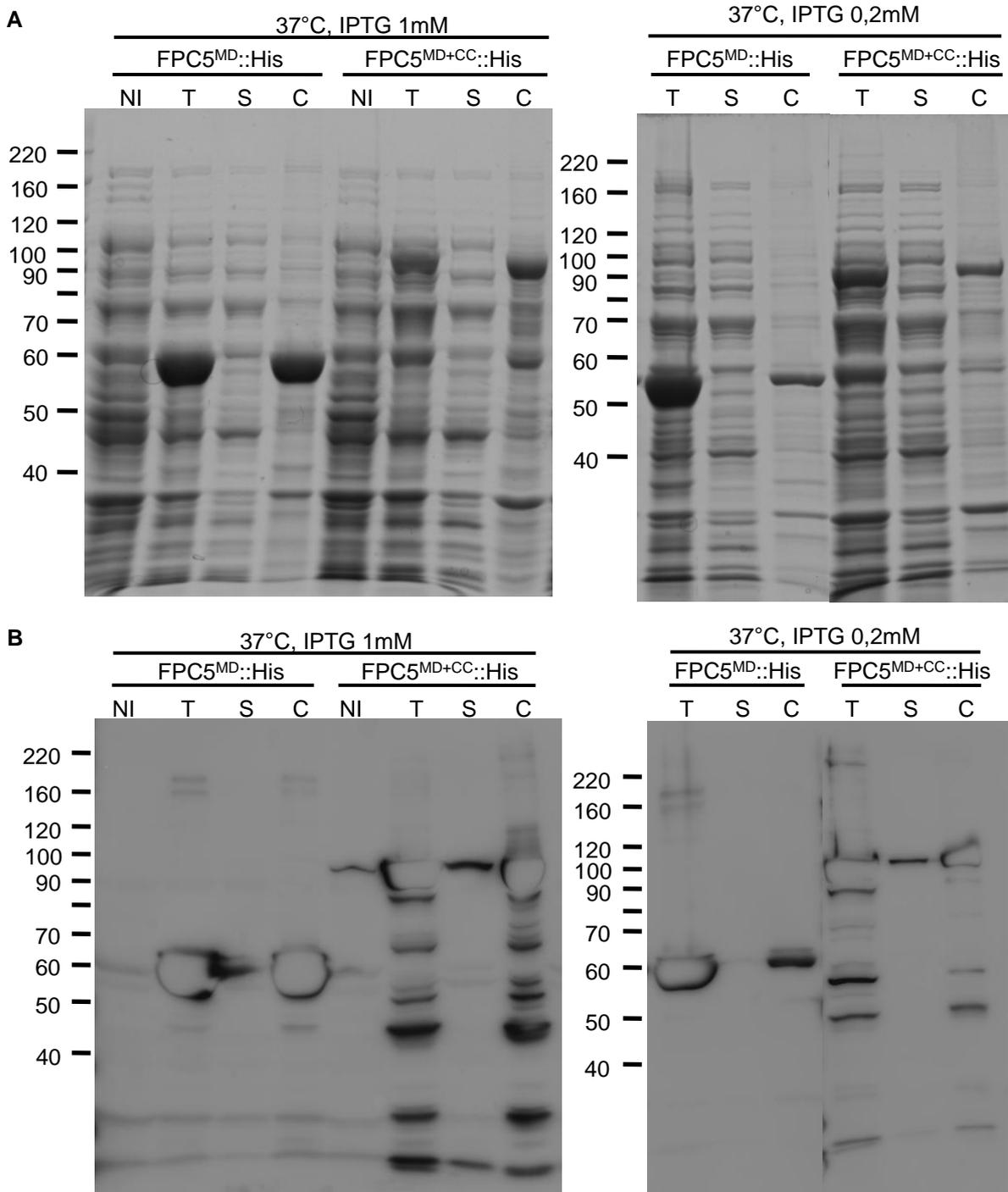


Figure 67 : Test de solubilité de FPC5^{MD}::His et FPC5^{MD+CC}::His.

A. SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie. Les échantillons déposés correspondent aux inductions à 37°C par 0,2 ou 1mM IPTG. **B.** Western blot réalisé avec l'anticorps anti-his sur les mêmes échantillons que en A. Les tailles attendues sont respectivement de 55 kDa et 88 kDa. NI = non-induit, T = total, C = culot et S = surnageant. Les protéines recombinantes sont insolubles.

effet, FPC5 est retrouvée majoritairement aux corps basaux mais une petite partie semble être sur la partie proximale de l'axonème et au niveau du collier de la poche flagellaire, ce qui est visible par immunofluorescence uniquement sur certaines cellules quand l'anticorps anti-FPC5 (monoclonal souris) est peu dilué.

ii. Surexpression de FPC5^{MD}::myc

Afin d'étudier les capacités de FPC5 à se lier aux microtubules nous avons décidé de surexprimer *in vivo* chez la forme procyclique du parasite le domaine moteur étiqueté c-Myc en C-terminal : FPC5^{MD}::myc. Ce système de surexpression est inductible à la tétracycline. Les données présentées ci-dessous sont des données préliminaires obtenues à partir de pré-clones car comme précédemment nous n'avons pas pu obtenir de clones.

Avant toute analyse nous avons vérifié l'expression de FPC5^{MD}::myc par western blot (bande à 61 kDa – Figure 66B). Elle est exprimée par le parasite dès 24 heures d'induction et la quantité de protéine exprimée diminue de 21% après 48h d'induction et réaugmente de 9% après 72h (quantification *via* le logiciel ImageJ).

Le suivi de la croissance ne révèle aucun défaut. En effet, les cellules non-induites et induites ont une croissance similaire voire légèrement supérieure à celle de la souche de référence (*Tb427* 29.13) (Figure 66A). De plus, un comptage des cellules colorées au DAPI et à l'iodure de propidium révèle que le contenu en noyaux et kinétoplastes est identique à celui des cellules de référence. (Figure 66C).

De plus, la surexpression de ce domaine moteur n'a pas d'impact sur BILBO1, en effet la quantification du western blot réalisée *via* le logiciel ImageJ révèle que la quantité de BILBO1 reste inchangée à plusieurs temps d'induction (Figure 66B).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation de ce domaine moteur. Pour cela nous avons réalisés des expériences d'immunofluorescence sur des cytosquelettes marqués avec l'anticorps anti-c-Myc. Le marquage obtenu ressemble fortement à un marquage tubuline : axonème et corset sous-pelliculaire. Nous avons

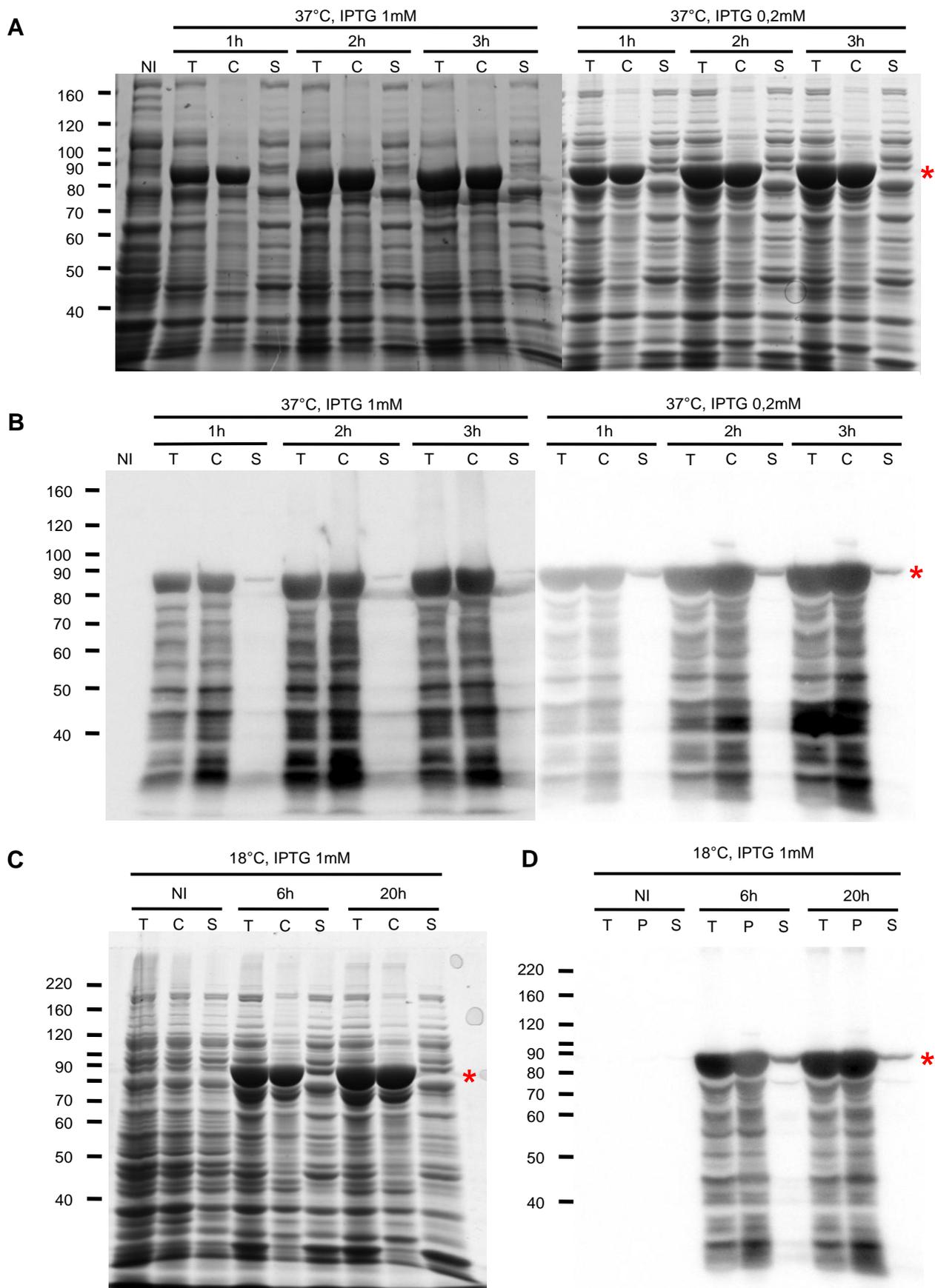


Figure 68 : Test de solubilité de GST::FPC5^{MD}.

A. SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie. Les échantillons déposés correspondent aux inductions à 37°C par 0,2 ou 1mM IPTG. **B.** Western blot réalisé avec l'anticorps anti-GST sur les mêmes échantillons que en A. **C.** SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie. Les échantillons déposés correspondent à une induction à 18°C par 1mM IPTG. **D.** Western blot réalisé avec l'anticorps anti-GST sur les mêmes échantillons que en C. La taille attendue est de 82 kDa (astérisque). NI = non-induit, T = total, C = culot et S = surnageant. Dans toutes les conditions les protéines recombinantes sont majoritairement insolubles.

alors réalisé des comarquages entre l'anticorps anti-c-Myc et un anti-tubuline. Il s'avère qu'on observe une parfaite colocalisation entre les deux marquages (Figure 66D) que ce soit au niveau du corset sous pelliculaire ou de l'axonème. Ceci montre donc que le domaine moteur seul de FPC5 est capable de se lier aux microtubules comme le font les kinésines.

Nous savons maintenant que le domaine moteur étiqueté c-Myc peut se lier aux microtubules mais que la forme entière de FPC5 est retrouvée uniquement aux corps basaux. Nous pouvons donc supposer que dans la partie de FPC5 ne contenant pas le domaine moteur il y a un signal d'adressage aux corps basaux comme cela a été montré pour la kinésine KIF17 (Dishinger et al., 2010). En effet, dans cette publication il est montré que KIF17 possède une CLS (Ciliary Localisation Signal) qui permet l'adressage au compartiment ciliaire. Cette CLS est similaire aux NLS (Nuclear Localisation Signal) qui sont riches en lysine, arginine et histidine. Chez FPC5, trois régions riches en ces acides aminés ont été identifiées : RKLRRDK (aa.533-539), KRRHH (aa. 626-630) et KRR (aa. 726-728). Des mutants de délétion de ces motifs pourront être testés afin d'étudier si l'un d'eux est impliqué dans la localisation de FPC5 aux corps basaux.

V. FPC5 une kinésine putative

a. Production et purification de la forme recombinante du domaine moteur

Nous avons ensuite voulu tester *in vitro* si FPC5 possède une activité ATPase pour valider ou non le fait que ce soit une kinésine fonctionnelle. En effet, les kinésines sont connues pour se déplacer le long des microtubules grâce à l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP (Gilbert et al., 1995).

La première étape a donc consisté à purifier de manière soluble FPC5. Compte tenu des tests de solubilité réalisés pour la production de l'anticorps, nous savons que FPC5::His est insoluble. Nous avons donc essayé de produire différentes troncations de FPC5 pour voir si cela améliore la solubilité : le domaine moteur seul noté FPC5^{MD} ainsi que le domaine moteur plus la première région coiled-coil

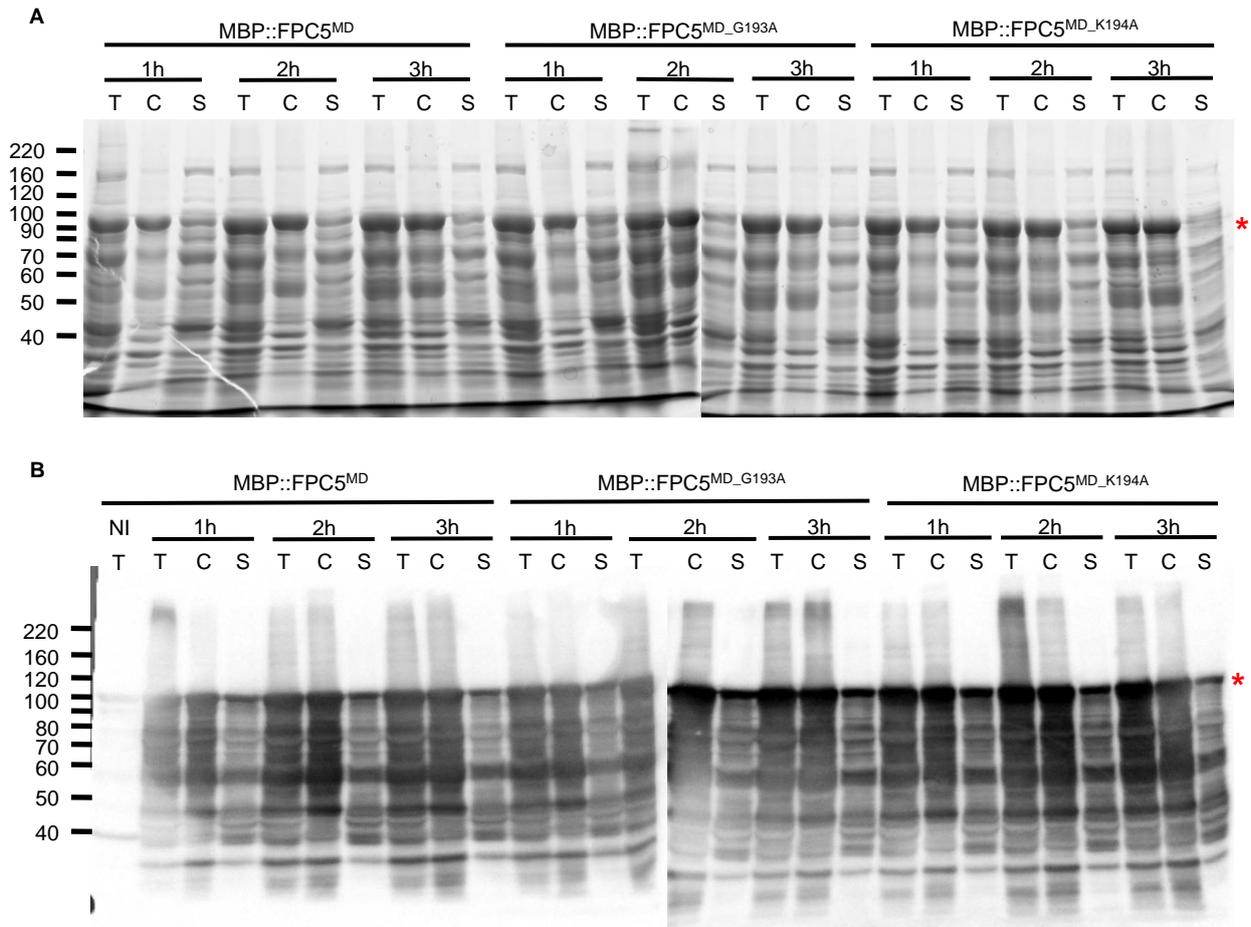


Figure 69 : Test de solubilité de MBP::FPC5^{MD} et ses mutants.

A. SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie. Les échantillons déposés correspondent aux inductions à 37°C par 0,3mM IPTG. **B.** Western blot réalisé avec l'anticorps monoclonal anti-MBP sur les mêmes échantillons que en A. La taille attendue est de 98 kDa (astérisque). NI = non-induit, T = total, C = culot et S = surnageant. Dans les conditions testées les protéines recombinantes sont partiellement solubles.

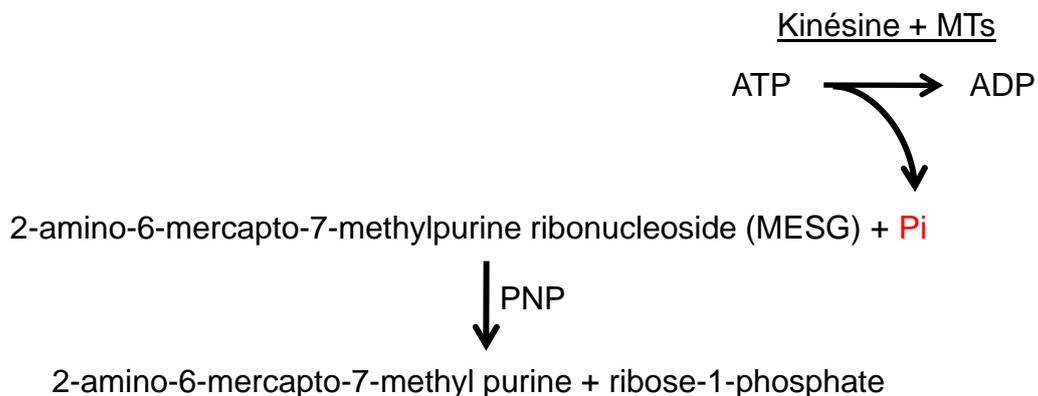


Figure 70 : Kinesin ELIPA Biochem Kit.

Réaction permettant la mesure de l'activité ATPase des kinésines. Le test est basé sur un changement d'absorbance (330 – 360 nm). Le MESG absorbe à 330 nm alors que la base purique formée absorbe à 360 nm. PNP = purine nucleoside phosphorylase.

(contenant le domaine de liaison à BILBO1) noté FPC5^{MD+CC}. Les deux constructions possèdent un tag 6 histidines en C-terminal. La solubilité a été testée après différentes conditions d'induction : en faisant varier la température d'induction (37 ou 18°C), le temps (1, 2 ou 3 heures) ainsi que la concentration en IPTG (0,2 ou 1 mM). Malgré toutes les conditions testées il s'avère que dans aucun cas on n'obtient les protéines recombinantes sous forme soluble (Figure 67).

Pour remédier au problème d'insolubilité nous nous sommes attachés à remplacer l'étiquette histidine par une étiquette GST (Glutathion S-Transférase), protéine connue pour catalyser l'ajout de glutathion réduit sur un substrat. La GST est une protéine de 26 kDa qui peut agir comme une chaperone pour faciliter le repliement de la protéine à laquelle elle est fusionnée et ainsi améliorer la production de protéines solubles (Harper and Speicher, 2011). Cette étiquette a été placée en N-terminal de la protéine. Comme précédemment, différentes conditions d'induction ont été testées pour GST::FPC5^{MD} et GST::FPC5^{MD+CC}. Là aussi, la quasi-totalité des protéines recombinantes est retrouvée dans la fraction insoluble quelles que soient les conditions d'induction (Figure 68). L'étiquette GST ne semble donc pas beaucoup améliorer la solubilisation des protéines.

D'autres étiquettes existent, telle que la MBP (Maltose Binding Protein), une protéine impliquée dans le catabolisme des maltodextrines. Cette protéine de 42,5 kDa est elle aussi connue pour faciliter le repliement de la protéine à laquelle elle est fusionnée et permet ainsi d'améliorer la solubilité des protéines recombinantes. Nous avons donc choisi de remplacer l'étiquette GST par une étiquette MBP. Selon les recommandations du fournisseur (New England Biolabs®), nous avons testé la solubilité de MBP::FPC5^{MD} et MBP::FPC5^{MD+CC} après une induction à 37°C par 0,3 mM d'IPTG pendant 1, 2 ou 3 heures. Dans ces conditions on retrouve une partie non négligeable de la protéine recombinante dans le surnageant (Figure 69). La quantité de protéine soluble n'augmente pas au cours du temps d'induction. Nous avons donc choisi de faire des inductions de 1 heure pour éviter la dégradation de la protéine. En effet, la protéine recombinante est fortement dégradée dans la bactérie. De plus, il n'y a pas de différences entre MBP::FPC5^{MD} et MBP::FPC5^{MD+CC} au niveau de la solubilité, les expériences suivantes seront donc menées uniquement avec le domaine moteur seul : MBP::FPC5^{MD}.

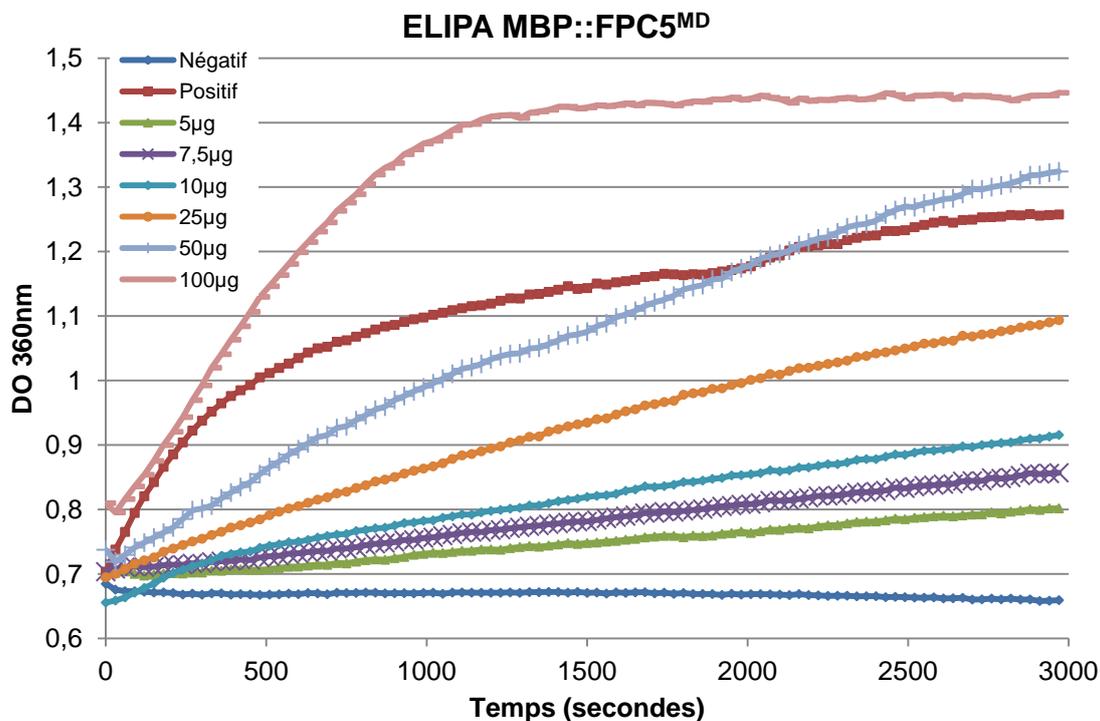


Figure 71 : Test activité ATPase (ELIPA) de MBP::FPC5^{MD}.

Mesure de l'absorbance à 360 nm toutes les 30 secondes pendant 50 minutes. Plusieurs quantités de MBP::FPC5^{MD} sont testées (5; 7,5; 10; 25; 50 et 100 µg). Le contrôle négatif ne contient pas de kinésine et le contrôle positif contient la kinésine KR01 (Kinesin Heavy Chain) fournie dans le kit. Avec 100 µg du domaine moteur on détecte une activité ATPase qui atteint un plateau.

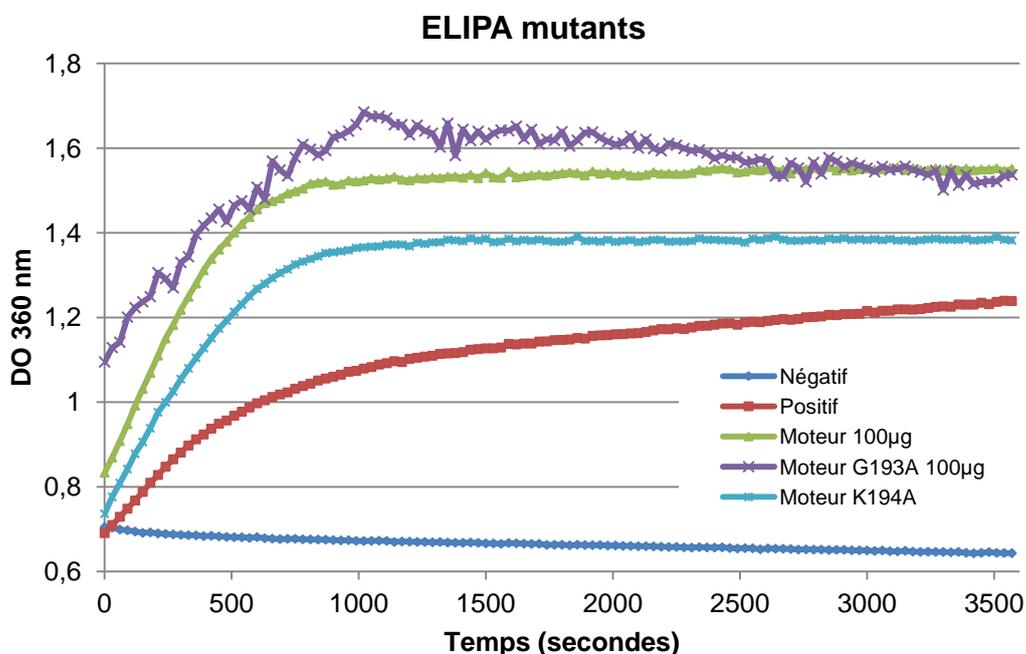


Figure 72 : Test activité ATPase (ELIPA) de MBP::FPC5^{MD}_{G193A} et MBP::FPC5^{MD}_{K194A}.

Mesure de l'absorbance à 360 nm toutes les 30 secondes pendant 60 minutes. Plusieurs quantités de chaque mutants sont testées (5; 7,5; 10; 25; 50 et 100 µg). Seule la courbe des 100 µg est représentée. Le contrôle négatif ne contient pas de kinésine et le contrôle positif contient la kinésine KR01 (Kinesin Heavy Chain) fournie dans le kit. On observe une activité similaire entre le domaine moteur non-muté et les deux simples mutants.

Une fois les conditions de production et de purification établies, nous avons construit des mutants du domaine moteur afin d'avoir un contrôle négatif pour le test de l'activité ATPase. D'après la littérature (Hu et al., 2012a; Hu et al., 2012b) deux simples mutants (du domaine P-loop) ont été construits : MBP::FPC5^{MD_G193A} et MBP::FPC5^{MD_K194A}. Comme la forme sauvage du domaine moteur, les mutants sont partiellement solubles (Figure 69).

Les protéines recombinantes ainsi produites chez la bactérie ont été purifiées sur une colonne d'affinité : MBP_Trap HP (GE Healthcare).

b. Activité ATPase

Une fois le domaine moteur sauvage et ses mutants produits et purifiés, nous avons testé leur activité ATPase. Pour ce faire nous avons utilisé un kit fourni par la société Cytoskeleton : Kinesin ELIPA (Enzyme Linked Inorganic Phosphate Assay) Biochem kit (Joel Funk et al., 2004). Ce kit est basé sur la mesure de changement d'absorbance (330 – 360 nm) qui a lieu quand le 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine ribonucleoside (MESG) est converti en 2-amino-6-mercapto-7-méthyl purine en présence de phosphate inorganique (Pi) (Figure 70). Cette réaction est catalysée par une purine nucléoside phosphorylase (PNP). Sachant qu'une molécule de phosphate inorganique donne une 2-amino-6-mercapto-7-méthyl purine, l'absorbance à 360 nm est directement proportionnelle à la quantité de phosphate inorganique générée par la réaction ATPase catalysée par la kinésine.

Etant donné qu'après purification on observe de nombreuses bandes de dégradation de la protéine recombinante (bandes reconnues par l'anticorps anti-MBP) nous avons décidé de tester plusieurs quantités de protéines (5, 7.5, 10, 25, 50 et 100 µg) pour le test ELIPA. Dans le cas de MBP::FPC5^{MD} on observe avec 100 µg de protéines un signal similaire (voir supérieur) à celui observé avec la kinésine contrôle (Kinesin Heavy Chain KR01) fournie dans le kit (Figure 71). Il semble donc que le domaine moteur possède une activité ATPase.

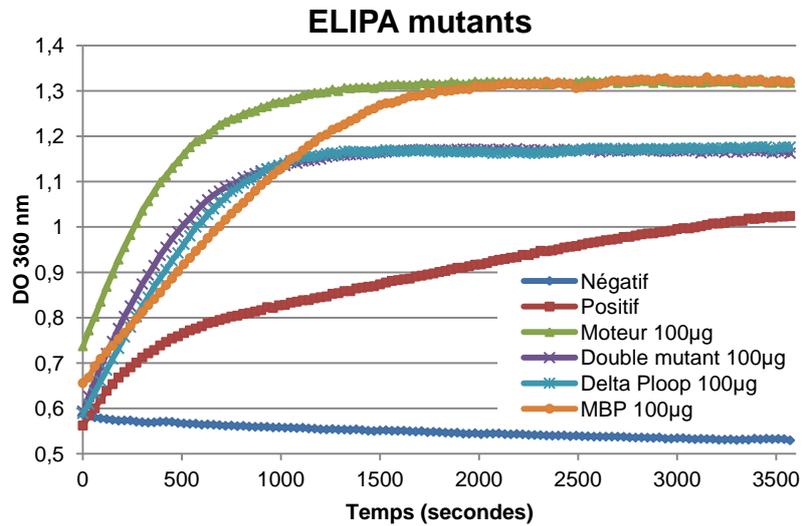


Figure 73 : Test activité ATPase (ELIPA) de MBP::FPC5^{MD}_{G193A/K194A} MBP::FPC5^{MD}_{ΔPloop} et MBP.

Mesure de l'absorbance à 360 nm toutes les 30 secondes pendant 60 minutes. Plusieurs quantités de chaque mutants sont testées (5; 7,5; 10; 25; 50 et 100 µg). Seule la courbe des 100 µg est représentée. Le contrôle négatif ne contient pas de kinésine et le contrôle positif contient la kinésine KR01 (Kinesin Heavy Chain) fournie dans le kit. Le double mutant, le mutant de délétion et la MBP seule ont une activité similaire à celle du domaine moteur non-mutée. Il y a un contaminant bactérien.

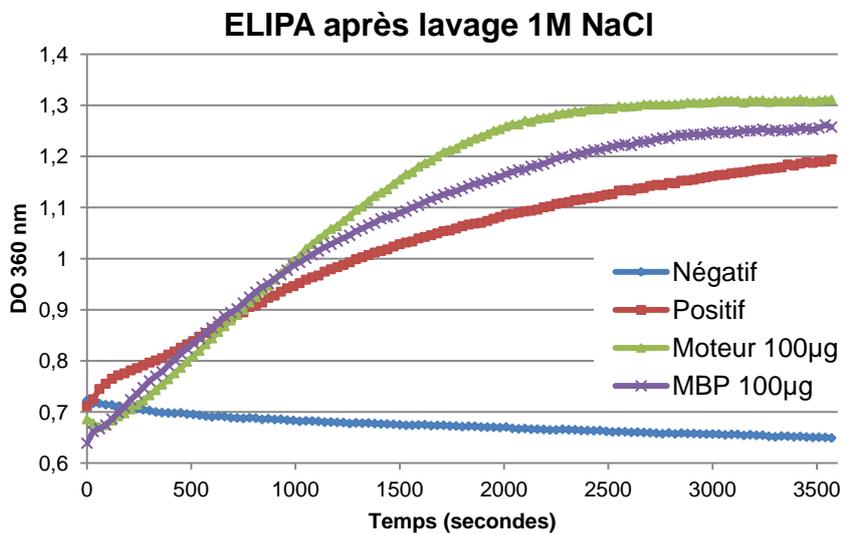


Figure 74 : Test activité ATPase (ELIPA) de MBP::FPC5^{MD} et MBP après lavage 1M NaCl.

Mesure de l'absorbance à 360 nm toutes les 30 secondes pendant 60 minutes. Plusieurs quantités de chaque mutants sont testées (25; 50 et 100 µg). Seule la courbe des 100 µg est représentée. Le contrôle négatif ne contient pas de kinésine et le contrôle positif contient la kinésine KR01 (Kinesin Heavy Chain) fournie dans le kit. Le lavage avec 1M NaCl n'a pas permis d'éliminer le contaminant bactérien.

Pour confirmer le résultat obtenu nous avons testé les deux mutants MBP::FPC5^{MD_G193A} et MBP::FPC5^{MD_K194A} dans les mêmes conditions que le domaine moteur non-muté. On s'attendait à n'obtenir aucun signal. Or, là aussi on observe un signal similaire au domaine moteur non-muté (Figure 72). Ce résultat est surprenant et nous avons donc pensé qu'une mutation ponctuelle n'était peut être pas suffisante pour inhiber l'activité ATPase dans le cas de FPC5.

Nous avons alors décidé de créer le double mutant MBP::FPC5^{MD_G193A/K194A} ainsi qu'un mutant dans lequel la région P-loop a été totalement déléetée, noté MBP::FPC5^{MD ΔP-loop}. Ces deux nouveaux mutants ainsi que l'étiquette MBP seule ont été testés pour leur activité ATPase. Là encore, on obtient pour tous une activité similaire au domaine moteur sauvage (Figure 73). Au vu des résultats obtenus nous pouvons supposer qu'après purification il reste un contaminant, probablement une ATPase bactérienne. Cela nous fait penser au cas décrit par Guo et Zho (Guo and Zhu, 2012). En effet, dans leur cas ils observaient une activité d'oxydation du NADH due à une contamination bactérienne. Dans notre cas, le contaminant se lie probablement à la colonne de purification ou à l'étiquette MBP des protéines de fusion.

Afin d'éliminer ce contaminant nous avons réalisé une nouvelle purification de la MBP seule et de MBP::FPC5^{MD} au cours de laquelle les lavages ont été réalisés dans 1M NaCl. L'activité ATPase est toujours présente avec la MBP seule et est similaire à celle de MBP::FPC5^{MD} (Figure 74). L'ajout de sels n'est donc pas suffisant pour l'élimination du contaminant bactérien.

Nous avons alors ajouté 0,1% de Triton X-100 au 1M NaCl pour le lavage. Dans ce cas MBP::FPC5^{MD} est décrochée de la colonne lors des lavages et les faibles quantités récupérées lors de l'élution ne sont pas utilisables pour tester l'activité (Figure 75).

Nous avons donc opté pour une autre stratégie afin d'éliminer le contaminant. En effet, nous avons décidé d'utiliser une colonne échangeuse d'anions (GE Healthcare) (Figure 76B) à la suite de la purification sur la colonne MBP_Trap. Nous avons dans un premier temps testé l'activité ATPase de l'étiquette MBP seule après la première colonne puis après la seconde. On observe une perte d'activité après le passage sur

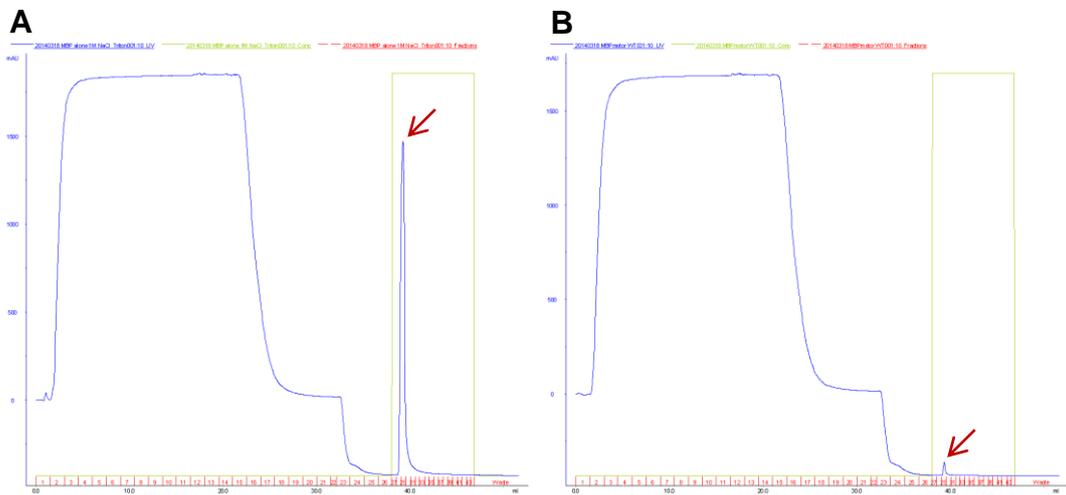


Figure 75 : Profils de purification de MBP et MBP::FPC5^{MD}.

Profil de purification sur colonne MBP_Trap HP après lavage avec 1M NaCl + 0,1% Triton X-100. **A.** MBP seule. **B.** MBP::FPC5^{MD}. Pour la MBP seule on obtient une quantité suffisante de protéine en revanche MBP::FPC5^{MD} est décrochée de la colonne lors des lavages, il n'y a quasiment rien lors de l'éluion (flèche rouge).

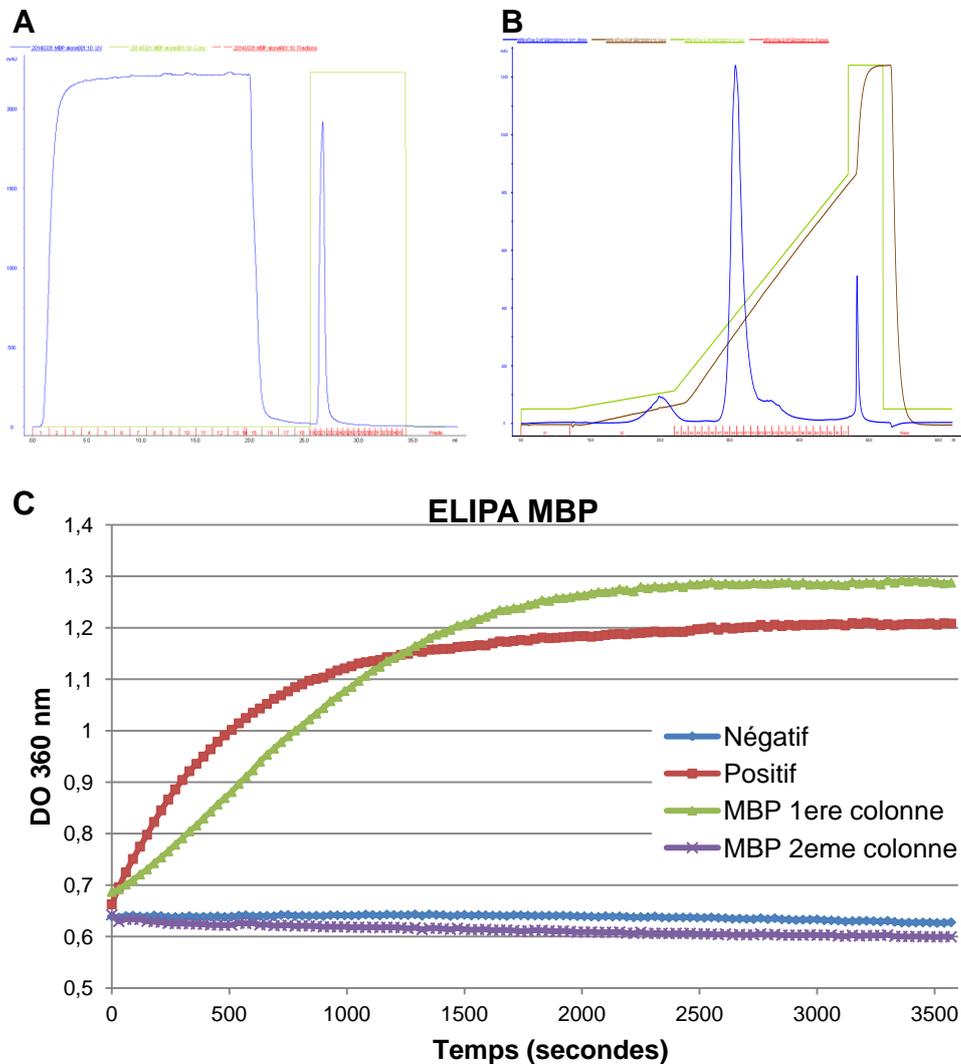


Figure 76 : Profils de purification et activité de la MBP.

Profil de purification de l'étiquette MBP seule. **A.** Après la colonne MBP_Trap (première colonne). **B.** Après passage sur échangeuse d'anions (deuxième colonne). **C.** Activité ATPase après les deux colonnes. Après passage sur l'échangeuse d'anions la MBP seule ne possède plus d'activité ATPase (courbe violette). Ces conditions permettent d'éliminer le contaminant.

l'échangeuse d'anions, ce qui signifie que l'on a réussi à éliminer le contaminant bactérien (Figure 76C). Nous avons alors purifié MBP::FPC5^{MD} dans les mêmes conditions. Cependant, après la seconde colonne on obtient un pic très étalé et de faible intensité (Figure 77B). La concentration étant insuffisante pour la mesure de l'activité ATPase nous avons voulu concentrer la protéine *via* l'utilisation de centricons YM-30 (Millipore) qui permettent de retenir la protéine sur une membrane alors que le tampon lui passe à travers. Mais, il semble que MBP::FPC5^{MD} précipite sur la membrane. En effet après passage sur un centricon nous ne parvenons pas à récolter la protéine. Pour arriver à la concentrer nous avons alors décidé de réaliser une troisième purification, sur colonne MBP, après l'échangeuse d'anions (Figure 78). Ici aussi la quantité de protéine éluée est insignifiante (Figure 78) et ne permet pas l'analyse en ELIPA. Nous supposons que la protéine ne supporte pas les changements de salinité et précipite un peu à chaque purification. En effet, pour charger la protéine sur l'échangeuse d'anions la concentration en sels passe de 200 mM à 50 mM. De plus, à la sortie de cette colonne échangeuse d'anions la protéine est dans un tampon contenant entre 200 et 300 mM de NaCl alors qu'au cours de la troisième colonne (MBP_Trap) elle est éluée dans le tampon ELIPA (15mM PIPES, 5mM MgCl₂) qui contient une quantité très faible en sels.

Afin d'essayer de fixer une plus grande quantité de protéines sur les colonnes dès le départ, plusieurs conditions ont été testées : chargement sur la colonne à 0,5 ml/min au lieu de 1 ml/min, utilisation de deux colonnes en série et augmentation du volume de culture bactérienne (1L ou 4 x 250 ml). Mais aucun de ces changements n'est satisfaisant et ne permet d'obtenir une quantité suffisante de protéines recombinantes sans contaminant pour le test ELIPA. En effet, malgré l'augmentation de la quantité de matériel de départ, la protéine semble se dégrader ou précipiter à chaque étape de purification.

La dernière solution testée a été d'ajouter un tag 6 histidines en C-terminal de la protéine de fusion MBP::FPC5^{MD} pour purifier par affinité sur colonne de nickel (His_Trap, GE Healthcare), en espérant que dans ce cas, le contaminant ne se fixe pas. Les deux protéines recombinantes MBP::FPC5^{MD}::His et MBP::FPC5^{MD} Δ P-loop::His ont été purifiées de cette façon et leur activité ATPase mesurée grâce au kit ELIPA. Là encore, on observe une activité similaire à la fois pour le domaine moteur

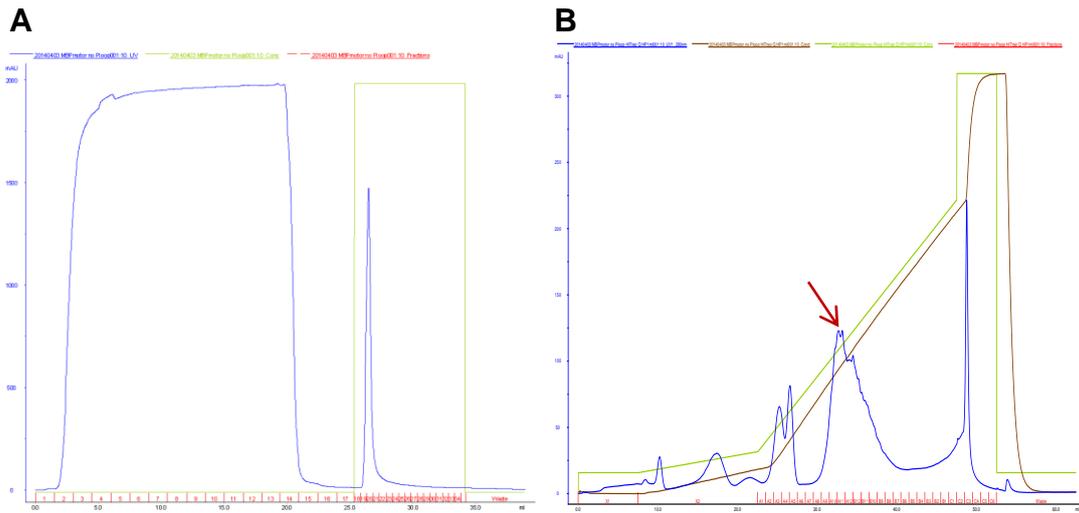


Figure 77 : Profils de purification de MBP::FPC5^{MD}_ΔPloop.

Profil de purification de MBP::FPC5^{MD}_ΔPloop. **A.** Après la colonne MBP_Trap (première colonne). **B.** Après passage sur échangeuse d'anions (deuxième colonne). Il y a une grande perte de protéine recombinante après passage sur la deuxième colonne, l'absorbance est de 100, alors qu'après la première colonne elle est de 1500. la flèche rouge désigne le pic contenant MBP::FPC5^{MD}_ΔPloop.

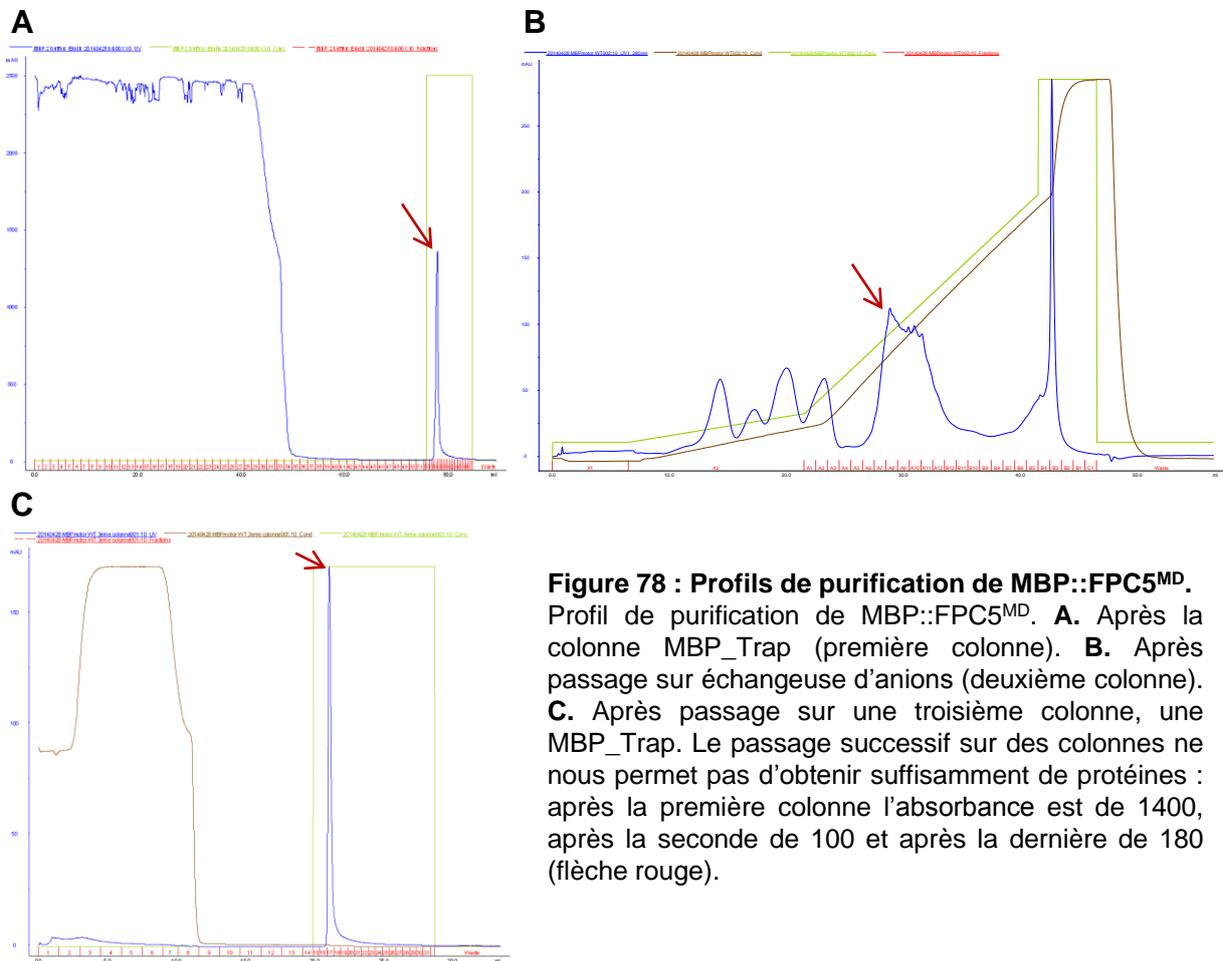


Figure 78 : Profils de purification de MBP::FPC5^{MD}.

Profil de purification de MBP::FPC5^{MD}. **A.** Après la colonne MBP_Trap (première colonne). **B.** Après passage sur échangeuse d'anions (deuxième colonne). **C.** Après passage sur une troisième colonne, une MBP_Trap. Le passage successif sur des colonnes ne nous permet pas d'obtenir suffisamment de protéines : après la première colonne l'absorbance est de 1400, après la seconde de 100 et après la dernière de 180 (flèche rouge).

sauvage et pour le mutant (Figure 79). Le contaminant n'est donc pas éliminé par purification sur colonne de nickel. Nous pouvons supposer que le contaminant se lie à l'étiquette MBP ou alors aux différentes colonnes utilisées.

Les protéines obtenues après passage sur la colonne His_Trap et contenant le contaminant ont été passées sur une colonne échangeuse d'anions (Figure 80A-B). Les concentrations de protéines purifiées étant très faible après cette deuxième colonne nous avons quand même réalisé le test ELIPA avec la quantité maximale de protéines possible. Il s'avère qu'on observe une faible activité (dû à la faible concentration en protéines recombinantes) mais similaire pour MBP::FPC5^{MD}::His et MBP::FPC5^{MD ΔPloop}::His (Figure 80C). Le contaminant semble être encore présent après passage sur la colonne échangeuse d'anions.

Toutes les conditions de purification testées ne nous permettent pas d'obtenir la protéine recombinante dans les conditions adéquates pour évaluer l'activité ATPase du domaine moteur de FPC5. En effet, la présence d'un contaminant bactérien qui possède une activité ATPase nous empêche de comparer l'activité entre sauvage et mutants. De plus, la protéine est très sensible aux changements de salinité ce qui compromet l'élimination du contaminant sur échangeuse d'anions. Nous savons aussi que les interactions entre microtubules et protéines associées aux microtubules se font dans des conditions de faible salinité. Or, les différentes protéines recombinantes produites semblent stables après purification uniquement si elles sont dans un tampon contenant au moins 200mM de NaCl. Ces constatations compromettent l'étude de l'activité ATPase de FPC5.

Un autre moyen de tester la fonctionnalité de FPC5 et qui devra être réalisé est le test de motilité sur les microtubules. Nous pourrions également tester la capacité de liaison aux microtubules, de FPC5, par des expériences de co-sédimentation. Il serait aussi judicieux de tester d'autres façons de purifier FPC5 afin de s'affranchir du contaminant bactérien. Pour cela, nous pouvons envisager l'utilisation des levures telle que *Pichia pastoris* (EasySelect™ *Pichia* expression system - Invitrogen) ou encore des cellules de mammifères, comme les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) (Suzuki et al., 2006).

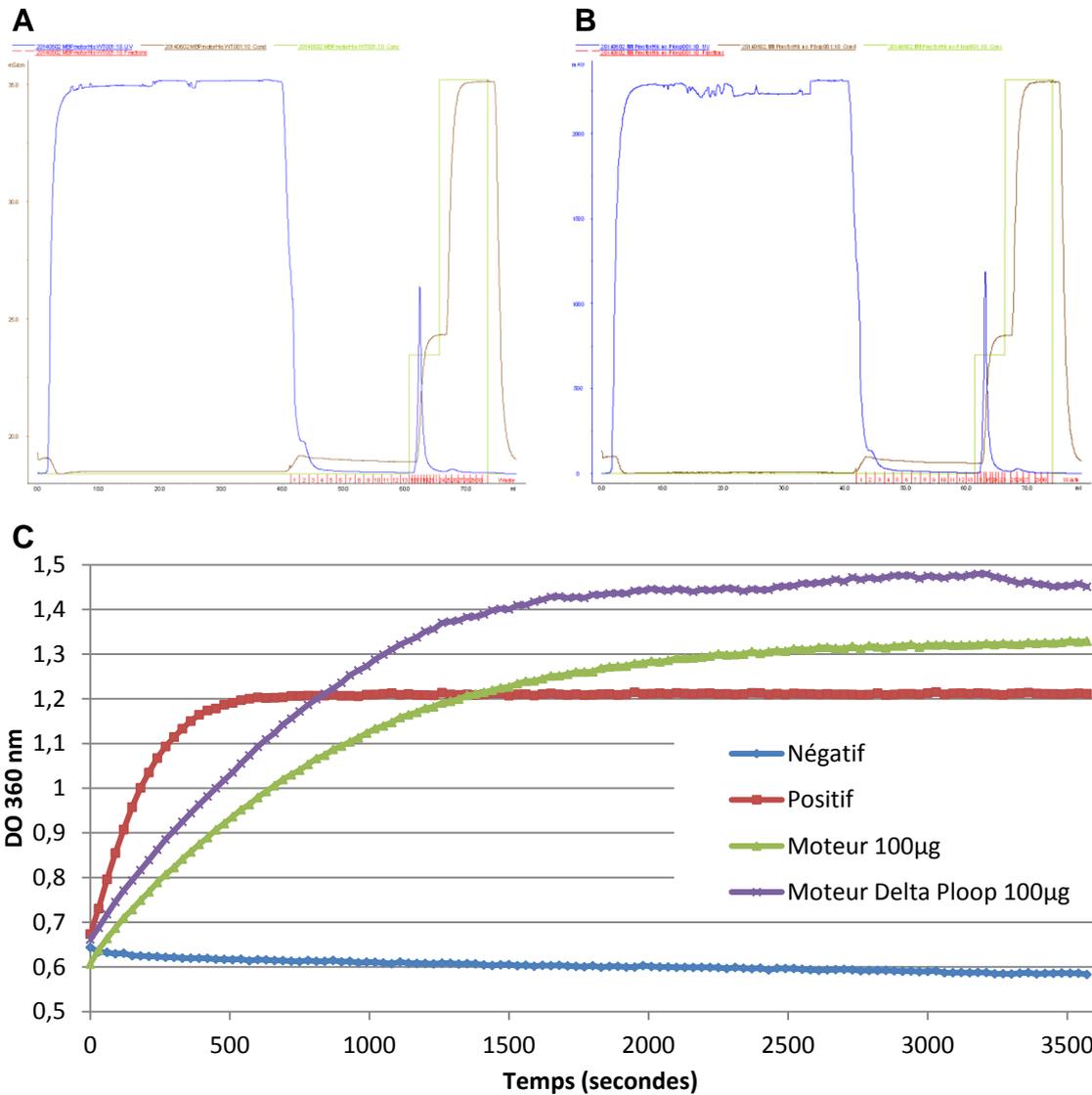


Figure 79 : Profils de purification et activité de MBP::FPC5^{MD}::His et MBP::FPC5^{MD}_{Aploop}::His .

Profil de purification sur colonne His_Trap. **A.** MBP::FPC5^{MD}::His. **B.** MBP::FPC5^{MD}_{Aploop}::His. **C.** Activité ATPase des deux protéines recombinantes. La purification sur colonne de nickel ne permet pas de supprimer le contaminant bactérien, les domaines moteurs non-muté et muté ont une activité ATPase similaire.

c. FPC5 capable de dimériser ?

Certaines kinésines sont capables de former des hétérodimères, voir des hétérotrimères, alors que d'autres sont capables de former des homodimères. De plus, la dimérisation des kinésines est nécessaire pour leur conférer une activité processive. Afin d'étudier si FPC5 a la capacité de se dimériser nous avons réalisé des tests en double-hybride entre différentes troncations de FPC5 : la forme entière, le domaine de liaison à BILBO1 (FPC5^{B1BD}, aa. 517-715) et la partie C-terminale (FPC5^{517-fin}, aa. 517-fin) (Figure 53B).

Nous pouvons observer que, quand le domaine de liaison à BILBO1 : FPC5^{B1BD} est fusionné au domaine AD, on obtient une forte interaction sur tous les milieux testés avec FPC5 et FPC5^{517-fin}, ainsi qu'une interaction uniquement sur certains milieux avec lui-même (Figure 81). Dans l'autre sens les interactions sont plus faibles voire inexistantes selon le milieu.

De plus, FPC5^{517-fin} est capable d'interagir avec lui-même sur le milieu ne contenant pas d'histidine.

Ces résultats laissent suggérer que FPC5 pourrait être capable de former des dimères grâce à ses domaines coiled-coil potentiels.

Des expériences complémentaires devront être réalisées afin de confirmer cette possible dimérisation. Pour cela des techniques de co-immunoprécipitation ou de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) pourront être utilisées.

VI. Interaction avec les autres partenaires de BILBO1

Pour étudier plus en détail l'implication de FPC5 dans la biogenèse du collier de la poche flagellaire nous nous sommes intéressés à son interaction avec les autres partenaires potentiels de BILBO1 identifiés par double-hybride et étudiés au laboratoire.

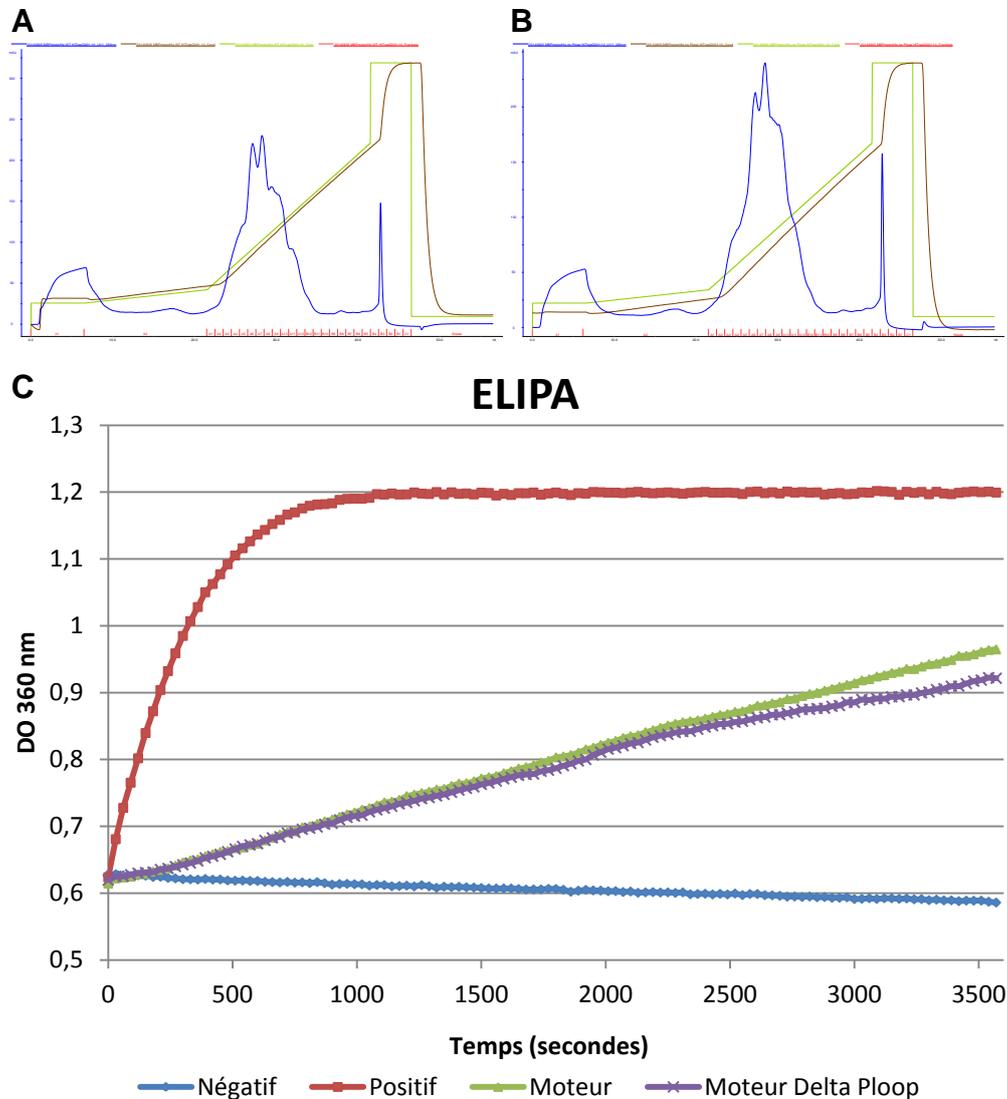


Figure 80 : Profils de purification et activité de MBP::FPC5^{MD}::His et MBP::FPC5^{MD}_{Δploop}::His.

Profil de purification sur colonne échangeuse d'anions après une première purification sur colonne His_Trap. **A.** MBP::FPC5^{MD}::His. **B.** MBP::FPC5^{MD}_{Δploop}::His. **C.** Activité ATPase des deux protéines recombinantes après les deux purifications consécutives. Le passage sur la colonne échangeuse d'anions ne permet pas d'éliminer le contaminant bactérien, les domaines moteurs non-muté et muté ont une activité ATPase similaire. L'activité est plus faible que celle du contrôle car les quantités utilisées sont faibles.

Nous avons donc réalisé un test en double-hybride pour tester l'interaction entre FPC5 et FPC2, 3, 4, 6, 7 et 9. Les interactions ont été testées sur 4 milieux (-H, -A, +X α Gal et -H-A+X α Gal+AurA). Il s'avère que par cette technique FPC5 ne semble interagir avec aucune autre protéine partenaire de BILBO1 (Figure 82). En effet, aucune croissance de levures n'est observée, excepté pour AD_FPC5 x BD_FPC4. Or nous savons par expérience, que dans ce sens les interactions avec FPC4 sont toutes positives.

Tout comme pour l'interaction avec BILBO1 il faudrait tester des tronctions de FPC5. En effet, il est possible que de part son domaine moteur (MD), FPC5 soit retenue dans le cytoplasme des levures en se liant aux microtubules. Des expériences complémentaires devront être réalisées en utilisant par exemple la tronction FPC5^{AMD}.

VII. Conclusion

Les études réalisées au cours de ma thèse, ont permis de caractériser un nouveau partenaire de BILBO1 : FPC5. En effet, des tests d'interaction en double-hybride ont montré qu'une partie du domaine coiled-coil central de FPC5, noté FPC5^{B1BD} (aa. 517-715), est capable d'interagir avec les domaines EF-hand de BILBO1. De plus, le calcium semble impliqué dans l'interaction entre ces deux protéines. Cette interaction a également été confirmée par la surexpression de ce domaine (FPC5^{B1BD}) étiqueté c-Myc chez le parasite, et pour lequel on observe une colocalisation avec BILBO1 au collier de la poche flagellaire. L'interaction a aussi été confirmée par la coexpression de BILBO1 et FPC5::GFP en système hétérologue. Dans ce cas on observe une relocalisation de FPC5::GFP sur les structures de BILBO1.

Les études sur la localisation de FPC5 révèlent que cette protéine est présente majoritairement dans la région des corps basaux mais aussi en moindre partie au niveau du collier de la poche flagellaire. Cette dernière localisation est en faveur de l'interaction entre BILBO1 et FPC5.

	-H	-A	+AurA	+XαGal	complet
AD_FPC5 x BD_FPC5	-	-	-	-	-
AD_FPC5 ^{B1BD} x BD_FPC5	+	+	+	+	+
BD_FPC5 ^{B1BD} x AD_FPC5	-	-	ND	-	-
AD_FPC5 ^{B1BD} x BD_FPC5 ^{B1BD}	+	-	+	+/-	-
AD_FPC5 ^{B1BD} x BD_FPC5 ^{517-fin}	+	+	+	+	+
BD_FPC5 ^{B1BD} x AD_FPC5 ^{517-fin}	+	-	ND	+	-
AD_FPC5 ^{517-fin} x BD_FPC5 ^{517-fin}	+	-	-	-	-
AD_FPC5 ^{517-fin} x BD_FPC5	-	-	-	-	-
BD_FPC5 ^{517-fin} x AD_FPC5	-	-	ND	-	-

Figure 81 : FPC5 est capable de former des homodimères ?

Étude de l'interaction entre FPC5 et ses tronctions par double-hybride afin de déterminer si elle est capable de former des homodimères. + : interaction et - : pas d'interaction. FPC5^{B1BD} semble interagir avec FPC5 et FPC5^{517-fin} dans un sens. FPC5 pourrait être capable de former des dimères.

L'ARN interférence de FPC5 nous a permis de diminuer le niveau d'ARN, cependant ce niveau n'est jamais nul. Il se pourrait que la quantité restante soit suffisante pour maintenir les cellules en vie.

Cependant, suite à l'induction de l'ARNi plusieurs phénotypes sont observés. Certains sont mineurs, on observe au total moins de 10% des cellules avec au moins un flagelle détaché. Ce phénotype est lié à un défaut de synthèse du filament de la FAZ. On observe également l'apparition d'un peu moins de 20% de cellules anormales : des zoïdes, des cellules 1K2N et des cellules multi-nucléées, traduisant un défaut de cytodierèse. Ce défaut de cytodierèse pourrait être lié à l'absence de FAZ car il a été décrit que la FAZ définit l'emplacement du sillon de clivage (Kohl et al., 2003; Robinson et al., 1995). Néanmoins, le phénotype majeur observé est la présence de cellules (63% après 72h d'induction) dont le kinétoplaste est mal positionné. Plusieurs cas de figure sont observés : le kinétoplaste est toujours en position postérieure mais accolé au noyau, le kinétoplaste est au dessus du noyau ou le kinétoplaste est placé derrière le noyau (côté antérieur), ce dernier cas rappelant les cellules épimastigote.

Au vu de la localisation de FPC5 et des phénotypes observés après induction de l'ARNi, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses quant à la fonction de FPC5 chez *T. brucei*. Celles-ci seront discutées dans le dernier chapitre de la thèse.

A l'heure actuelle, nous ne sommes pas parvenus à purifier de manière complètement pure le domaine moteur de FPC5. En effet, un contaminant bactérien ayant une activité ATPase est toujours présent après élution et il semble se lier à l'étiquette MBP.

Néanmoins, la surexpression du domaine moteur de FPC5 chez la forme procyclique du parasite, nous a permis de montrer la capacité de ce dernier à lier les microtubules.

De plus, des données préliminaires de double-hybride révèlent que FPC5 pourrait être capable de former des dimères.

	-H	-A	+AurA	+XαGal	complet
AD_FPC5 x BD_FPC2	-	-	ND	-	-
BD_FPC5 x AD_FPC2	-	-	ND	-	-
AD_FPC5 x BD_FPC3	-	-	ND	-	-
BD_FPC5 x AD_FPC3	-	-	ND	-	-
AD_FPC5 x BD_FPC4	+	-	ND	+	-
BD_FPC5 x AD_FPC4	-	-	ND	-	-
AD_FPC5 x BD_FPC6	-	-	ND	-	-
BD_FPC5 x AD_FPC6	-	-	ND	-	-
AD_FPC5 x BD_FPC7	-	-	ND	-	-
BD_FPC5 x AD_FPC7	-	-	ND	-	-
AD_FPC5 x BD_FPC9	-	-	ND	-	-
BD_FPC5 x AD_FPC9	-	-	ND	-	-

Figure 82 : Interaction entre FPC5 et les partenaires de BILBO1.

Résultats du double-hybride pour tester l'interaction entre FPC5 et les partenaires de BILBO1, composants potentiels du collier. + : interaction et - : pas d'interaction. Il semble y avoir une interaction entre FPC5 et FPC4 sur les milieux les moins stringents et uniquement dans un sens. Sens dans lequel FPC4 interagit avec toutes les protéines.

FPC9 un partenaire potentiel de BILBO1

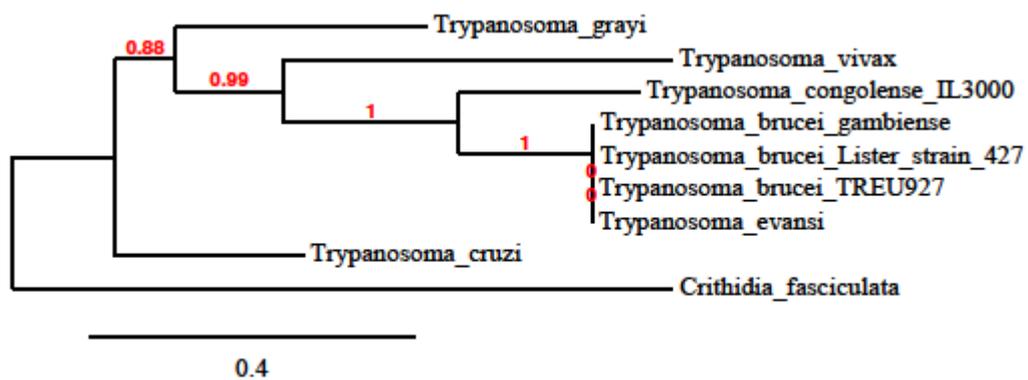


Figure 83 : Homologues de FPC9 chez les *Kinetoplastida*.

Arbre phylogénétique des 9 homologues de FPC9 chez les *Kinetoplastida*, réalisé avec le logiciel Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>).

Dans le but de compléter le crible effectué par la société Hybrigenics et ainsi trouver de nouveaux partenaires de BILBO1, un crible à été réalisé au laboratoire en utilisant comme proie une banque d'ADN génomique de *T. brucei*, elle aussi réalisée au laboratoire, et en appât : BILBO1.

Ce crible nous a permis d'identifier de nouveaux partenaires potentiels de BILBO1 dont une protéine que nous avons appelé FPC9.

Comme FPC5, FPC9 n'avait pas été caractérisée. J'ai donc réalisé au cours de ma thèse des analyses préliminaires de cette protéine, afin de déterminer sa localisation et d'étudier son rôle dans la cellule.

I. Carte d'identité de FPC9

FPC9 est codée par le gène *Tb927.10.13740* d'une taille de 1785 pb. Il est retrouvé dans le génome sous forme d'une copie unique, sur le chromosome 10. FPC9 est une protéine de 594 aa, soit environ 67,3 kDa. L'étude transcriptomique montre que le taux d'ARNm de FPC9 est légèrement plus élevé lors de la phase G2/M (Archer et al., 2011). De plus, ce taux d'ARNm est légèrement plus élevé chez la forme procyclique que chez la forme sanguine (Jensen et al., 2009).

Contrairement à BILBO1, FPC9 n'est retrouvée dans aucun des protéomes flagellaires de *T. brucei* (Broadhead et al., 2006; Ralston et al., 2009; Subota et al., 2014). Elle est néanmoins retrouvée dans le phosphoprotéome (Urbaniak et al., 2013) qui montre la présence de cinq sites de phosphorylation : S437, S441, S443, S447, S459 et T460.

FPC9 possède des homologues chez certains *Kinetoplastidae* : les espèces du genre *Trypanosoma* avec un pourcentage d'identité compris entre 50 et 100% (*T. brucei* spp. \approx 100%, *T. evansi* \approx 100%, *T. congolense* \approx 68%, *T. cruzi* \approx 52%, *T. grayi* \approx 51% et *T. vivax* \approx 50%) mais aussi avec *C. fasciculata* (\approx 36%). Au contraire, aucun homologue n'est rencontré chez le genre *Leishmania* (Figure 83).

Tout comme FC5, FPC9 semble être un partenaire potentiel de BILBO1 particulièrement intéressant car elle possède une fonction putative. En effet, dans la

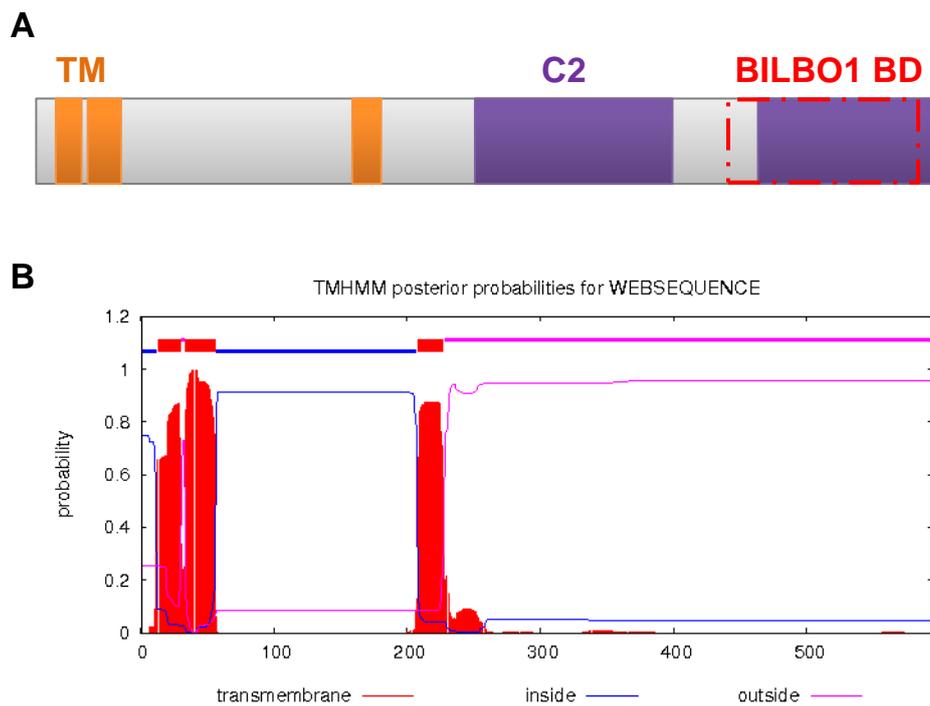


Figure 84 : Structure de FPC9

A. Schéma de la structure primaire de FPC9 qui contient trois régions transmembranaires prédites (orange) ainsi que deux domaines C2 (violet). Le domaine putatif de liaison à BILBO1 (rouge) couvre partiellement le deuxième domaine C2. **B.** Prédiction des régions transmembranaires par le serveur TMHMM.

base de données TriTrypDB (Aslett et al., 2010) elle est annotée comme synaptotagmine putative (protéine de liaison aux lipides de manière calcium dépendante). De plus, chez *T. brucei*, c'est l'unique protéine prédite pour posséder cette fonction, ce qui la rend particulièrement intéressante et qui laisse supposer qu'elle est très importante pour le parasite. En effet, que ce soit chez l'Homme, la souris ou le rat, on dénombre entre 15 et 16 isoformes de synaptotagmine.

Nous avons donc cherché à mettre en lumière les différents domaines et structures potentiels de FPC9. Le serveur COILS (Lupas et al., 1991) ne prédit aucun domaine coiled-coil. Le serveur TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) prédit trois régions transmembranaires (aa. 13-30, 34-56 et 208-227) (Figure 84B). De plus, le serveur Superfamily (Wilson et al., 2009) (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/>) prédit la présence de deux domaines C2 (aa. 289-419 et 475-591) (Figure 84A). Ces domaines sont composés de 8 feuillets β antiparallèles et sont capables de lier 2 ou 3 ions calcium permettant ainsi la liaison calcium-dépendante aux phospholipides. FPC9 possède donc un court domaine N-terminal ainsi que deux domaines C2 comme les synaptotagmines (Figure 84A). Cependant, elle possède trois domaines transmembranaires putatifs alors que les synaptotagmines n'en possèdent qu'un. Mais la présence d'un nombre impair de domaines transmembranaires permettrait de placer le domaine N-terminal à l'intérieur des vésicules et les domaines C2 du côté cytoplasmique, tout comme c'est le cas pour les synaptotagmines. Excepté le nombre différent de domaines transmembranaires, la prédiction des domaines laisse penser que FPC9 est une synaptotagmine potentielle.

II. FPC9 un partenaire potentiel de BILBO1

a. Interaction avec BILBO1

Pour vérifier l'interaction obtenue à la suite du crible en double-hybride réalisé au laboratoire, nous avons testé l'interaction entre les formes entières de BILBO1 et de FPC9, dans les deux sens.

Les résultats montrent qu'aucune interaction n'est observée avec les formes entières de chaque protéine, quel que soit le sens testé (Figure 85D). Ceci peut être

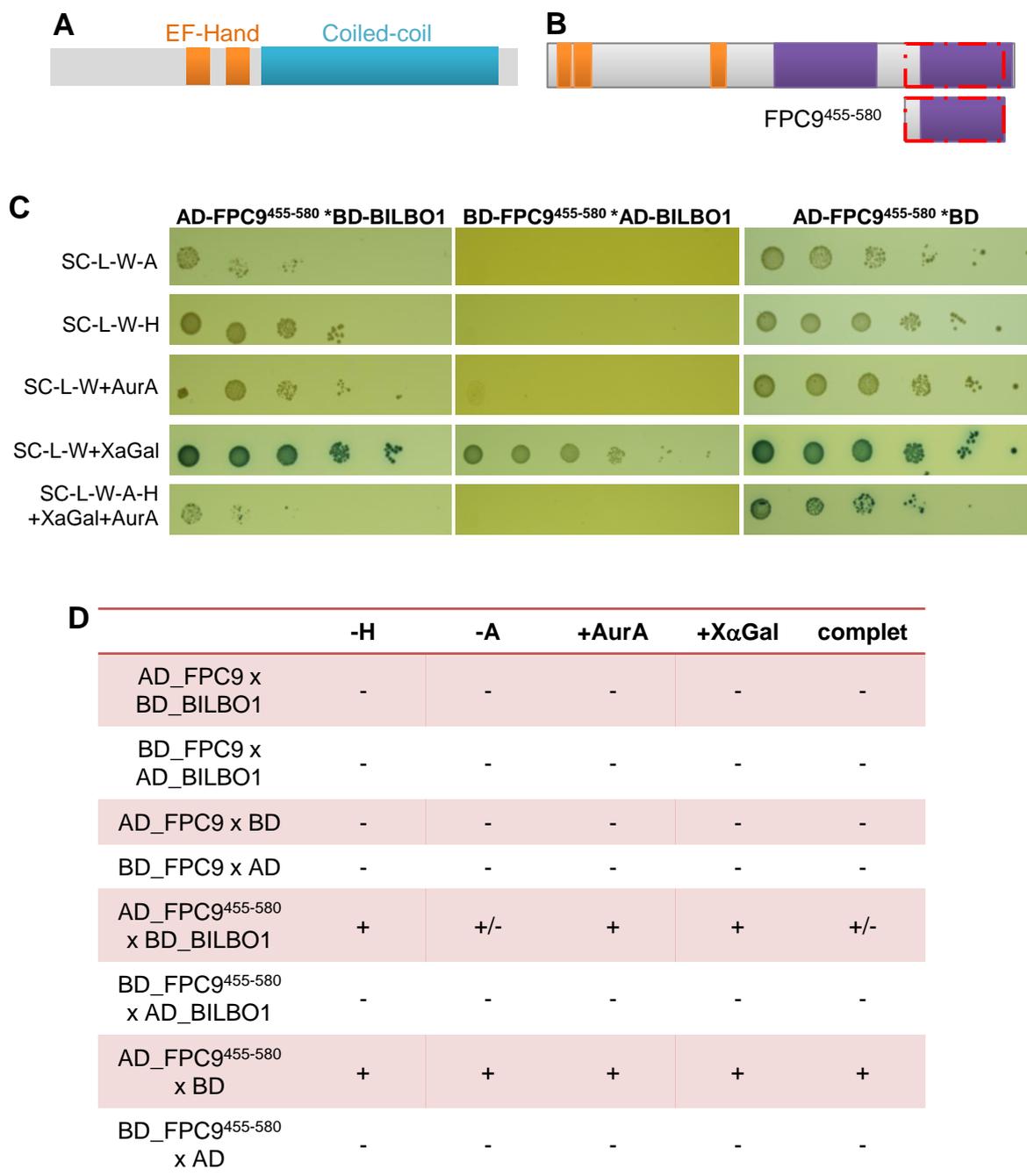


Figure 85 : Test d'interaction entre FPC9 et BILBO1.

A. Schéma de BILBO1 qui possède deux motifs EF-hand (orange) et une région coiled-coil (bleu).
B. Troncations de FPC9. **C.** Test d'interaction entre FPC9⁴⁵⁵⁻⁵⁸⁰ et BILBO1 sur les différents milieux de sélection. **D.** Tableau récapitulatif des résultats du test d'interaction entre FPC9 et BILBO1. + : interaction et - : pas d'interaction.

du à la présence de domaines transmembranaires dans FPC9 qui empêcheraient le transport de cette dernière au noyau du fait de son enchâssement dans une membrane.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons alors décidé de tester le fragment identifié *via* le crible : FPC9⁴⁵⁵⁻⁵⁸⁰ (Figure 85B), contre BILBO1 entière (Figure 85A) et ce dans les deux sens. Dans le sens de la banque, c'est-à-dire BILBO1 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (BD), on observe une interaction avec FPC9⁴⁵⁵⁻⁵⁸⁰ sur tous les milieux d'interaction testés. Cependant, une interaction est aussi observée entre le BD seul et FPC9⁴⁵⁵⁻⁵⁸⁰ fusionné au AD. Cette interaction ne semble donc pas spécifique. De plus, lorsque l'on réalise le test dans l'autre sens aucune interaction n'est observée (Figure 85C-D).

Au vu de ces résultats, il semble donc que l'interaction identifiée par le crible double-hybride entre BILBO1 et FPC9 soit faussement positive. Cependant un test d'interaction entre les deux formes entières devra être réalisé *via* le système de double-hybride adapté aux protéines transmembranaires (Lentze and Auerbach, 2001; Snider et al., 2010), afin de confirmer les résultats obtenus. La troncation FPC9^{ΔTM} pourra également être testée.

Nous pourrions également envisager de tester l'interaction entre ces deux protéines par des expériences de co-immunoprécipitation. Cependant, la forme entière de ces protéines est insoluble. Il faudra donc envisager de tester des troncations, si nous parvenons à les produire de manière soluble.

b. Interaction avec les autres partenaires de BILBO1

Afin d'évaluer une possible implication de FPC9 dans la composition ou la biogenèse du collier de la poche flagellaire, nous avons utilisé la technique du double-hybride afin d'étudier son interaction avec les autres partenaires potentiels de BILBO1.

Quand la forme entière de FPC9 est fusionnée au domaine activateur (AD) du facteur de transcription GAL4 une interaction est observée uniquement avec FPC4 fusionnée au BD sur les milieux SC-L-W-H, SC-L-X+AurA et SC-L-W+X_αGal. Or

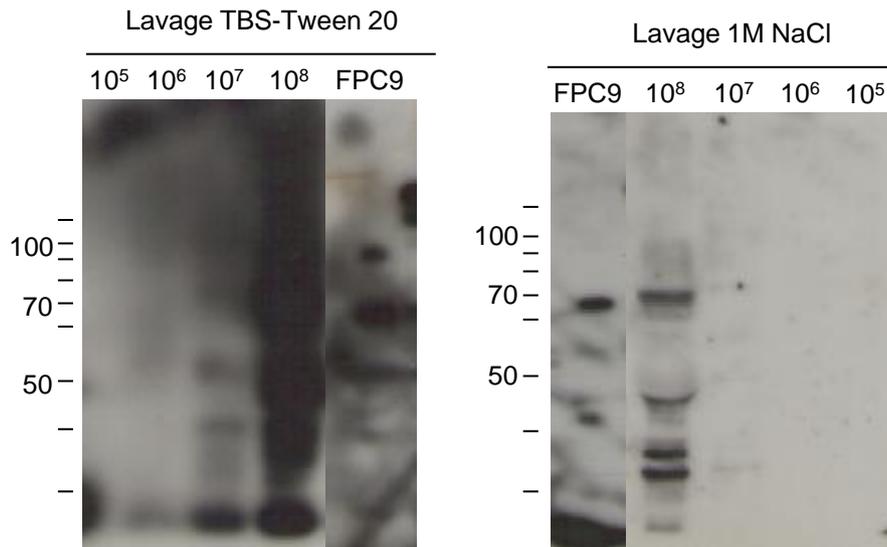


Figure 86 : Western blot avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9.

L'anticorps est testé sur des cytosquelettes provenant de 10^5 à 10^8 cellules *Tb427* 29.23 et 50 ng de FPC9::His purifiée. Le poids moléculaire attendu est 67,3 kDa. L'anticorps reconnaît la protéine recombinante mais aussi la protéine endogène seulement en présence de 10^8 cellules. Le lavage des membranes avec 1M de NaCl (panel de droite) améliore la révélation bien que l'anticorps reconnaisse quand même d'autres protéines dans un lysat cellulaire.

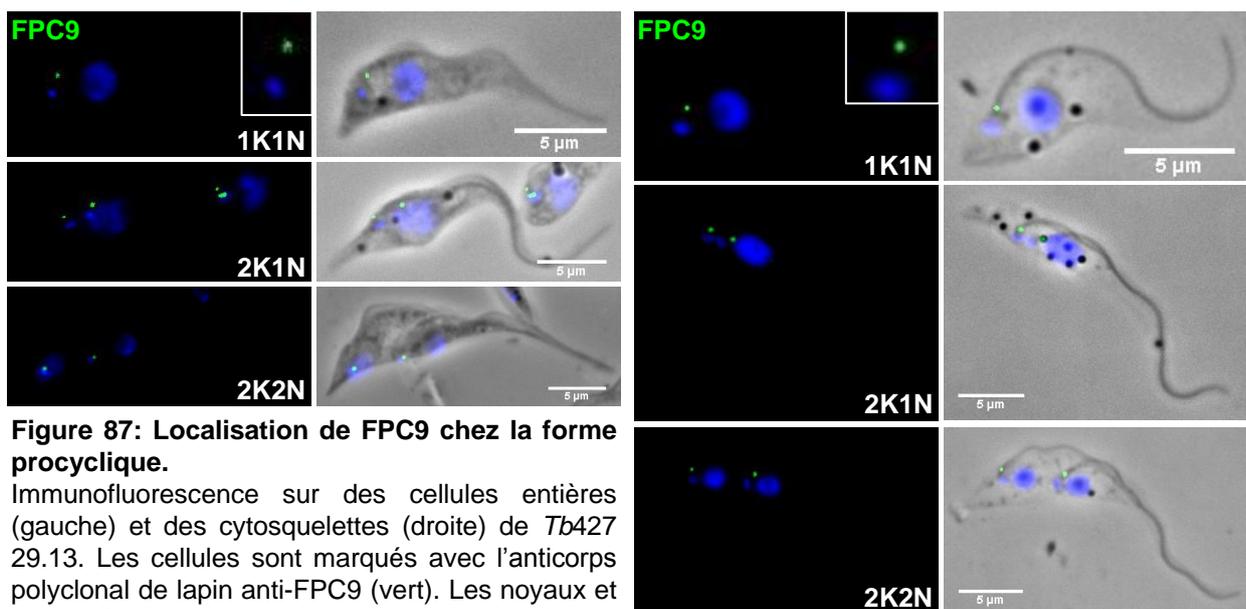


Figure 87: Localisation de FPC9 chez la forme procyclique.

Immunofluorescence sur des cellules entières (gauche) et des cytosquelettes (droite) de *Tb427* 29.13. Les cellules sont marquées avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 (vert). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). FPC9 est localisée proche de la base du flagelle.

nous savons que dans ce sens FPC4 interagit avec toutes les protéines testées. En revanche, dans l'autre sens, c'est-à-dire FPC9 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (BD) de GAL4 aucune interaction n'est observée. Tout comme l'interaction avec BILBO1, il est possible que les domaines transmembranaires de FPC9 gênent pour sa relocalisation au noyau. Une version tronquée de FPC9 sans ses domaines transmembranaires devra être testée : FPC9^{ΔTM}, ou alors il faudra utiliser le système de double-hybride adapté aux protéines transmembranaires.

Ayant à notre disposition le domaine FPC9⁴⁵⁵⁻⁵⁸⁰, nous avons choisi de le tester contre les partenaires potentiels de BILBO1. Quand ce domaine est fusionné au domaine activateur (AD) du facteur de transcription GAL4 on observe une interaction avec BILBO1, FPC3, FPC4 et FPC6, cela sur tous les milieux d'interaction testés. Cependant, le contrôle révèle également une interaction avec le domaine de liaison (BD) de GAL4 seul. L'interaction avec ces quatre protéines ne semble donc pas spécifique. Pour le confirmer nous avons testé l'interaction dans l'autre sens, c'est-à-dire que FPC9⁴⁵⁵⁻⁵⁸⁰ est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (BD). Dans ce cas, il n'y a aucune interaction entre ce domaine de FPC9 et les autres partenaires de BILBO1.

Nous avons également testé l'interaction de FPC9 contre elle même, cependant aucune interaction positive n'a été observée.

Ces résultats suggèrent que FPC9 n'est pas un membre du collier de la poche flagellaire de *T. brucei*. L'interaction trouvée par le crible double-hybride pourrait donc être un faux positif. Cependant, cette hypothèse devra être confirmée par d'autres tests d'interaction : notamment en utilisant la troncation FPC9^{ΔTM} ou par un test en double-hybride adapté aux protéines transmembranaires.

III. FPC9 une protéine proche de la zone de transition

a. Production d'un anticorps polyclonal

Afin d'étudier FPC9, un anticorps polyclonal a été produit chez le lapin. Pour cela, FPC9 fusionnée à une étiquette 6-histidines en C-terminal a été exprimée chez la

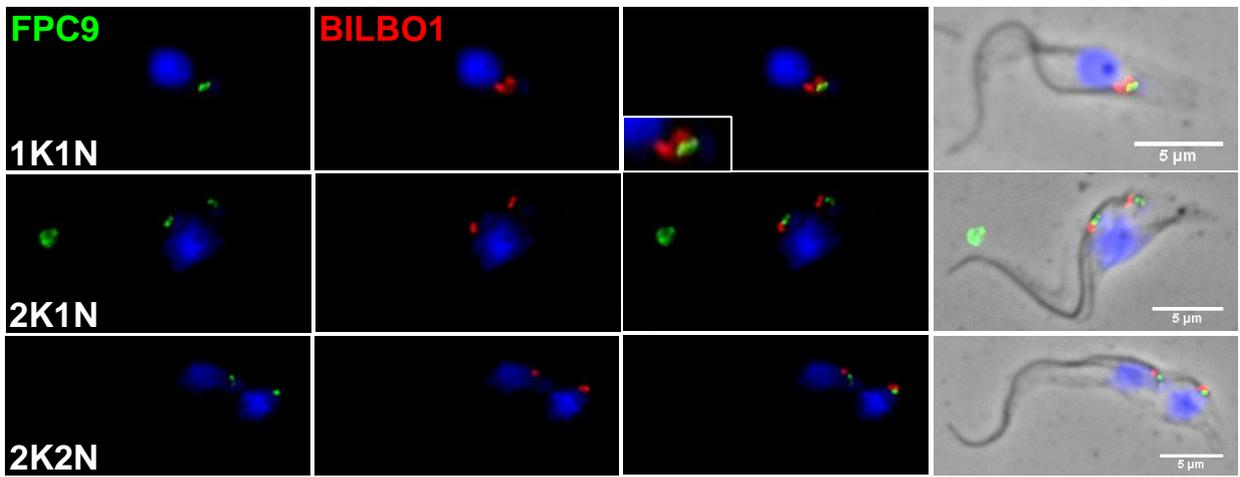


Figure 88 : FPC9 n'est pas localisée au collier de la poche flagellaire.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *Tb427 29.13*. Les cytosquelettes sont marqués avec un anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 (vert) et un anticorps anti-BILBO1 (rouge). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). FPC9 n'est pas colocalisée avec BILBO1 au collier de la poche flagellaire.

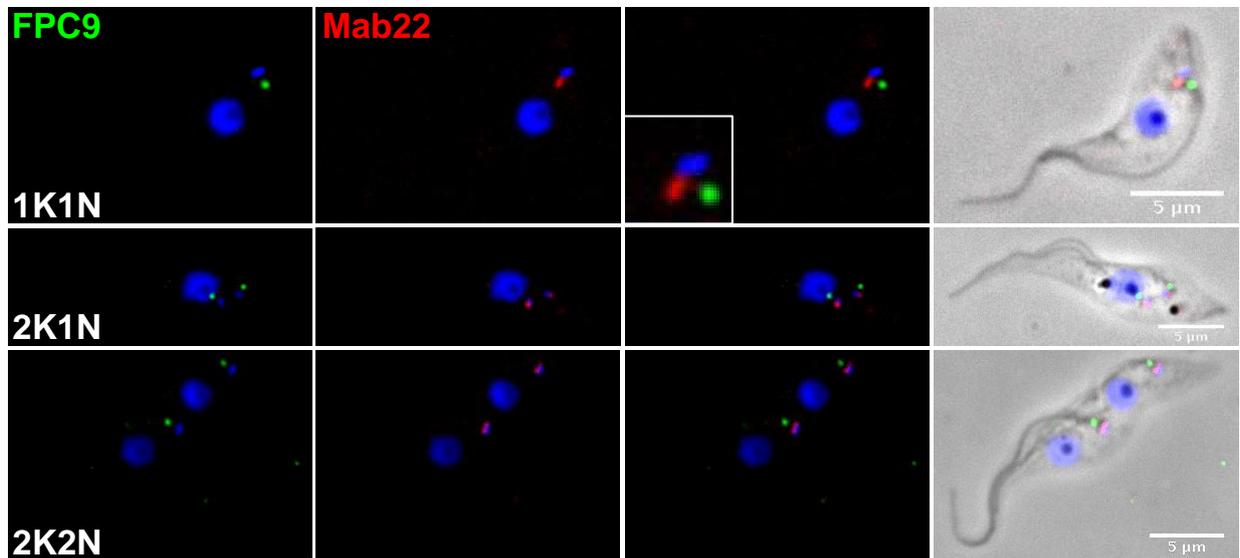


Figure 89 : FPC9 n'est pas localisée aux corps basaux.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *Tb427 29.13*. Les cytosquelettes sont marqués avec un anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 (vert) et Mab22 (rouge). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). FPC9 n'est pas colocalisée avec Mab22 aux corps basaux.

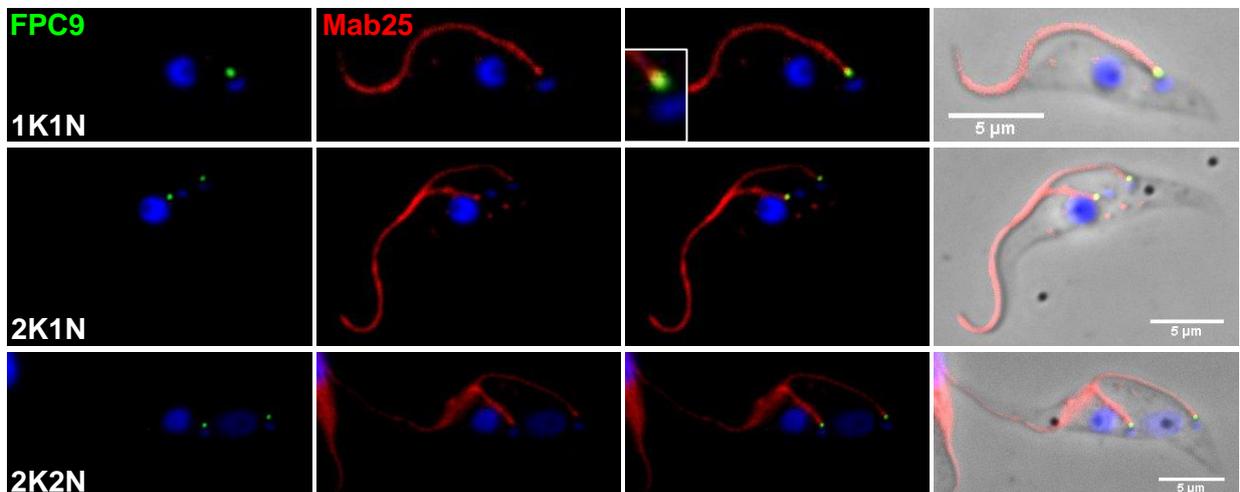


Figure 90 : FPC9 est localisée à la zone de transition.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *Tb427 29.13*. Les cytosquelettes sont marqués avec un anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 (vert) et Mab25 (rouge, axonème). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). FPC9 se localise juste à la base de l'axonème.

bactérie *E. coli* BL21. Tout comme pour FPC5, les tests de solubilité montrent que la protéine de fusion est insoluble. Le culot a donc été repris dans un tampon dénaturant à 8 M d'urée pour solubiliser les protéines. Les protéines ainsi solubilisées ont été purifiées par affinité sur colonne de nickel avant d'être dialysées contre 6 M d'urée. FPC9::His purifiée a ensuite servi à immuniser des lapins pour produire un anticorps polyclonal.

Cet anticorps a été testé à la fois par immunofluorescence (traité dans le paragraphe suivant) et par western blot. Avant toute analyse, l'anticorps a été purifié des protéines contenues dans le sérum, telles que l'albumine ou la transferrine, *via* le kit Melon™ Gel IgG Purification (Thermo Scientific). En western blot, l'anticorps est capable de reconnaître la protéine recombinante purifiée. On observe une bande à la taille attendue $\approx 67,3$ kDa mais aussi une bande à une taille inférieure correspondant sûrement à la dégradation de la protéine (Figure 86, panel de gauche), bien que des inhibiteurs de protéases aient été ajoutés à la préparation. Nous avons également réalisé un titrage pour évaluer le nombre de cellules nécessaires à la reconnaissance par l'anticorps anti-FPC9 en western blot. En effet, dans les conditions standards utilisées au laboratoire : $5 \cdot 10^6$ cellules, l'anticorps ne reconnaît pas de bande à la taille attendue. Il s'avère qu'une bande à la taille attendue est détectable en présence de cytosquelettes issus de $1 \cdot 10^8$ cellules (Figure 86, panel de gauche). L'anticorps reconnaît également d'autres bandes qui peuvent soit correspondre à une dégradation de FPC9, soit à une fixation aspécifique de l'anticorps sur d'autres protéines de *T. brucei*. Là encore, des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés pour éviter la dégradation des protéines. Nous avons aussi testé des lavages par 1M de NaCl pour limiter la fixation aspécifique, ce qui a permis d'obtenir des membranes plus propres mais ne suffit pas à éliminer les bandes aspécifiques (Figure 86, panel de droite).

b. Localisation

L'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 a aussi été utilisé pour des expériences d'immunofluorescence afin d'étudier la localisation de FPC9. Le marquage obtenu

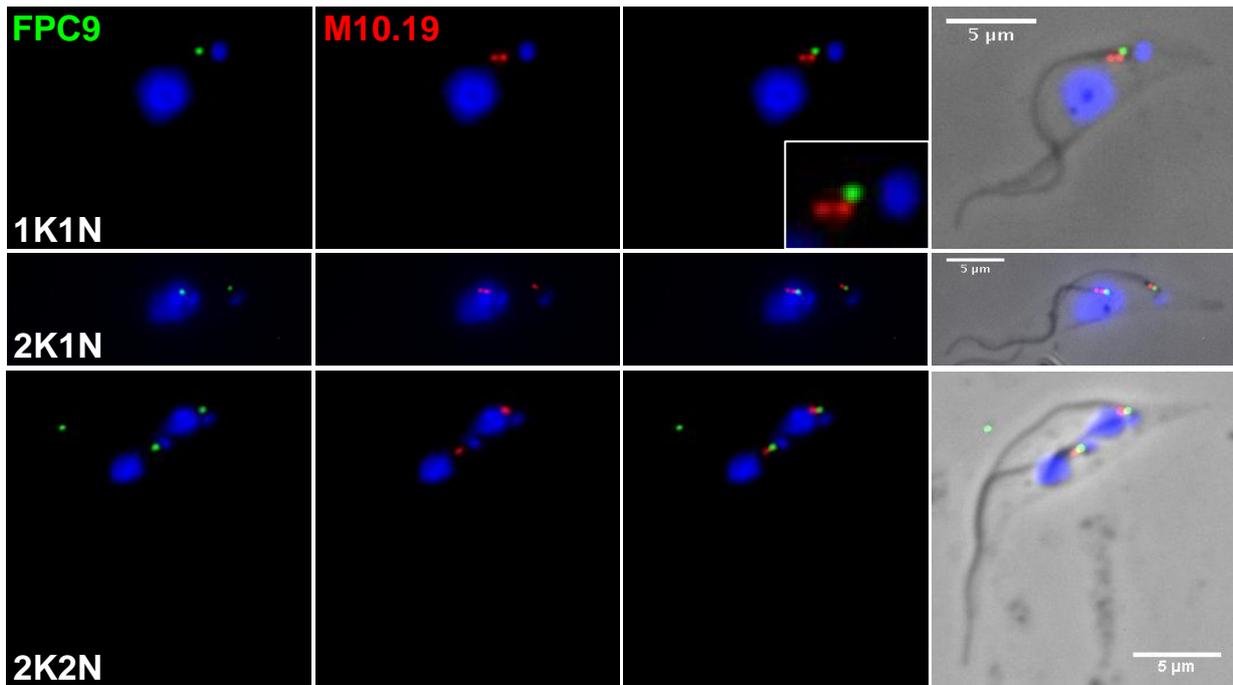


Figure 91 : FPC9 est localisée à la zone de transition.

Immunofluorescence sur des cytosquelettes de *Tb427 29.13*. Les cytosquelettes sont marqués avec un anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 (vert) et M10.19 (rouge, proche de la zone de transition). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). FPC9 se localise à la zone de transition.

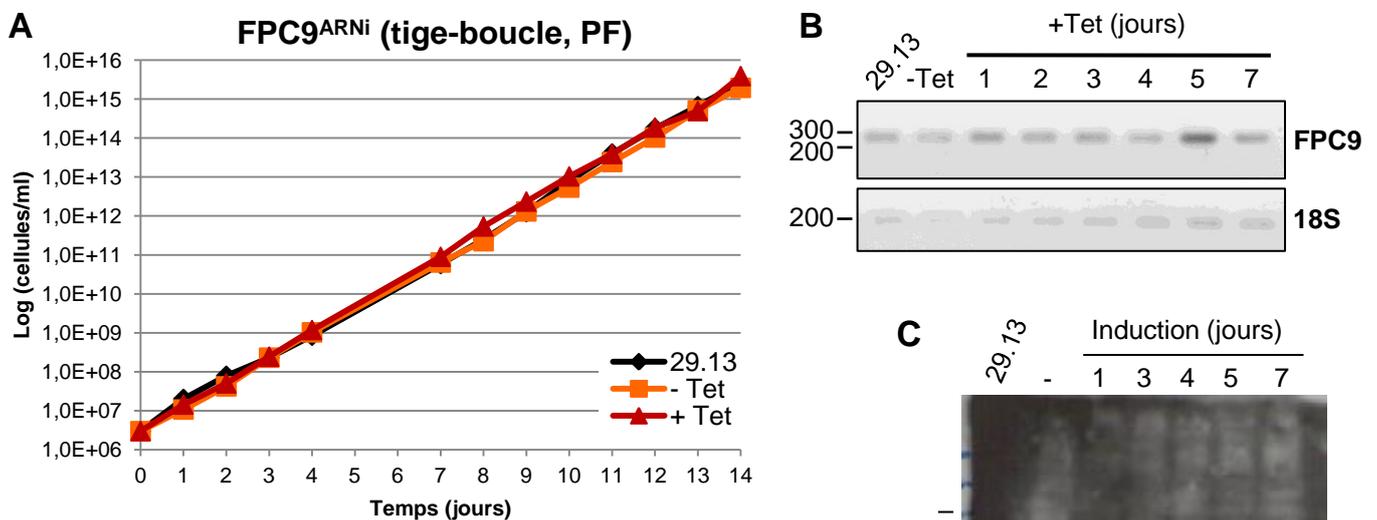


Figure 92 : FPC9^{ARNi} chez la forme procyclique.

ARNi *via* le système tige-boucle. **A.** Courbe de croissance de la souche de référence et des cellules non-induites et induites pour l'ARNi de FPC9. Après induction, aucun défaut de croissance n'est observé. **B.** RT-PCR semi-quantitative. Le taux d'ARN de FPC9 ne diminue pas même après une semaine d'induction. Le gène de référence utilisé est celui codant pour la sous-unité 18S de l'ARNr. **C.** Western blot sur des cytosquelettes issus de 10^8 cellules, avec l'anticorps anti-FPC9. Après induction on observe une bande à la taille attendue pour FPC9, ce qui suggère que l'ARNi ne fonctionne pas.

sur des cellules entières et des cytosquelettes de la forme procyclique suggèrent une localisation sur le flagelle, proche des corps basaux (Figure 87).

Pour plus de précision, des co-marquages ont été réalisés avec Mab25 (Dacheux et al., 2012) qui marque l'axonème du flagelle, Mab22 (Bonhivers et al., 2008c) qui marque les filaments de la zone d'exclusion du complexe TAC (proche des corps basaux), M10.19 (produit au laboratoire) juste au dessus de la zone de transition et l'anticorps monoclonal anti-BILBO1 (Bonhivers et al., 2008b). FPC9 ne se colocalise pas avec BILBO1 (Figure 88), ce qui confirme les résultats obtenus par double-hybride et laisse donc penser que FPC9 n'est pas une protéine du collier de la poche flagellaire. De plus, FPC9 ne se colocalise pas non plus avec Mab22 (Figure 89) ce qui signifie que cette protéine n'est pas présente dans la région des corps basaux. Cependant, le marquage de FPC9 se situe là où commence le marquage de Mab25 (Figure 90). Cet anticorps marque l'axonème et commence juste au niveau de la zone de transition. De plus, le marquage de FPC9 se situe juste en dessous de celui de M10.19, au niveau de la zone de transition du flagelle (Figure 91).

Ces résultats laissent donc penser que FPC9 est une protéine présente au niveau de la zone de transition du flagelle. Cette localisation est surprenante. En effet, si FPC9 est réellement une synaptotagmine, nous aurions pu imaginer la retrouver au niveau de la membrane de la poche flagellaire et/ou de la machinerie d'exocytose (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, vésicules ...).

Un marquage similaire est observé chez la forme sanguine du parasite. Ce résultat laisse penser que FPC9 pourrait jouer le même rôle dans les deux formes du parasite.

IV. Analyse fonctionnelle

a. ARN interférence

Afin d'étudier le rôle de FPC9 chez le parasite, nous avons réalisé l'ARN interférence *via* le système tige-boucle inductible, chez la forme procyclique. Après plus de deux semaines d'induction nous n'observons ni défaut de croissance (Figure 92A), ni apparition de phénotypes morphologiques particuliers. L'efficacité de l'ARNi a alors été vérifiée par RT-PCR semi-quantitative, par western blot et par

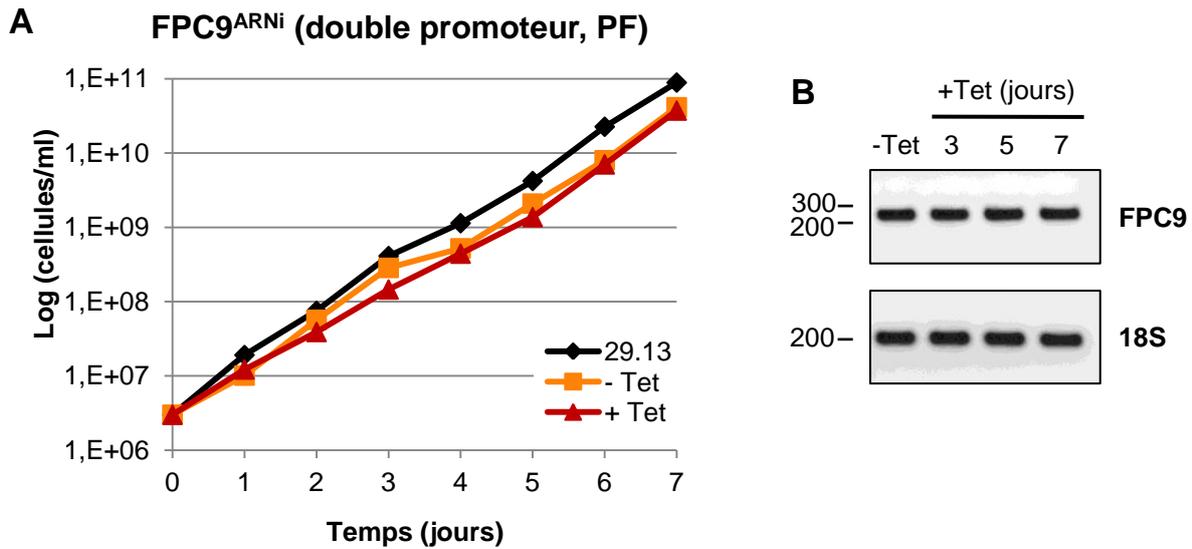


Figure 93 : FPC9^{ARNi} chez la forme procyclique.

ARNi via le système double promoteur. **A.** Courbe de croissance de la souche de référence et des cellules non-induites et induites pour l'ARNi de FPC9. Après induction, aucun défaut de croissance n'est observé. **B.** RT-PCR semi-quantitative. Le taux d'ARN de FPC9 ne diminue pas même après une semaine d'induction. Le gène de référence utilisé est celui codant pour la sous-unité 18S de l'ARNr.

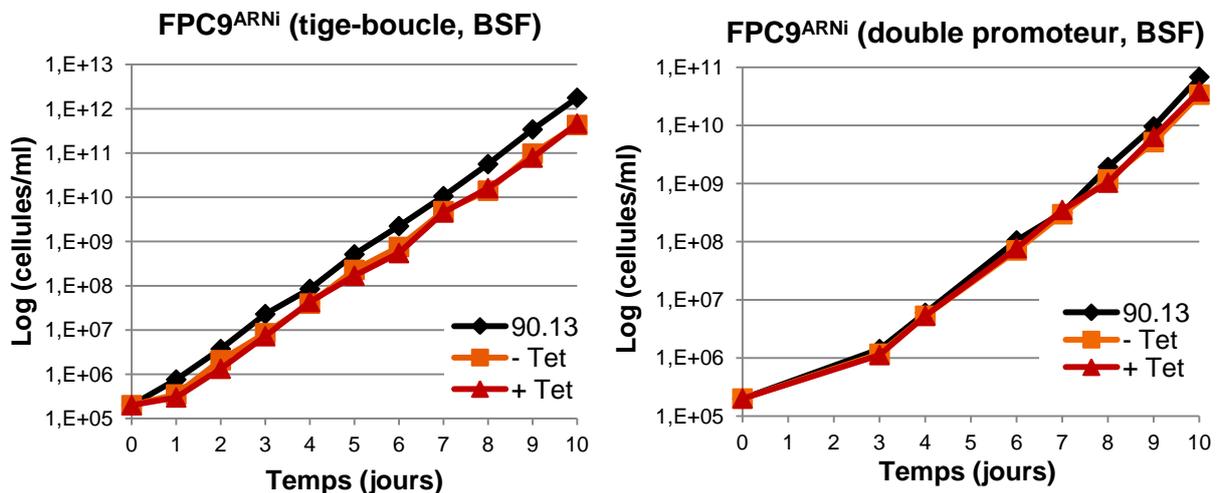


Figure 94 : FPC9^{ARNi} chez la forme sanguine.

Courbe de croissance de la souche de référence et des cellules non-induites et induites pour l'ARNi de FPC9. Deux système ont été utilisés : tige-boucle (gauche) et double promoteur (droite). Après induction, aucun défaut de croissance n'est observé.

immunofluorescence. Même après une semaine d'induction il n'y a pas de diminution ni du taux d'ARN (Figure 92B), ni du niveau de protéines (Figure 92C). La quantification des gels à l'aide du logiciel ImageJ révèle qu'après induction, le niveau d'ARN est compris entre 98% et 116% du niveau des cellules de référence. Une seconde transfection a été réalisée mais les résultats obtenus sont les mêmes. Nous pouvons donc supposer que dans notre cas ce système d'ARN interférence ne semble pas efficace ou que les cellules se sont adaptées pour contourner le système d'ARNi (Chen et al., 2003) à cause du caractère essentiel de FPC9.

Nous avons alors testé le deuxième système d'ARNi inductible, qui est le système double promoteur. Là encore aucun défaut de croissance (Figure 93A) ni de phénotypes morphologiques n'apparaissent après plusieurs jours d'induction. La RT-PCR semi-quantitative révèle qu'il n'y a pas de diminution du niveau d'ARN après induction (Figure 93B). Ceci est confirmé par la quantification *via* le logiciel ImageJ, qui montre qu'après 3, 5 et 7 jours d'induction le niveau d'ARN correspond respectivement à : 97%, 101% et 100% du niveau d'ARN des cellules non-induites.

Ces résultats suggèrent que soit l'ARNi contre cette protéine n'est pas efficace, soit FPC9 est essentielle au parasite qui trouve alors un moyen de contourner l'ARNi pour survivre (Chen et al., 2003). Cette hypothèse peut être appuyée par le fait que FPC9 est la seule protéine à être annotée comme synaptotagmine putative. Cependant, dans la publication de D. Horn (Alsford et al., 2011), il est mentionné qu'il n'y a pas de défaut de croissance après induction de l'ARNi de FPC9. Afin d'évaluer le caractère essentiel de FPC9 un knock-out devra être réalisé.

Chez les formes sanguines, des données préliminaires montrent qu'aucun défaut de croissance n'est observé, que ce soit après l'induction de l'ARNi *via* le système tige-boucle ou double promoteur (figure 94). Cependant, le niveau d'ARN après induction n'a pas été contrôlé pour vérifier l'efficacité de l'ARNi. Le knock-out de ce gène devra également être envisagé pour cette forme du parasite.

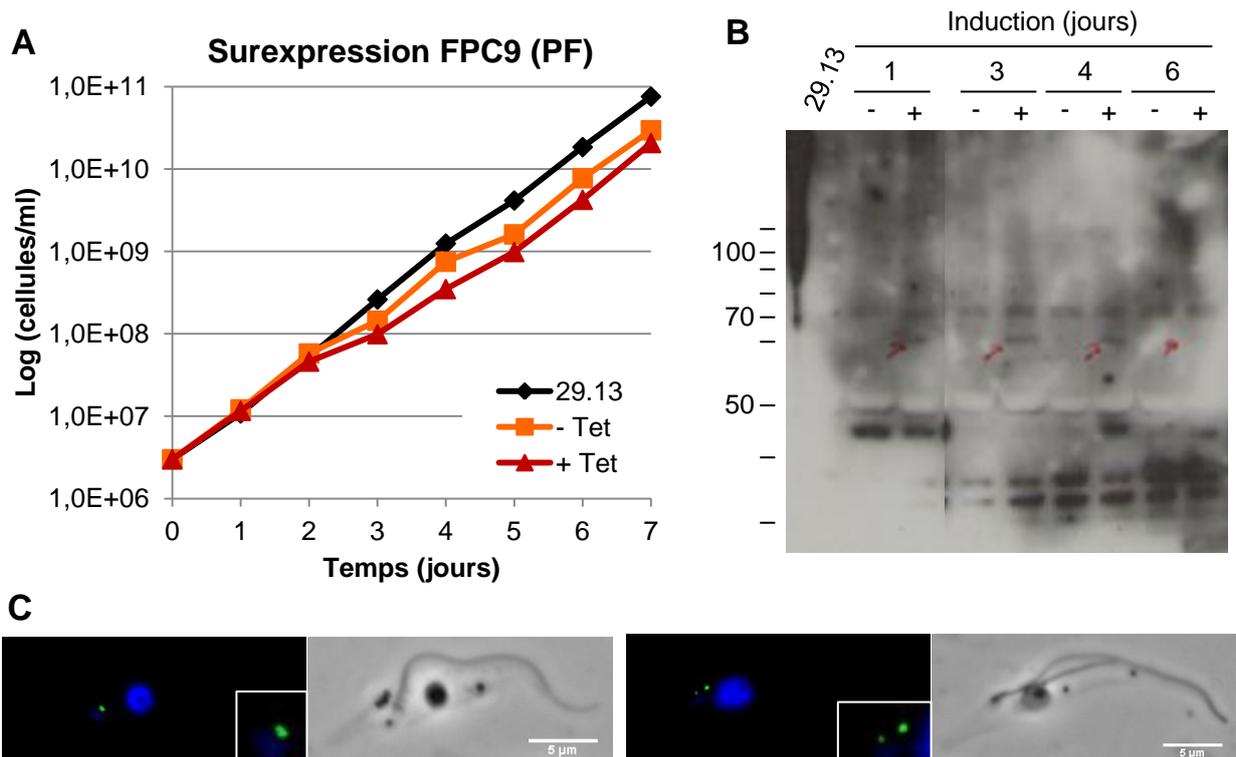


Figure 95 : Surexpression de FPC9 chez la forme procyclique.

A. Courbe de croissance de la souche de référence et des cellules non-induites et induites pour la surexpression de FPC9. Il n'y a pas de défaut de croissance. **B.** Western blot réalisé sur des cytosquelettes issus de 10^8 cellules, avec l'anticorps anti-FPC9. La taille attendue est de 67,3 kDa. On observe une bande plus basse (flèches rouges) mais plus intense dans les cellules induites (+), en comparaison aux non-induites (-). **C.** Cytosquelettes de cellules induites 72h pour la surexpression de FPC9 et marqués avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-FPC9 (vert). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu).

b. Surexpression chez le parasite

i. Sans étiquette

Etant donné que le système d'ARNi ne nous a pas permis, pour le moment, de définir un rôle pour FPC9 chez le parasite, nous avons décidé d'étudier la surexpression de FPC9 afin de voir si des phénotypes y sont associés et pourraient résulter d'un effet dominant négatif. Pour cela, la forme entière de FPC9 a été surexprimée de façon inductible à la tétracycline dans la forme procyclique du parasite.

Dans en premier temps, nous avons suivi la croissance des cellules. Il s'avère qu'un très léger retard de croissance est observé (Figure 95A). Cependant, aucun phénotype morphologique n'y est associé.

Un western blot a été réalisé pour vérifier la surexpression de cette protéine. Il s'avère qu'on observe une bande plus intense dans les cellules induites (Figure 95B), cependant la bande est un peu plus basse que la taille attendue.

De plus, après 72 heures d'induction de la surexpression de FPC9, la localisation est similaire à celle des cellules WT, c'est-à-dire que la protéine est retrouvée au niveau de la zone de transition (Figure 95C). La surexpression ne semble donc pas avoir d'impact sur la localisation de cette protéine.

ii. Avec étiquette GFP

La surexpression de FPC9 seule ne semble pas avoir d'impact sur la survie du parasite bien que l'on observe un léger retard de croissance. Nous avons alors choisi de surexprimer FPC9 étiquetée GFP en C-terminal : FPC9::GFP. En effet, dans le cas de certaines protéines étudiées au laboratoire, nous avons constaté que l'ajout d'une étiquette GFP amplifie les phénotypes associés à la surexpression. La surexpression de la protéine de fusion est inductible et a été réalisée chez la forme procyclique du parasite. La surexpression a été contrôlée au niveau protéique par western blot (Figure 96B).

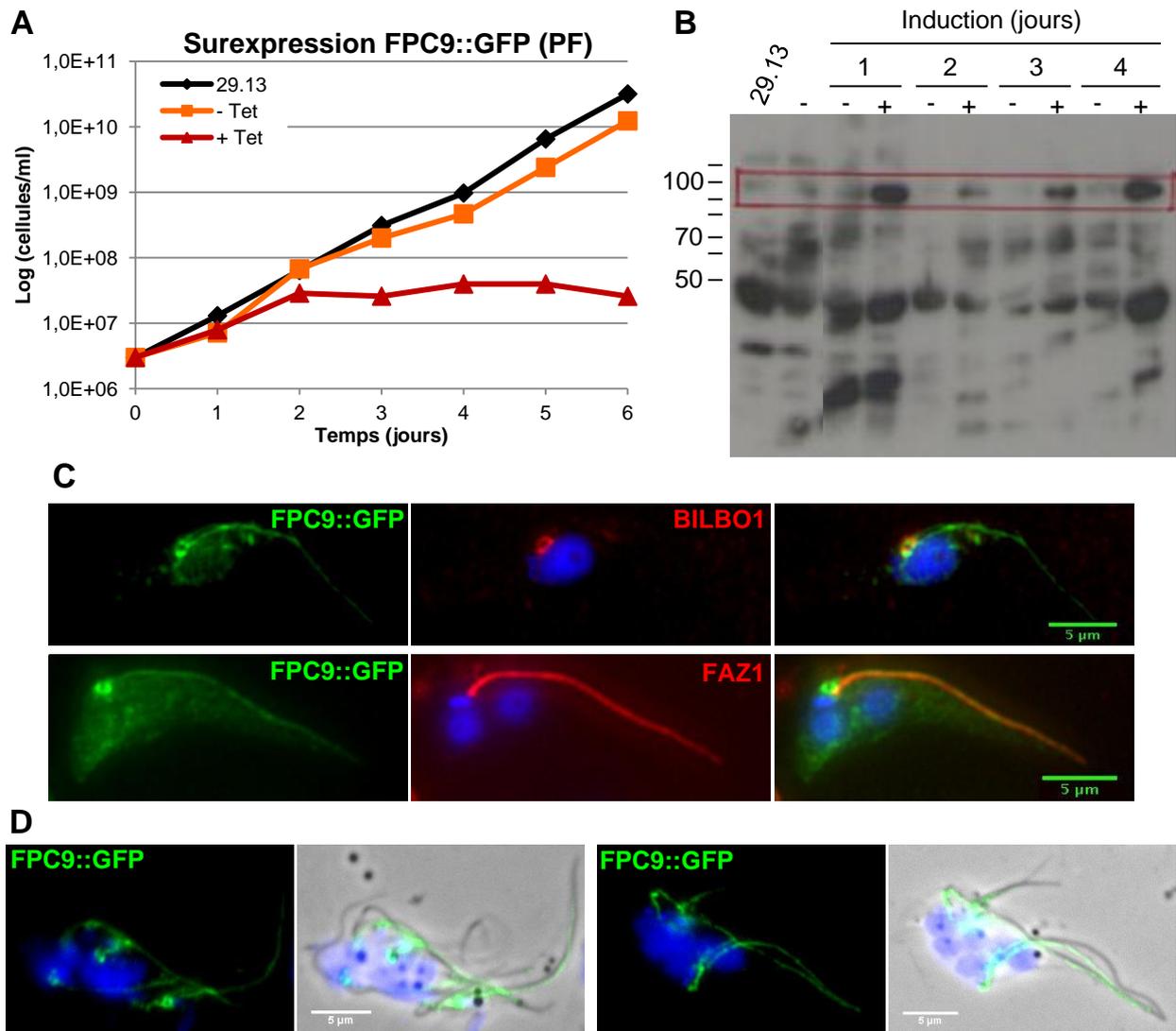


Figure 96 : Surexpression de FPC9::GFP chez la forme procyclique.

A. Courbe de croissance de la souche de référence et des cellules non-induites et induites pour la surexpression de FPC9::GFP. Après 48h d'induction on observe un défaut de croissance. **B.** Western blot réalisé sur des cytosquelettes issus de 10^8 cellules, avec l'anticorps anti-GFP. La taille attendue est de 94,3 kDa pour FPC9::GFP. On observe une bande à la taille attendue dans les cellules induites (+) en comparaison aux non-induites (-). **C.** Immunofluorescence sur des cytosquelettes de cellules induites 24h pour la surexpression de FPC9::GFP. Les cytosquelettes sont marqués avec l'anticorps anti-GFP (vert) et l'anticorps anti-BILBO1 (rouge) ou l'anticorps anti-FAZ1 (L3B2, rouge). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI. FPC9::GFP se colocalise avec BILBO1 et la FAZ. **D.** Cytosquelettes de cellules induites 72h pour la surexpression de FPC9::GFP et marqués avec l'anticorps anti-GFP (vert). Les noyaux et les kinétoplastes sont colorés au DAPI (bleu). On observe une accumulation de cellules multi-flagellées et possédant de nombreux noyaux et kinétoplastes, un phénotype généralement associé à un défaut au niveau de la cytotidiérèse.

Le suivi de la croissance des parasites révèle un effet toxique sur la croissance cellulaire, marqué par une chute importante du nombre de cellules dès 48 heures d'induction (Figure 96A). Ce phénomène est associé à l'apparition de cellules aberrantes, notamment des cellules multi-flagellées, rondes et possédants de nombreux noyaux et kinétoplastes (Figure 96D). L'accumulation de ces cellules reflète probablement un défaut de cytodivision.

Lorsque FPC9::GFP est surexprimée, on observe une localisation au niveau du collier mais aussi du flagelle. Pour confirmer cette localisation, des comarquages ont été réalisés avec l'anticorps anti-BILBO1 et un anticorps anti-FAZ. Dans les deux cas, on observe une colocalisation avec FPC9::GFP, ce qui montre que la protéine de fusion est localisée au niveau du collier de la poche flagellaire mais aussi de la FAZ (Figure 96C). L'étiquette GFP semble donc modifier la localisation de FPC9.

En effet, cette localisation est surprenante, compte tenu de la localisation au niveau de la zone de transition observée *via* l'utilisation de l'anticorps anti-FPC9 sur des cellules WT mais aussi lors de la surexpression de FPC9 sans étiquette. Cependant la présence de FPC9::GFP au niveau du collier peut appuyer l'hypothèse selon laquelle FPC9 est un partenaire potentiel de BILBO1, bien que les résultats de double-hybride ne soient pas concluants.

La présence de la protéine de fusion au collier peut également expliquer les phénotypes observés. En effet, nous pouvons imaginer que cette protéine bloque la duplication ou la formation du collier ce qui entraînerait une inhibition de la cytodivision et résulterait donc en l'accumulation de cellules multi-nucléées.

V. Conclusion

Les analyses préliminaires réalisées sur FPC9 ne nous permettent pas de conclure que cette protéine est un nouveau partenaire de BILBO1 comme semblait l'indiquer le crible en double-hybride. En effet, les tests d'interaction réalisés révèlent une interaction entre FPC9⁴⁵⁵⁻⁵⁸⁰ et BILBO1 uniquement dans un sens, or dans ce sens FPC9⁴⁵⁵⁻⁵⁸⁰ interagit également avec le domaine de liaison à l'ADN (BD) de GAL4. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que l'interaction entre FPC9 et BILBO1

trouvée lors du crible est faussement positive. Cependant, ces résultats devront être confirmés.

De plus, la localisation de FPC9 au niveau de la zone de transition du flagelle n'est pas en adéquation avec la localisation de BILBO1 au collier de la poche flagellaire. Cette localisation est également surprenante pour une synaptotagmine potentielle. Nous nous serions attendus à la retrouver dans une zone proche de la poche flagellaire, de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique (des structures impliquées dans l'exocytose).

La localisation de FPC9::GFP quand elle est surexprimée est différente de la localisation de FPC9 à la zone de transition, détectée avec l'anticorps polyclonal, que ce soit dans les cellules WT ou dans les cellules surexprimant FPC9 sans étiquette. En effet, FPC9::GFP est colocalisée avec BILBO1 au collier de la poche flagellaire et avec FAZ1 au niveau de la FAZ. Cette localisation est en faveur d'une interaction entre FPC9 et BILBO1.

Concernant la fonction de FPC9 *in vivo*, nous ne sommes pas parvenus à obtenir une lignée cellulaire pour laquelle l'induction de l'ARNi entraînait une diminution du niveau de FPC9, que ce soit *via* le système tige-boucle ou *via* le système double-promoteur. Cependant, la surexpression de FPC9::GFP entraîne un défaut de croissance associé à l'apparition de cellules rondes, multi-nucléées et multi-flagellées. Ce phénotype pourrait être associé à un effet dominant négatif.

Discussion générale – perspectives

Trypanosoma brucei est un parasite monoflagellé responsable de la maladie du sommeil chez l'homme et de la maladie appelée Nagana chez les animaux. Ces parasitoses ont un impact sanitaire et économique majeur dans les pays d'Afrique sub-Saharienne dans lesquels est retrouvé ce parasite (Franco et al., 2014; Illemobade, 2009). L'absence de vaccin dû au phénomène de variation antigénique (Horn, 2014; Taylor and Rudenko, 2006; Weirather et al., 2012) ainsi que la toxicité des traitements actuels (Jacobs et al., 2011) rendent nécessaire l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre ce parasite. A l'heure actuelle, et ce grâce au séquençage complet du génome (Berriman et al., 2005a), de nombreuses cibles sont étudiées. Parmi elles, le cytosquelette est une cible prometteuse. En effet, il est nécessaire à la cellule car il intervient dans le maintien de la structure de la cellule, le positionnement des organites, mais aussi dans la construction du flagelle et de la FAZ (Gull, 1999; Kohl and Gull, 1998).

Pour ces raisons l'équipe au sein de laquelle j'ai réalisé ma thèse s'attache à étudier la biogenèse du cytosquelette chez ce parasite, et plus précisément la biogenèse de la poche flagellaire et du collier de cette poche.

I. La poche flagellaire

La poche flagellaire de *T. brucei* est une structure essentielle à la survie du parasite car elle constitue l'unique site d'endo- et d'exocytose (Bonhivers et al., 2008b; Field and Carrington, 2009). Elle représente donc une cible thérapeutique potentielle.

La poche flagellaire a une morphologie similaire à celle de la poche ciliaire située à la base de certains cils, bien qu'elles diffèrent sur certains points. Tout comme la poche flagellaire, la poche ciliaire est une invagination de la membrane plasmique, impliquée dans l'endocytose. Elle prend naissance à la zone de transition de l'axonème du cil, lieu où est également présent un anneau de septines, qui joue le rôle de barrière de diffusion entre les membranes ciliaire et flagellaire. Cependant, il n'est pas retrouvé de structure similaire à celle du collier de la poche flagellaire de *T. brucei*, à l'extrémité distale de la poche ciliaire. De plus, contrairement à la poche

flagellaire, la poche ciliaire est liée au réseau d'actine qui permet de maintenir cette dernière (Benmerah, 2013; Ghossoub et al., 2011).

La présence de trois sous-domaines membranaires de composition différente aux alentours de la poche flagellaire (Bridges et al., 2008; Oberholzer et al., 2011) suggère la présence d'au moins deux barrières de diffusion : l'une entre la membrane plasmique et la membrane de la poche flagellaire et l'autre entre la membrane du flagelle et celle de la poche flagellaire.

Au point d'entrée du flagelle dans la poche, on observe une structure dense aux électrons appelée collerette. Une hypothèse plausible est que cette structure constitue une barrière de diffusion entre la membrane de la poche flagellaire et celle du flagelle (Lacomble et al., 2009a). Des études sur la composition, la formation et le rôle de la collerette devront être menées, car au vu de sa localisation, elle pourrait jouer un rôle important dans la biogenèse de la poche flagellaire ou dans celle du flagelle.

Une autre structure, elle aussi dense aux électrons, pourrait avoir un rôle de barrière de diffusion entre la membrane de la poche flagellaire et la membrane plasmique : le collier de la poche flagellaire, situé au cou de la poche (Bonhivers et al., 2008b).

Ces deux structures représentent donc des cibles thérapeutiques potentielles contre *T. brucei*. Dans l'équipe au sein de laquelle j'ai réalisé ma thèse, nous nous intéressons au collier de la poche flagellaire.

II. Le collier de la poche flagellaire

Le collier de la poche flagellaire possède une structure annulaire qui rappelle d'autres structures : l'anneau de septines, mais aussi celle des desmosomes. Cependant, l'anneau de septines qui a un rôle de barrière de diffusion est retrouvé à la base de la poche ciliaire (Hu and Nelson, 2011; Hu et al., 2010) alors que le collier est placé au cou de la poche. De plus, aucun homologue de septine n'a été identifié

dans le génome de *T. brucei*. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure qu'il existe chez ce parasite un homologue structurel et fonctionnel qui pourrait lui aussi jouer le rôle de barrière de diffusion.

La structure du collier de la poche flagellaire rappelle également celle des desmosomes (Delva et al., 2009). En effet, par microscopie électronique, le collier apparaît comme une zone dense aux électrons qui rapproche les membranes flagellaire et plasmique au site du sortie du flagelle. Quant aux desmosomes, ce sont des structures qui permettent d'établir des zones d'adhésion entre les membranes. Ils font intervenir des filaments tels que les filaments de kératine ou de vimentine, qui sont connectés à des complexes protéiques ancrés aux membranes *via* les desmoplakines (Garrod and Chidgey, 2008; Giepmans and van Ijzendoorn, 2009). Chez *T. brucei*, aucun homologue de kératine n'a été identifié. Cependant on retrouve des homologues de desmoplakines. Ces derniers n'ont pas encore été caractérisés, il serait donc intéressant d'étudier leur localisation.

La façon dont le nouveau collier est formé lors de la division cellulaire n'est pas encore connue. Deux modèles sont possibles : la synthèse *de novo* ou la formation par division du collier existant. Le premier modèle implique la synthèse du nouveau collier de manière totalement indépendante de l'ancien collier. Alors que le second modèle, implique un élargissement du collier déjà existant puis un resserrement de façon à former deux colliers, ceci induisant une structure en « 8 ». La dernière étape serait la séparation des deux colliers.

Le collier est une structure centrale chez le parasite, il est placé au centre de plusieurs composants du cytosquelette, tels que la poche flagellaire, le flagelle ou encore la FAZ. Il pourrait donc avoir un rôle essentiel dans la formation de l'un de ces composants. Une analyse détaillée de ses composants pourrait nous permettre d'en apprendre plus sur sa formation et sa fonction dans la cellule.

a. BILBO1

BILBO1 est la première protéine du collier de la poche flagellaire à avoir été identifiée, par l'équipe au sein de laquelle j'ai réalisé ma thèse. Cette protéine a été décrite comme nécessaire à la formation du collier et de la poche flagellaire et donc à la survie du parasite (Bonhivers et al., 2008b). En effet, l'ARN interférence contre BILBO1 est létale et conduit à la formation de cellules anormales, dont l'extrémité postérieure est allongée et associée à un nouveau flagelle détaché. Ce flagelle n'est associé ni à un collier, ni à une poche flagellaire. Les cellules observées présentent également un défaut de cytodierèse.

Par des expériences d'immunofluorescence, nous avons pu montrer que la localisation de FPC5 ne semble pas affectée dans l'ARNi de BILBO1. En effet, FPC5 est toujours présente à la base du flagelle détaché. Cependant, une étude plus approfondie devra être réalisée, notamment par quantification du taux d'ARN (RT-PCR) et du niveau de protéines (western blot) après induction de l'ARNi de BILBO1. La même étude devra être menée sur FPC9.

Une étude récente menée par Gang Dong et coll. a permis de mettre en évidence les capacités de polymérisation de BILBO1. En effet, il a montré que BILBO1 est capable de former des homodimères *via* son domaine coiled-coil. Une fois formés, les homodimères peuvent s'assembler entre eux *via* le domaine leucine zipper de BILBO1, pour former des oligomères (Vidilaseris et al., 2014b). Ce motif leucine zipper est également nécessaire à l'adressage de BILBO1 au collier de la poche flagellaire. Cet assemblage permet la formation de longs filaments linéaires de BILBO1, capables d'interagir entre eux. Au vu de cette étude, nous pouvons émettre l'hypothèse que le filament de BILBO1 serait capable de se refermer sur lui-même et ainsi former un anneau. Cependant, il est probable que cela fasse intervenir d'autres protéines présentes au collier. Néanmoins, la capacité de polymérisation de BILBO1 pourrait être à l'origine de la structure de base du collier sur lequel viendrait ensuite se greffer d'autres protéines.

Tout comme les septines, le domaine coiled-coil de BILBO1 est impliqué dans le mécanisme d'auto-assemblage de la protéine. En effet, il a été montré que les septines forment des hétéro-oligomères qui s'assemblent en filaments, spirales ou

	FPC5	FPC5 ^{B1BD}	FPC5 ^{MD}	FPC5 ^{517-fin}
Double-hybride	Pas d'interaction avec BILBO1	Interaction avec les motifs EF-hand de BILBO1	X	Interaction avec lui-même et avec FPC5 ^{B1BD}
		Interaction avec lui-même et avec FPC5 ^{517-fin}		
Localisation	Anticorps monoclonal de souris : corps basaux et FPC	Surexpression FPC5 ^{B1BD} ::myc : colocalisation avec BILBO1 au FPC	Surexpression FPC5 ^{MD} ::myc : colocalisation avec les microtubules	X
	Surexpression GFP::FPC5 : corps basaux			
	myc::FPC5 endogène : corps basaux			
	Surexpression FPC5::myc : corps basaux et région proximale du flagelle			

Figure 97 : Tableau récapitulatif des interactions et de la localisation des différents domaines de FPC5.

anneaux *via* leur domaine de liaison au GTP mais aussi *via* leur domaine coiled-coil (Beise and Trimble, 2011; Mostowy and Cossart, 2012). Bien qu'il n'y ait pas d'homologue de septine chez *T. brucei* et que les homologues de BILBO1 soient présents uniquement chez les *Kinetoplastidae*, il est envisageable que BILBO1 possède des fonctions similaires aux septines et le collier pourrait ainsi jouer le rôle de barrière de diffusion. Une façon de tester si BILBO1 possède le même rôle que les septines, serait de réaliser une expérience de complémentation fonctionnelle chez la levure (De Craene et al., 2014; Gaglio et al., 2013). Pour cela il faudrait surexprimer BILBO1 dans un mutant de septines (Barral et al., 2000; Versele and Thorner, 2005) afin de voir si cela permet de restaurer le phénotype WT.

Les données concernant BILBO1 montrent bien que cette protéine est essentielle à la biogénèse du collier et de la poche flagellaire et donc à la survie du parasite. Pour mieux comprendre la structure et la formation de ce collier et ainsi identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, un crible en double-hybride a été réalisé et nous a permis d'identifier des partenaires potentiels de BILBO1. Au cours de ma thèse je me suis attachée à caractériser deux d'entre eux : FPC5 et FPC9.

b. Les nouveaux partenaires de BILBO1

i. FPC5

FPC5 est une nouvelle protéine identifiée dans notre étude comme partenaire de BILBO1. Il semblerait qu'elle interagisse *via* une partie de son domaine coiled-coil central (FPC5^{B1BD}), avec les domaines EF-hand de BILBO1 (Figure 97). Plusieurs techniques nous permettent d'arriver à cette conclusion : le double-hybride, la localisation, la coexpression de FPC5 et BILBO1 en système hétérologue mais aussi la surexpression de FPC5^{B1BD} chez le parasite. De plus, des résultats préliminaires obtenus par la technique de double-hybride montrent que le calcium semble impliqué dans cette interaction.

L'étude de la localisation de FPC5 montre que cette protéine se localise principalement aux corps basaux, mais aussi en moindre partie au collier de la poche flagellaire (Figure 97).

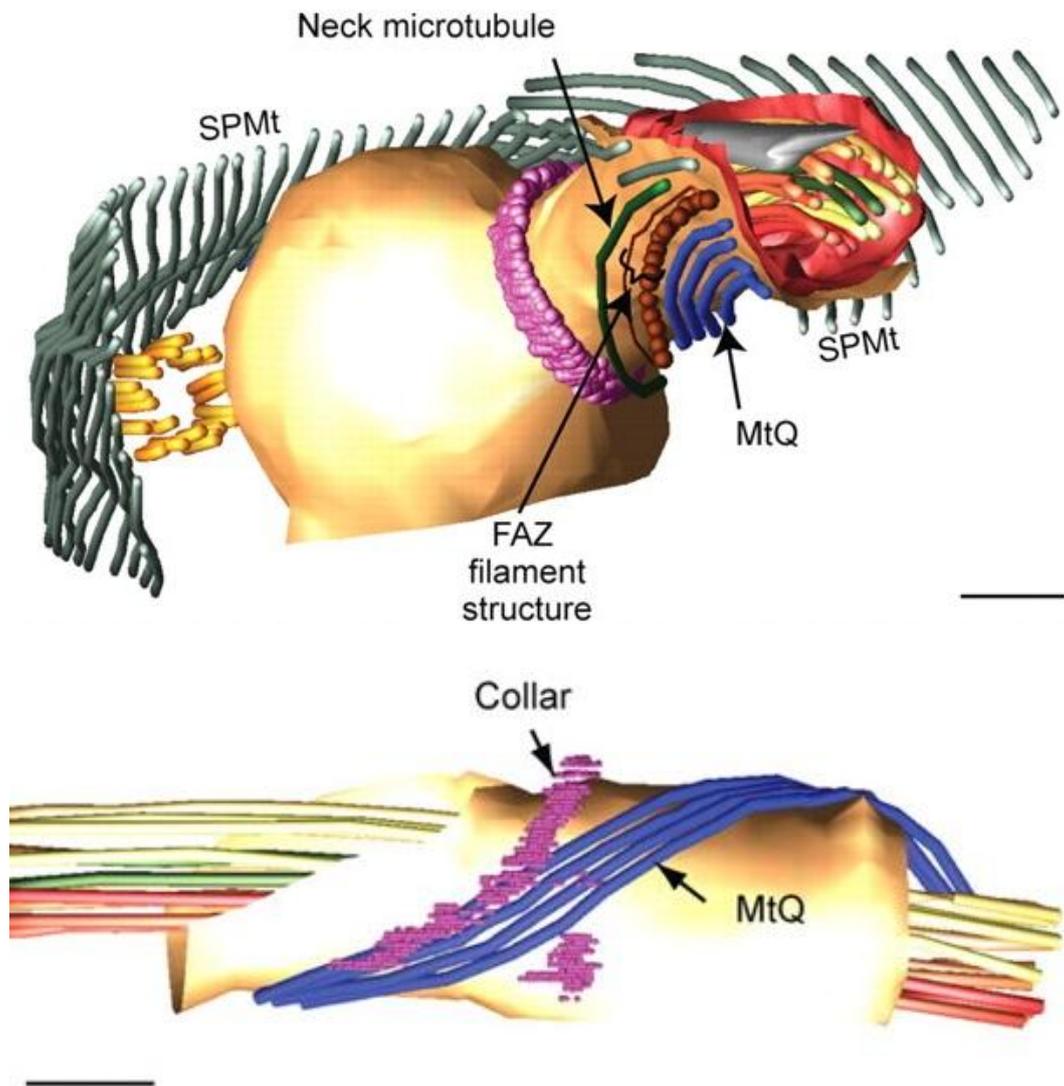


Figure 98 : Tomographie du cytosquelette dans la région de la poche flagellaire.
 SPMt = microtubules sous-pelliculaires (gris), MtQ = quartette de microtubules (bleu) et collier (rose). Issu de : Lacomble et coll., « Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography », 2009.

Bien qu'après induction de l'ARNi, l'extinction de la protéine ne soit pas totale, des phénotypes morphologiques apparaissent. Tout d'abord, le détachement des flagelles dans un peu moins de 10% des cellules. Ce phénotype est associé à un défaut de synthèse du filament de la FAZ au flagelle détaché, comme observé par exemple dans le cas de l'ARNi de CC2D (Zhou et al., 2011), un composant de la FAZ. On observe également un défaut de cytodièrese, se traduisant par l'apparition d'environ 20% de cellules anormales : des zoïdes, des cellules 1K2N ainsi que des cellules multi-nucléées. Ce défaut de cytodièrese pourrait être dû à l'absence de FAZ car il a été montré que la FAZ définit l'emplacement du site de clivage (Kohl et al., 2003; Robinson et al., 1995). Pour finir, le phénotype majeur observé est le mauvais positionnement du kinétoplaste dans 63% des cellules après 72 heures d'induction. Dans les premières heures d'induction, le kinétoplaste est toujours postérieur mais accolé au noyau. Au cours du temps, cette situation évolue vers un kinétoplaste qui passe au dessus du noyau puis vers un kinétoplaste qui passe du côté antérieur au noyau, comme observé chez la forme épimastigote du parasite.

Au vu des résultats obtenus, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses quant au rôle potentiel de FPC5 chez *T. brucei*. La première hypothèse est que FPC5 pourrait assurer le transport de BILBO1 au collier de la poche flagellaire. En effet, FPC5 semble capable d'interagir avec BILBO1 *via* son domaine FPC5^{B1BD}. Mais, il faudrait avant tout montrer que FPC5 est une kinésine active.

Nous pouvons aussi imaginer que cette protéine ait un rôle dans le maintien de la position du collier de la poche flagellaire. En effet, FPC5 pourrait constituer un lien entre BILBO1 d'une part (*via* son domaine FPC5^{B1BD}) et les microtubules présents à proximité de la poche flagellaire (ceux du corset ou ceux du quartette, Figure 98) d'autre part (*via* son domaine moteur, FPC5^{MD}).

Une autre hypothèse est que FPC5 pourrait permettre l'ancrage aux corps basaux, des protéines nécessaires à la biogenèse du flagelle, avant que ces dernières soient prises en charge par le mécanisme d'IFT.

Une quatrième hypothèse est que FPC5 serait impliquée dans la ségrégation des corps basaux et donc jouerait un rôle dans le positionnement des kinétoplastes. En effet, ces deux structures sont physiquement liées par le complexe TAC (Zhao et al., 2008).

Pour finir, il est possible que FPC5 soit impliquée dans la synthèse de la FAZ. Ainsi en son absence, il y aurait inhibition de la formation de la FAZ, ce qui entraînerait un détachement du flagelle, suivi d'un défaut de cytodièrese (Kohl et al., 2003; Robinson et al., 1995). En effet, la FAZ définit le sillon de clivage au cours de la cytodièrese.

De plus, la surexpression du domaine moteur de FPC5 chez la forme procyclique du parasite, nous a permis de montrer la capacité de ce dernier à lier les microtubules (Figure 97). Cependant le domaine moteur seul semble lier tous les microtubules de la cellule (corset sous-pelliculaire, axonème ...). Or, FPC5 est retrouvée uniquement sur les microtubules des corps basaux. Il semble donc y avoir une séquence dans la partie non-motrice qui soit impliquée dans la localisation de FPC5. Dans le cas de la kinésine KIF17 il a été montré qu'elle possède une CLS (Ciliary Localisation Signal) qui permet l'adressage au compartiment ciliaire (Dishinger et al., 2010). Cette CLS est similaire aux NLS (Nuclear Localization Signal), qui sont riches en lysine, arginine et histidine. Chez FPC5, trois régions riches en ces acides aminés ont été identifiées : RKLRRDK (aa.533-539), KRRHH (aa. 626-630) et KRR (aa. 726-728).

Enfin, des résultats préliminaires de double-hybride montrent que FPC5 pourrait être capable de dimériser (Figure 97), condition essentielle pour qu'elle possède une activité processive.

ii. FPC9

Nous ne sommes pas parvenus à mettre en lumière l'interaction entre FPC9 et BILBO1 par la technique du double-hybride. Nous ne pouvons donc pas conclure sur le fait que FPC9 soit potentiellement un nouveau partenaire de BILBO1. Néanmoins, la surexpression de FPC9::GFP chez la forme procyclique, observe une localisation au collier de la poche flagellaire et au niveau de la FAZ. Cette localisation pourrait être en faveur d'une interaction entre FPC9 et BILBO1, bien qu'il ne faille pas exclure le fait que la GFP puisse influencer la localisation de la protéine de fusion. En effet, la surexpression de FPC9 sans étiquette observe une localisation à la zone de

transition, tout comme FPC9 endogène dans les cellules WT (utilisation de l'anticorps polyclonal de lapin).

De plus, la surexpression de la protéine de fusion FPC9::GFP conduit à la formation de cellules rondes, multi-nucléées et multi-flagellées. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce phénomène résulte d'un phénotype dominant-négatif et qu'il y a peut être une inhibition de l'exocytose (si FPC9 est réellement une synaptotagmine), associée à une accumulation de vésicules dans la cellule, ce qui entraîne une inhibition de la cytodivision.

De plus, FPC9 est localisée au niveau de la zone de transition du flagelle, quand elle est détectée avec l'anticorps polyclonal de lapin. Cette localisation est surprenante et ne nous permet pas de conclure quant à la fonction de FPC9 en tant que synaptotagmine. En effet, nous nous serions attendus à retrouver cette protéine dans une région impliquée dans le transport vésiculaire et dans l'exocytose : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, vésicules ou poche flagellaire.

Malgré ces résultats, la caractérisation de FPC9 devra être poursuivie, car cette protéine pourrait s'avérer être essentielle au parasite. En effet, c'est la seule protéine annotée comme synaptotagmine putative chez *T. brucei* alors qu'il y a 16 isoformes chez l'Homme et la souris. Elle pourrait donc avoir un rôle essentiel dans la fusion membranaire chez ce parasite.

De plus, les multiples essais d'ARNi (systèmes tige-boucle et double-promoteur) ne nous ont pas permis d'obtenir une lignée pour laquelle après induction on observe une diminution du niveau d'ARN. Il se pourrait donc que la cellule contourne l'ARNi pour empêcher l'extinction de l'expression de FPC9, qui pourrait s'avérer être essentielle à sa survie.

III. Perspectives

Au vu des résultats obtenus, l'étude approfondie du collier de la poche flagellaire ainsi que des partenaires potentiels de BILBO1, notamment FPC5 et FPC9, doit continuer. En effet, le collier est essentiel à la survie du parasite et c'est une structure spécifique des *Kinetoplastidae*. Il représente donc une cible thérapeutique intéressante.

Pour ce faire, plusieurs expériences devront être menées et sont décrites dans les paragraphes ci-dessous.

a. FPC5

Le knock-out du gène codant pour FPC5 devra être envisagé de façon à déterminer le caractère essentiel de cette protéine pour le parasite. En effet, après une semaine d'induction de l'ARN interférence, il reste environ 10% d'ARN. Il se pourrait que cela soit suffisant pour la survie du parasite.

A l'heure actuelle, nous ne sommes pas parvenus à démontrer que FPC5 est une kinésine active, dû aux problèmes de purification rencontrés. Dans ces conditions, un autre moyen de tester l'activité de cette protéine *in vitro*, serait par des expériences de déplacement sur les microtubules. Il serait aussi envisageable de tester d'autres moyens de purifier le domaine moteur de FPC5, tels que l'utilisation de levures ou de cellules de mammifères.

De plus, la capacité de FPC5 à former des dimères devra être confirmée par des expériences de co-immunoprécipitations, si nous parvenons à produire les différents domaines de cette protéine de manière soluble.

Il serait aussi intéressant d'identifier le domaine de FPC5 permettant l'adressage de cette protéine aux corps basaux. Nous pourrions dans un premier temps commencer par l'étude des trois régions riches en arginine, lysine et histidine, car elles pourraient jouer un rôle de CLS. Pour cela, la localisation de mutants de

délétion de ces régions devra être étudiée. Si cela se révèle infructueux, différentes tronctions de FPC5 devront être surexprimées chez le parasite et leur localisation nous permettra de conclure quel domaine est impliqué dans l'adressage de FPC5 aux corps basaux.

Nous pourrions également envisager d'exprimer FPC5 dans les cellules RPE-1 qui ont la capacité de former des cils primaires. En effet, au vu de la localisation de FPC5 à corps basaux chez les trypanosomes, nous pouvons imaginer la retrouver à la base des cils primaire. L'expression sans étiquette dans les cellules U-2 OS devra aussi être réalisée.

De plus, la recherche de partenaires de FPC5 nous permettra de mieux comprendre le rôle de cette protéine au sein de *T. brucei* et pourra peut être nous apporter des informations sur le collier de la poche flagellaire. Pour cela, nous pourrions réaliser soit un crible en double-hybride (comme celui réalisé pour BILBO1) soit utiliser le système BioID (Morriswood et al., 2013).

b. FPC9

Les résultats de double-hybride concernant l'étude de l'interaction entre FPC9 et BILBO1 n'étant pas concluants, ils devront être confirmés par une méthode de double-hybride spécifique des protéines transmembranaires ou par des expériences de co-immunoprécipitation. De plus, si l'interaction entre FPC9 et BILBO1 est réellement établie, il faudra identifier quel domaine de BILBO1 est impliqué et tester l'implication du calcium. En effet, les domaines EF-hand de BILBO1 et les domaines C2 de FPC9 sont connus pour lier le calcium.

Au vu des localisations différentes obtenues soit avec l'anticorps polyclonal de lapin soit par la surexpression de FPC9::GFP, il faudra envisager l'utilisation d'une autre étiquette. La localisation devra également être étudiée en fonction de la position de l'étiquette par rapport à la protéine d'intérêt : en N-terminal ou en C-terminal. Ces différentes expériences pourraient nous permettre de conclure quant à la localisation exacte de FPC9 chez le parasite.

Aussi, les essais d'ARNi étant infructueux, le knock-out du gène codant pour FPC9 devra être envisagé pour vérifier le caractère essentiel de cette protéine. Si cela est vérifié, FPC9 pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique.

De plus, FPC9 est prédite comme une synaptotagmine et elle en possède les caractéristiques structurelles : c'est-à-dire, un court domaine N-terminal, trois régions transmembranaires et deux domaines C2. Cependant, les synaptotagmines possèdent un seul domaine transmembranaire. Cette différence pourrait être à l'origine d'une fonction autre que celle de synaptotagmine pour FPC9. Pour confirmer ou non que FPC9 est une synaptotagmine, sa fonction devra être testée *in vitro*. Cela pourra être réalisé par des expériences de fusion membranaire en présence de FPC9 (Martens et al., 2007).

Pour compléter l'étude de la fonction de FPC9, la recherche de partenaires de cette protéine chez *T. brucei* pourra être réalisée soit par un crible en double-hybride (comme celui réalisé pour BILBO1), soit par l'utilisation du système BioID (Morriswood et al., 2013), déjà décrit pour la protéine *TbMORN1*. De plus, dans la littérature les synaptotagmines sont décrites comme interagissant avec les protéines SNARE. Il serait donc judicieux de tester l'interaction entre FPC9 et les protéines annotées comme SNARE putatives chez *Trypanosoma brucei*, par double-hybride par exemple. Dans la base de données TriTryp, une dizaine de protéines sont annotées comme SNARE potentielle chez ce parasite.

Enfin, l'expression en système hétérologue dans les cellules de mammifères U-2 OS et RPE-1 (capables de former des cils primaires), pourrait également être envisagée. En effet, cela pourrait nous permettre de comparer la localisation de FPC9 à celle des autres synptotagmines. Mais aussi, de voir si dans les cellules RPE-1, FPC9 est adressée à la zone de transition des cils primaires.

Bibliographie

- Absalon, S., Blisnick, T., Kohl, L., Toutirais, G., Dore, G., Julkowska, D., Tavenet, A. and Bastin, P.** (2007). Intraflagellar Transport and Functional Analysis of Genes Required for Flagellum Formation in Trypanosomes. *Mol. Biol. Cell* **19**, 929–944.
- Affolter, M., Hemphill, A., Roditi, I., Müller, N. and Seebeck, T.** (1994). The repetitive microtubule-associated proteins MARP-1 and MARP-2 of *Trypanosoma brucei*. *J. Struct. Biol.* **112**, 241–251.
- Agabian, N.** (1990). Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* **61**, 1157–1160.
- Alcantara, C. L., Vidal, J. C., Souza, W. de and Cunha-e-Silva, N. L.** (2014). The three-dimensional structure of the cytostome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J. Cell Sci.* **127**, 2227–2237.
- Alibu, V. P., Storm, L., Haile, S., Clayton, C. and Horn, D.** (2005). A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **139**, 75–82.
- Allen, C. L.** (2003). Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **22**, 4991–5002.
- Alsford, S., Kawahara, T., Glover, L. and Horn, D.** (2005). Tagging a *T. brucei* RRNA locus improves stable transfection efficiency and circumvents inducible expression position effects. *Mol. Biochem. Parasitol.* **144**,.
- Alsford, S., Turner, D. J., Obado, S. O., Sanchez-Flores, A., Glover, L., Berriman, M., Hertz-Fowler, C. and Horn, D.** (2011). High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res.* **21**, 915–924.
- Amar, M. F. B., Pays, A., Tebabi, P., Dero, B., Seebeck, T., Steinert, M. and Pays, E.** (1988). Structure and transcription of the actin gene of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2166.
- Andersen, C. R., Nielsen, L. S., Baer, A., Tolstrup, A. B. and Weilguny, D.** (2011). Efficient expression from one CMV enhancer controlling two core promoters. *Mol. Biotechnol.* **48**, 128–137.
- Antinori, S., Schifanella, L. and Corbellino, M.** (2012). Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **31**, 109–118.
- Archer, S. K., Inchaustegui, D., Queiroz, R. and Clayton, C.** (2011). The Cell Cycle Regulated Transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* **6**, e18425.
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., Depledge, D. P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., et al.** (2010). TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* **38**, D457–D462.

- Babokhov, P., Sanyaolu, A. O., Oyibo, W. A., Fagbenro-Beyioku, A. F. and Iriemenam, N. C.** (2013). A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathog. Glob. Health* **107**, 242–252.
- Baines, A. and Gull, K.** (2008). WCB is a C2 domain protein defining the plasma membrane - sub-pellicular microtubule corset of kinetoplastid parasites. *Protist* **159**, 115–125.
- Barral, Y.** (2010). Septins at the Nexus. *Science* **329**, 1289–1290.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M. S. and Snyder, M.** (2000). Compartmentalization of the Cell Cortex by Septins Is Required for Maintenance of Cell Polarity in Yeast. *Mol. Cell* **5**, 841–851.
- Beise, N. and Trimble, W.** (2011). Septins at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 4141–4146.
- Benmerah, A.** (2013). The ciliary pocket. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 78–84.
- Berepiki, A., Lichius, A. and Read, N. D.** (2011). Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 876–887.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., et al.** (2005a). The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**, 416–422.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., et al.** (2005b). The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**, 416–422.
- Besteiro, S., Coombs, G. H. and Mottram, J. C.** (2006). The SNARE protein family of *Leishmania major*. *BMC Genomics* **7**, 250.
- Biebinger, S., Elizabeth Wirtz, L., Lorenz, P. and Christine Clayton** (1997). Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **85**, 99–112.
- Bonhivers, M., Landrein, N., Decossas, M. and Robinson, D. R.** (2008a). A monoclonal antibody marker for the exclusion-zone filaments of *Trypanosoma brucei*. *Parasit. Vectors* **1**, 21.
- Bonhivers, M., Nowacki, S., Landrein, N. and Robinson, D. R.** (2008b). Biogenesis of the Trypanosome Endo-Exocytotic Organelle Is Cytoskeleton Mediated. *PLoS Biol* **6**, e105.
- Bonhivers, M., Landrein, N., Decossas, M. and Robinson, D. R.** (2008c). A monoclonal antibody marker for the exclusion-zone filaments of *Trypanosoma brucei*. *Parasit. Vectors* **1**, 21.
- Borst, P. and Fairlamb, A. H.** (1998). Surface Receptors and Transporters of *Trypanosoma Brucei*. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 745–778.

- Brenndörfer, M. and Boshart, M.** (2010). Selection of reference genes for mRNA quantification in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **172**, 52–55.
- Bridges, D. J., Pitt, A. R., Hanrahan, O., Brennan, K., Voorheis, H. P., Herzyk, P., de Koning, H. P. and Burchmore, R. J. S.** (2008). Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* **8**, 83–99.
- Briggs, L. J., McKean, P. G., Baines, A., Moreira-Leite, F., Davidge, J., Vaughan, S. and Gull, K.** (2004a). The flagella connector of *Trypanosoma brucei*: an unusual mobile transmembrane junction. *J. Cell Sci.* **117**, 1641–1651.
- Briggs, L. J., Davidge, J. A., Wickstead, B., Ginger, M. L. and Gull, K.** (2004b). More than one way to build a flagellum: comparative genomics of parasitic protozoa. *Curr. Biol. CB* **14**, R611–612.
- Bringaud, F., Baltz, D. and Baltz, T.** (1998). Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7963–7968.
- Bringaud, F., Robinson, D. R., Barradeau, S., Biteau, N., Baltz, D. and Baltz, T.** (2000). Characterization and disruption of a new *Trypanosoma brucei* repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**, 283–297.
- Broadhead, R., Dawe, H. R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S. R., Portman, N., Shaw, M. K., Ginger, M. L., Gaskell, S. J., McKean, P. G., et al.** (2006). Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* **440**, 224–227.
- 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., 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.
- Cahu, J., Olichon, A., Hentrich, C., Schek, H., Drinjakovic, J., Zhang, C., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G. and Surrey, T.** (2008). Phosphorylation by Cdk1 Increases the Binding of Eg5 to Microtubules In Vitro and in *Xenopus* Egg Extract Spindles. *PLoS ONE* **3**, e3936.
- Capewell, P., Clucas, C., DeJesus, E., Kieft, R., Hajduk, S., Veitch, N., Steketee, P. C., Cooper, A., Weir, W. and MacLeod, A.** (2013). The TgsGP Gene Is Essential for Resistance to Human Serum in *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Pathog* **9**, e1003686.
- 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.

- Chen, Y., Hung, C.-H., Burderer, T. and Lee, G.-S. M.** (2003). Development of RNA interference revertants in *Trypanosoma brucei* cell lines generated with a double stranded RNA expression construct driven by two opposing promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* **126**, 275–279.
- Coy, D. L., Hancock, W. O., Wagenbach, M. and Howard, J.** (1999). Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat. Cell Biol.* **1**, 288–292.
- Craxton, M.** (2004). Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC Genomics* **5**, 43.
- Cross, G. A. M.** (1990). Cellular and Genetic Aspects of Antigenic Variation in Trypanosomes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 83–110.
- 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.
- Davletov, B., Sontag, J. M., Hata, Y., Petrenko, A. G., Fykse, E. M., Jahn, R. and Südhof, T. C.** (1993). Phosphorylation of synaptotagmin I by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **268**, 6816–6822.
- De Craene, J.-O., Courte, F., Rinaldi, B., Fitterer, C., Herranz, M. C., Schmitt-Keichinger, C., Ritzenthaler, C. and Friant, S.** (2014). Study of the Plant COPII Vesicle Coat Subunits by Functional Complementation of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Mutants. *PLoS ONE* **9**, e90072.
- De Gaudenzi, J. G., Noé, G., Campo, V. A., Frasc, A. C. and Cassola, A.** (2011). Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem.* **51**, 31–46.
- De Greef, C. and Hamers, R.** (1994). The serum resistance-associated (SRA) gene of *Trypanosoma brucei rhodesiense* encodes a variant surface glycoprotein-like protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**, 277–284.
- Delva, E., Tucker, D. K. and Kowalczyk, A. P.** (2009). The Desmosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a002543.
- DeMarini, D. J., Carlin, E. M. and Livi, G. P.** (2001). Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* **18**, 723–728.
- Demonchy, R., Blisnick, T., Deprez, C., Toutirais, G., Loussert, C., Marande, W., Grellier, P., Bastin, P. and Kohl, L.** (2009a). Kinesin 9 family members perform separate functions in the trypanosome flagellum. *J. Cell Biol.* **187**, 615–622.
- Demonchy, R., Blisnick, T., Deprez, C., Toutirais, G., Loussert, C., Marande, W., Grellier, P., Bastin, P. and Kohl, L.** (2009b). Kinesin 9 family members perform separate functions in the trypanosome flagellum. *J. Cell Biol.* **187**, 615–622.
- De Muylder, G., Daulouède, S., Lecordier, L., Uzureau, P., Morias, Y., Van Den Abbeele, J., Caljon, G., Hérin, M., Holzmüller, P., Semballa, S., et al.** (2013). A

- Trypanosoma brucei kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity. *PLoS Pathog.* **9**, e1003731.
- Detmer, E., Hemphill, A., Müller, N. and Seebeck, T.** (1997). The Trypanosoma brucei autoantigen I/6 is an internally repetitive cytoskeletal protein. *Eur. J. Cell Biol.* **72**, 378–384.
- Dhir, V., Goulding, D. and Field, M. C.** (2004). TbRAB1 and TbRAB2 mediate trafficking through the early secretory pathway of Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* **137**, 253–265.
- Dietrich, K. A., Sindelar, C. V., Brewer, P. D., Downing, K. H., Cremo, C. R. and Rice, S. E.** (2008). The kinesin-1 motor protein is regulated by a direct interaction of its head and tail. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 8938–8943.
- Dishinger, J. F., Kee, H. L., Jenkins, P. M., Fan, S., Hurd, T. W., Hammond, J. W., Truong, Y. N.-T., Margolis, B., Martens, J. R. and Verhey, K. J.** (2010). Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin- β 2 and RanGTP. *Nat. Cell Biol.* **12**, 703–710.
- Downing, K. H. and Sui, H.** (2007). Structural insights into microtubule doublet interactions in axonemes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 253–259.
- Dubessay, P., Blaineau, C., Bastien, P., Tasse, L., Van Dijk, J., Crobu, L. and Pagès, M.** (2006). Cell cycle-dependent expression regulation by the proteasome pathway and characterization of the nuclear targeting signal of a Leishmania major Kin-13 kinesin. *Mol. Microbiol.* **59**, 1162–1174.
- Duncan, J. E. and Goldstein, L. S. B.** (2006). The Genetics of Axonal Transport and Axonal Transport Disorders. *PLoS Genet.* **2**, e124.
- Endow, S. A. and Waligora, K. W.** (1998). Determinants of Kinesin Motor Polarity. *Science* **281**, 1200–1202.
- Engelson, E. J., Buckner, F. S. and Van Voorhis, W. C.** (2011). An essential farnesylated kinesin in Trypanosoma brucei. *PLoS One* **6**, e26508.
- Engstler, M., Thilo, L., Weise, F., Grünfelder, C. G., Schwarz, H., Boshart, M. and Overath, P.** (2004). Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in Trypanosoma brucei. *J. Cell Sci.* **117**, 1105–1115.
- Ersfeld, K.** (2011). Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in Trypanosoma brucei. *Res. Microbiol.* **162**, 626–636.
- Ersfeld, K., Asbeck, K. and Gull, K.** (1998). Direct visualisation of individual gene organisation in Trypanosoma brucei by high-resolution in situ hybridisation. *Chromosoma* **107**, 237–240.
- Ersfeld, K., Melville, S. E. and Gull, K.** (1999). Nuclear and Genome Organization of Trypanosoma brucei. *Parasitol. Today* **15**, 58–63.

- Espeut, J., Gaussen, A., Bieling, P., Morin, V., Prieto, S., Fesquet, D., Surrey, T. and Abrieu, A.** (2008). Phosphorylation Relieves Autoinhibition of the Kinetochore Motor Cenp-E. *Mol. Cell* **29**, 637–643.
- Esson, H. J., Morriswood, B., Yavuz, S., Vidilaseris, K., Dong, G. and Warren, G.** (2012). Morphology of the Trypanosome Bilobe, a Novel Cytoskeletal Structure. *Eukaryot. Cell* **11**, 761–772.
- Fantoni, A., Dare, A. O. and Tschudi, C.** (1994). RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2021.
- Ferguson, M. A.** (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* **112**, 2799–2809.
- Fernandez, I., Araç, D., Ubach, J., Gerber, S. H., Shin, O., Gao, Y., Anderson, R. G., Südhof, T. C. and Rizo, J.** (2001). Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* **32**, 1057–1069.
- Field, M. C. and Carrington, M.** (2009). The trypanosome flagellar pocket. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 775–786.
- Field, M. C., Gabernet-Castello, C. and Dacks, J. B.** (2007). Reconstructing the Evolution of the Endocytic System: Insights from Genomics and Molecular Cell Biology. In *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton*, pp. 84–96. Springer New York.
- Folter, S. de and Immink, R. G. H.** (2011). Yeast Protein–Protein Interaction Assays and Screens. In *Plant Transcription Factors* (ed. Yuan, L. and Perry, S. E.), pp. 145–165. Humana Press.
- Franco, J. R., Simarro, P. P., Diarra, A. and Jannin, J. G.** (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin. Epidemiol.* **6**, 257–275.
- Fukuda, M.** (2002). Vesicle-associated Membrane Protein-2/Synaptobrevin Binding to Synaptotagmin I Promotes O-Glycosylation of Synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* **277**, 30351–30358.
- Fukuda, M.** (2003). Molecular cloning and characterization of human, rat, and mouse synaptotagmin XV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 64–71.
- Gabernet-Castello, C., Dacks, J. B. and Field, M. C.** (2009). The Single ENTH-Domain Protein of Trypanosomes; Endocytic Functions and Evolutionary Relationship with Epsin. *Traffic* **10**, 894–911.
- Gaglio, D., D’Alfonso, A. and Camilloni, G.** (2013). Functional Complementation of sir2 Δ Yeast Mutation by the Human Orthologous Gene SIRT1. *PLoS ONE* **8**, e83114.

- García-Salcedo, J. A., Pérez-Morga, D., Gijón, P., Dilbeck, V., Pays, E. and Nolan, D. P.** (2004). A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **23**, 780–789.
- Garrod, D. and Chidgey, M.** (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 572–587.
- Geiger, A., Hirtz, C., Bécue, T., Bellard, E., Centeno, D., Gargani, D., Rossignol, M., Cuny, G. and Peltier, J.-B.** (2010). Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiol.* **10**, 20.
- Gheiratmand, L., Brasseur, A., Zhou, Q. and He, C. Y.** (2013). Biochemical Characterization of the Bi-lobe Reveals a Continuous Structural Network Linking the Bi-lobe to Other Single-copied Organelles in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **288**, 3489–3499.
- Ghossoub, R., Molla-Herman, A., Bastin, P. and Benmerah, A.** (2011). The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biol. Cell* **103**, 131–144.
- Ghossoub, R., Hu, Q., Failler, M., Rouyez, M.-C., Spitzbarth, B., Mostowy, S., Wolfrum, U., Saunier, S., Cossart, P., Jamesnelson, W., et al.** (2013). Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. *J. Cell Sci.* **126**, 2583–2594.
- Giepmans, B. N. G. and van Ijzendoorn, S. C. D.** (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 820–831.
- Gilbert, S. P., Webb, M. R., Brune, M. and Johnson, K. A.** (1995). Pathway of processive ATP hydrolysis by kinesin. *Nature* **373**, 671–676.
- Goldman, R. D., Cleland, M. M., Murthy, S. N. P., Mahammad, S. and Kuczmarski, E. R.** (2012). Inroads into the structure and function of intermediate filament networks. *J. Struct. Biol.* **177**, 14–23.
- Graffenried, C. L. de, Ho, H. H. and Warren, G.** (2008). Polo-like kinase is required for Golgi and bilobe biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* **181**, 431–438.
- Gubbels, M.-J., Vaishnav, S., Boot, N., Dubremetz, J.-F. and Striepen, B.** (2006). A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J. Cell Sci.* **119**, 2236–2245.
- Gull, K.** (1999). The Cytoskeleton of Trypanosomatid Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 629–655.
- Guo, F. and Zhu, G.** (2012). Presence and removal of a contaminating NADH oxidation activity in recombinant maltose-binding protein fusion proteins expressed in *Escherichia coli*. *BioTechniques* **52**, 247–253.
- Guo, L., Liu, T. and Yang, J.** (2000). [Expression of eukaryotic expression plasmid pcDNA3/pacA and pcDNA3/pacP in mammalian cells]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi West China J. Stomatol.* **18**, 412–415.

- Hackney, D. D., Levitt, J. D. and Suhan, J.** (1992). Kinesin undergoes a 9 S to 6 S conformational transition. *J. Biol. Chem.* **267**, 8696–8701.
- Hammarton, T. C.** (2007). Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **153**, 1–8.
- Hammarton, T. C., Clark, J., Douglas, F., Boshart, M. and Mottram, J. C.** (2003). Stage-specific Differences in Cell Cycle Control in *Trypanosoma brucei* Revealed by RNA Interference of a Mitotic Cyclin. *J. Biol. Chem.* **278**, 22877–22886.
- Hammarton, T. C., Kramer, S., Tetley, L., Boshart, M. and Mottram, J. C.** (2007a). *Trypanosoma brucei* Polo-like kinase is essential for basal body duplication, kDNA segregation and cytokinesis. *Mol. Microbiol.* **65**, 1229–1248.
- Hammarton, T. C., Monnerat, S. and Mottram, J. C.** (2007b). Cytokinesis in trypanosomatids. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 520–527.
- Hammond, J. W., Cai, D. and Verhey, K. J.** (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 71–76.
- Hammond, J. W., Cai, D., Blasius, T. L., Li, Z., Jiang, Y., Jih, G. T., Meyhofer, E. and Verhey, K. J.** (2009). Mammalian Kinesin-3 Motors Are Dimeric In Vivo and Move by Processive Motility upon Release of Autoinhibition. *PLoS Biol* **7**, e1000072.
- Han, Y.-G., Kwok, B. H. and Kernan, M. J.** (2003). Intraflagellar Transport Is Required in *Drosophila* to Differentiate Sensory Cilia but Not Sperm. *Curr. Biol.* **13**, 1679–1686.
- Han, W., Rhee, J.-S., Maximov, A., Lao, Y., Mashimo, T., Rosenmund, C. and Südhof, T. C.** (2004). N-Glycosylation Is Essential for Vesicular Targeting of Synaptotagmin 1. *Neuron* **41**, 85–99.
- Harper, S. and Speicher, D. W.** (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **681**, 259–280.
- He, C. Y., Pypaert, M. and Warren, G.** (2005). Golgi Duplication in *Trypanosoma brucei* Requires Centrin2. *Science* **310**, 1196–1198.
- Heindel, U., Schmidt, M. F. G. and Veit, M.** (2003). Palmitoylation sites and processing of synaptotagmin I, the putative calcium sensor for neurosecretion. *FEBS Lett.* **544**, 57–62.
- Hill, K. L.** (2010). Parasites in motion: flagellum-driven cell motility in African trypanosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 459–465.
- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Takeya, R., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Kohjima, M., Sumimoto, H. and Inagaki, F.** (2005). Structure of a Cell Polarity Regulator, a Complex between Atypical PKC and Par6 PB1 Domains. *J. Biol. Chem.* **280**, 9653–9661.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. and Niwa, S.** (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 682–696.

- Hirumi, H., Hirumi, K., Doyle, J. J. and Cross, G. A.** (1980). In vitro cloning of animal-infective bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **80**, 371–382.
- Horn, D.** (2014). Antigenic variation in African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **195**, 123–129.
- Howard, J. and Hyman, A. A.** (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422**, 753–758.
- Hu, Q. and Nelson, W. J.** (2011). Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskelet. Hoboken NJ* **68**, 313–324.
- Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M. P., Nachury, M. V., Spiliotis, E. T. and Nelson, W. J.** (2010). A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium Maintains Ciliary Membrane Protein Distribution. *Science* **329**, 436–439.
- Hu, H., Hu, L., Yu, Z., Chasse, A. E., Chu, F. and Li, Z.** (2012a). An orphan kinesin in trypanosomes cooperates with a kinetoplastid-specific kinesin to maintain cell morphology by regulating subpellicular microtubules. *J. Cell Sci.* **125**, 4126–4136.
- Hu, L., Hu, H. and Li, Z.** (2012b). A kinetoplastid-specific kinesin is required for cytokinesis and for maintenance of cell morphology in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* **83**, 565–578.
- 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.
- Hughes, L. C., Ralston, K. S., Hill, K. L. and Zhou, Z. H.** (2012). Three-Dimensional Structure of the Trypanosome Flagellum Suggests that the Paraflagellar Rod Functions as a Biomechanical Spring. *PLoS ONE* **7**, e25700.
- Hung, C.-H., Qiao, X., Lee, P.-T. and Lee, M. G.-S.** (2004). Clathrin-Dependent Targeting of Receptors to the Flagellar Pocket of Procyclic-Form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* **3**, 1004–1014.
- Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bateman, A., Bernard, T., Binns, D., Bork, P., Burge, S., et al.** (2012). InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res.* **40**, D306–D312.
- Ikeda, K. N. and Graffenried, C. L. de** (2012). Polo-like kinase is necessary for flagellum inheritance in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **125**, 3173–3184.
- Ilemobade, A. A.** (2009). Tsetse and trypanosomosis in Africa: the challenges, the opportunities. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **76**, 35–40.
- Jacobs, R. T., Nare, B. and Phillips, M. A.** (2011). State of the Art in African Trypanosome Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 1255.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E. A.** (1996). Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* **144**, 1425–1436.

- Janke, C. and Chloë Bulinski, J.** (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 773–786.
- Jensen, B. C., Sivam, D., Kifer, C. T., Myler, P. J. and Parsons, M.** (2009). Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* **10**, 482.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C. H., Vallenet, D., Yu, D. S., Choi, S.-H., Couloux, A., Lee, S.-W., Yoon, S. H., Cattolico, L., et al.** (2009). Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* **394**, 644–652.
- Joel Funk, C., Davis, A. S., Hopkins, J. A. and Middleton, K. M.** (2004). Development of high-throughput screens for discovery of kinesin adenosine triphosphatase modulators. *Anal. Biochem.* **329**, 68–76.
- Kaelin Jr., W. G., Krek, W., Sellers, W. R., DeCaprio, J. A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C. S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. J., Blunar, M. A., et al.** (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* **70**, 351–364.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E.** (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499–509.
- Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. E.** (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363–371.
- Kilmartin, J. V., Wright, B. and Milstein, C.** (1982). Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line. *J. Cell Biol.* **93**, 576–582.
- Kohl, L. and Bastin, P.** (2005). The Flagellum of Trypanosomes. In *International Review of Cytology* (ed. Kwang W. Jeon), pp. 227–285. Academic Press.
- Kohl, L. and Gull, K.** (1998). Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93**, 1–9.
- Kohl, L., Sherwin, T. and Gull, K.** (1999). Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**, 105–109.
- Kohl, L., Robinson, D. and Bastin, P.** (2003). Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J.* **22**, 5336–5346.
- Koyfman, A. Y., Schmid, M. F., Gheiratmand, L., Fu, C. J., Khant, H. A., Huang, D., He, C. Y. and Chiu, W.** (2011). Structure of *Trypanosoma brucei* flagellum accounts for its bihelical motion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 11105–11108.
- 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. U. S. A.* **90**, 5519.

- Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morphey, M. K., Shaw, M. K., McIntosh, J. R. and Gull, K.** (2009a). Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. *J. Cell Sci.* **122**, 1081–1090.
- Lacomble, S., Portman, N. and Gull, K.** (2009b). A Protein-Protein Interaction Map of the *Trypanosoma brucei* Paraflagellar Rod. *PLoS ONE* **4**, e7685.
- Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morphey, M. K., Shaw, M. K., McIntosh, J. R. and Gull, K.** (2010). Basal body movements orchestrate membrane organelle division and cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **123**, 2884–2891.
- Lacomble, S., Vaughan, S., Deghelt, M., Moreira-Leite, F. F. and Gull, K.** (2012). A *Trypanosoma brucei* Protein Required for Maintenance of the Flagellum Attachment Zone and Flagellar Pocket ER Domains. *Protist* **163**, 602–615.
- LaCount, D. J., Barrett, B. and Donelson, J. E.** (2002). *Trypanosoma brucei* FLA1 Is Required for Flagellum Attachment and Cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 17580–17588.
- Langousis, G. and Hill, K. L.** (2014). Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 505–518.
- Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S. B., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., et al.** (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol.* **167**, 19–22.
- Lentze, N. and Auerbach, D.** (2001). Membrane-Based Yeast Two-Hybrid System to Detect Protein Interactions. In *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc.
- Lindemann, C. B. and Lesich, K. A.** (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J. Cell Sci.* **123**, 519–528.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E. C. and Englund, P. T.** (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol.* **21**, 363–369.
- Lukes, J., Lys Guilbride, D., Votypka, J., Zikova, A., Benne, R. and Englund, P. T.** (2002). Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryot. Cell* **1**, 495–502.
- Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J.** (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162–1164.
- Magona, J. W., Mayende, J. S. P., Okiria, R. and Okuna, N. M.** (2004). Protective efficacy of isometamidium chloride and diminazene aceturate against natural *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle under a suppressed tsetse population in Uganda. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **71**, 231–237.

- Maina, C. V., Riggs, P. D., Granda, A. G., Slatko, B. E., Moran, L. S., Tagliamonte, J. A., McReynolds, L. A. and Guan, C. D.** (1988). An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**, 365–373.
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilescu, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I., et al.** (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* **6**, 163–169.
- Malvy, D. and Chappuis, F.** (2011). Sleeping sickness. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 986–995.
- Manna, P. T., Boehm, C., Leung, K. F., Natesan, S. K. and Field, M. C.** (2014). Life and times: synthesis, trafficking, and evolution of VSG. *Trends Parasitol.* **30**, 251–258.
- Maric, D., Epting, C. L. and Engman, D. M.** (2010). Composition and sensory function of the trypanosome flagellar membrane. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 466–472.
- Martens, S., Kozlov, M. M. and McMahon, H. T.** (2007). How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science* **316**, 1205–1208.
- Marx, A., Müller, J. and Mandelkow, E.** (2005). The structure of microtubule motor proteins. *Adv. Protein Chem.* **71**, 299–344.
- Mayer, U. and Jürgens, G.** (2002). Microtubule cytoskeleton: a track record. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 494–501.
- Miki, H., Okada, Y. and Hirokawa, N.** (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* **15**, 467–476.
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F. and Novick, P.** (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 637–659.
- Mogk, S., Meiwes, A., Boßelmann, C. M., Wolburg, H. and Duszzenko, M.** (2014). The lane to the brain: how African trypanosomes invade the CNS. *Trends Parasitol.*
- Molla-Herman, A., Ghossoub, R., Blisnick, T., Meunier, A., Serres, C., Silbermann, F., Emmerson, C., Romeo, K., Bourdoncle, P., Schmitt, A., et al.** (2010). The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J. Cell Sci.* **123**, 1785–1795.
- Moreira, D., López-García, P. and Vickerman, K.** (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1861–1875.
- Morriswood, B., He, C. Y., Sealey-Cardona, M., Yelinek, J., Pypaert, M. and Warren, G.** (2009). The bilobe structure of *Trypanosoma brucei* contains a MORN-repeat protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* **167**, 95–103.
- Morriswood, B., Havlicek, K., Demmel, L., Yavuz, S., Sealey-Cardona, M., Vidilaseris, K., Anrather, D., Kostan, J., Djinic-Carugo, K., Roux, K. J., et al.** (2013). Novel

- Bilobe Components in *Trypanosoma brucei* Identified Using Proximity-Dependent Biotinylation. *Eukaryot. Cell* **12**, 356–367.
- Mostowy, S. and Cossart, P.** (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 183–194.
- Nett, I. R. E., Martin, D. M. A., Miranda-Saavedra, D., Lamont, D., Barber, J. D., Mehlert, A. and Ferguson, M. A. J.** (2009). The Phosphoproteome of Bloodstream Form *Trypanosoma brucei*, Causative Agent of African Sleeping Sickness. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1527–1538.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K. and Ullu, E.** (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14687–14692.
- Niforou, K. N., Anagnostopoulos, A. K., Vougas, K., Kittas, C., Gorgoulis, V. G. and Tsangaris, G. T.** (2008). The Proteome Profile of the Human Osteosarcoma U2OS Cell Line. *Cancer Genomics - Proteomics* **5**, 63–77.
- Oberholzer, M., Langousis, G., Nguyen, H. T., Saada, E. A., Shimogawa, M. M., Jonsson, Z. O., Nguyen, S. M., Wohlschlegel, J. A. and Hill, K. L.** (2011). Independent Analysis of the Flagellum Surface and Matrix Proteomes Provides Insight into Flagellum Signaling in Mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.010538.
- Olver, C. and Vidal, M.** (2007). Proteomic analysis of secreted exosomes. *Subcell. Biochem.* **43**, 99–131.
- Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D. P. and Pérez-Morga, D.** (2006). The trypanolytic factor of human serum. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 477–486.
- Peacock, L., Bailey, M. and Gibson, W.** (2005). Tetracycline induction of gene expression in *Trypanosoma brucei* within the tsetse fly vector. *Mol. Biochem. Parasitol.* **140**, 247–249.
- Pearson, C. G. and Winey, M.** (2009). Basal Body Assembly in Ciliates: The Power of Numbers. *Traffic* **10**, 461–471.
- Pearson, D. L., Reimonenq, R. D. and Pollard, K. M.** (1999). Expression and purification of recombinant mouse fibrillarin. *Protein Expr. Purif.* **17**, 49–56.
- Perin, M. S.** (1994). The COOH terminus of synaptotagmin mediates interaction with the neurexins. *J. Biol. Chem.* **269**, 8576–8581.
- Perin, M. S.** (1996). Mirror image motifs mediate the interaction of the COOH terminus of multiple synaptotagmins with the neurexins and calmodulin. *Biochemistry (Mosc.)* **35**, 13808–13816.
- Perin, M. S., Brose, N., Jahn, R. and Südhof, T. C.** (1991). Domain structure of synaptotagmin (p65). *J. Biol. Chem.* **266**, 623–629.

- Portman, N. and Gull, K.** (2010). The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. *Int. J. Parasitol.* **40**, 135–148.
- Porto-Carreiro, I., Attias, M., Miranda, K., De Souza, W. and Cunha-e-Silva, N.** (2000). Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 858–869.
- 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.
- Ralston, K. S. and Hill, K. L.** (2008). The flagellum of Trypanosoma brucei: new tricks from an old dog. *Int. J. Parasitol.* **38**, 869–884.
- Ralston, K. S., Kabututu, Z. P., Melehani, J. H., Oberholzer, M. and Hill, K. L.** (2009). The Trypanosoma brucei Flagellum: Moving Parasites in New Directions. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 335–362.
- Ralston, K. S., Kisalu, N. K. and Hill, K. L.** (2011). Structure-Function Analysis of Dynein Light Chain 1 Identifies Viable Motility Mutants in Bloodstream-Form Trypanosoma brucei. *Eukaryot. Cell* **10**, 884–894.
- Ramanan, V., Agrawal, N. J., Liu, J., Engles, S., Toy, R. and Radhakrishnan, R.** (2011). Systems biology and physical biology of clathrin-mediated endocytosis. *Integr. Biol.* **3**, 803.
- Rashid, D. J., Bononi, J., Tripet, B. P., Hodges, R. S. and Pierce, D. W.** (2005). Monomeric and dimeric states exhibited by the kinesin-related motor protein KIF1A. *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* **65**, 538–549.
- Rasooly, R. and Balaban, N.** (2002). Structure of p15 trypanosome microtubule associated protein. *Parasitol. Res.* **88**, 1034–1039.
- Rassi Jr, A., Rassi, A. and Marin-Neto, J. A.** (2010). Chagas disease. *The Lancet* **375**, 1388–1402.
- Reiter, J. F., Blacque, O. E. and Leroux, M. R.** (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.
- Rickman, C., Craxton, M., Osborne, S. and Davletov, B.** (2004a). Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family. *Biochem. J.* **378**, 681.
- Rickman, C., Craxton, M., Osborne, S. and Davletov, B.** (2004b). Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family. *Biochem. J.* **378**, 681–686.
- Rindisbacher, L., Hemphill, A. and Seebeck, T.** (1993). A repetitive protein from Trypanosoma brucei which caps the microtubules at the posterior end of the cytoskeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**, 83–96.

- 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.
- Robinson, D. R., Sherwin, T., Ploubidou, A., Byard, E. H. and Gull, K.** (1995). Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J. Cell Biol.* **128**, 1163–1172.
- Roditi, I., Furger, A., Ruepp, S., Schürch, N. and Bütikofer, P.** (1998). Unravelling the procyclin coat of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**, 117–130.
- Rotureau, B., Blisnick, T., Subota, I., Julkowska, D., Cayet, N., Perrot, S. and Bastin, P.** (2014). Flagellar adhesion in *Trypanosoma brucei* relies on interactions between different skeletal structures in the flagellum and cell body. *J. Cell Sci.* **127**, 204–215.
- Roy Chowdhury, A., Bakshi, R., Wang, J., Yildirim, G., Liu, B., Pappas-Brown, V., Tolun, G., Griffith, J. D., Shapiro, T. A., Jensen, R. E., et al.** (2010). The killing of African trypanosomes by ethidium bromide. *PLoS Pathog.* **6**, e1001226.
- Sack, S., Müller, J., Marx, A., Thormählen, M., Mandelkow, E.-M., Brady, S. T. and Mandelkow, E.** (1997). X-ray Structure of Motor and Neck Domains from Rat Brain Kinesin \dagger, \ddagger . *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 16155–16165.
- Salinas, S., Bilsland, L. G. and Schiavo, G.** (2008). Molecular landmarks along the axonal route: axonal transport in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 445–453.
- Saxton, W. M., Stemple, D. L., Leslie, R. J., Salmon, E. D., Zavortink, M. and McIntosh, J. R.** (1984). Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J. Cell Biol.* **99**, 2175–2186.
- Schmid, C., Richer, M., Bilenge, C. M. M., Josenando, T., Chappuis, F., Manthelot, C. R., Nangouma, A., Doua, F., Asumu, P. N., Simarro, P. P., et al.** (2005). Effectiveness of a 10-Day Melarsoprol Schedule for the Treatment of Late-Stage Human African Trypanosomiasis: Confirmation from a Multinational Study (Impamel II). *J. Infect. Dis.* **191**, 1922–1931.
- Schnarwiler, F., Niemann, M., Doiron, N., Harsman, A., Käser, S., Mani, J., Chanfon, A., Dewar, C. E., Oeljeklaus, S., Jackson, C. B., et al.** (2014). Trypanosomal TAC40 constitutes a novel subclass of mitochondrial β -barrel proteins specialized in mitochondrial genome inheritance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7624–7629.
- Scholey, J. M.** (2003). Intraflagellar Transport. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 423–443.
- Seebeck, T., Whittaker, P. A., Imboden, M. A., Hardman, N. and Braun, R.** (1983). Tubulin genes of *Trypanosoma brucei*: a tightly clustered family of alternating genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4634.

- Selvapandiyan, A., Kumar, P., Salisbury, J. L., Wang, C. C. and Nakhasi, H. L.** (2012). Role of Centrioles 2 and 3 in Organelle Segregation and Cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* **7**, e45288.
- Shao, X., Fernandez, I., Südhof, T. C. and Rizo, J.** (1998). Solution Structures of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound C2A Domain of Synaptotagmin I: Does Ca²⁺ Induce a Conformational Change?†. *Biochemistry (Mosc.)* **37**, 16106–16115.
- Shapiro, T. A. and Englund, P. T.** (1995). The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 117–143.
- Silverman, J. M., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J. and Reiner, N. E.** (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.* **9**, R35.
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. and Lukes, J.** (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* **22**, 168–174.
- Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V. and Stagljar, I.** (2010). Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nat. Protoc.* **5**, 1281–1293.
- Stephan, A., Vaughan, S., Shaw, M. K., Gull, K. and McKean, P. G.** (2007). An Essential Quality Control Mechanism at the Eukaryotic Basal Body Prior to Intraflagellar Transport. *Traffic* **8**, 1323–1330.
- Stevens, J. R.** (2008). Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite Paris Fr.* **15**, 226–232.
- Stuart, K. and Panigrahi, A. K.** (2002). RNA editing: complexity and complications. *Mol. Microbiol.* **45**, 591–596.
- Subota, I., Julkowska, D., Vincensini, L., Reeg, N., Buisson, J., Blisnick, T., Huet, D., Perrot, S., Santi-Rocca, J., Duchateau, M., et al.** (2014). Proteomic analysis of intact flagella of procyclic *Trypanosoma brucei* cells identifies novel flagellar proteins with unique sub-localisation and dynamics. *Mol. Cell. Proteomics* mcp.M113.033357.
- Südhof, T. C.** (2002). Synaptotagmins: Why So Many? *J. Biol. Chem.* **277**, 7629–7632.
- Sun, S. Y., Wang, C., Yuan, Y. A. and He, C. Y.** (2013). An intracellular membrane junction consisting of flagellum adhesion glycoproteins links flagellum biogenesis to cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **126**, 520–531.
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Südhof, T. C. and Sprang, S. R.** (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: A novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* **80**, 929–938.
- Suzuki, J., Fukuda, M., Kawata, S., Maruoka, M., Kubo, Y., Takeya, T. and Shishido, T.** (2006). A rapid protein expression and purification system using Chinese hamster ovary cells expressing retrovirus receptor. *J. Biotechnol.* **126**, 463–474.

- Taschner, M., Bhogaraju, S. and Lorentzen, E.** (2012). Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation* **83**, S12–S22.
- Taylor, J. E. and Rudenko, G.** (2006). Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet.* **22**, 614–620.
- 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.
- Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Südhof, T. C. and Rizo, J.** (1998). Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain? *EMBO J.* **17**, 3921–3930.
- Ullu, E. and Tschudi, C.** (1991). Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 10074–10078.
- Urbaniak, M. D., Martin, D. M. A. and Ferguson, M. A. J.** (2013). Global Quantitative SILAC Phosphoproteomics Reveals Differential Phosphorylation Is Widespread between the Procyclic and Bloodstream Form Lifecycle Stages of *Trypanosoma brucei*. *J. Proteome Res.* **12**, 2233–2244.
- Uzureau, P., Uzureau, S., Lecordier, L., Fontaine, F., Tebabi, P., Homblé, F., Grélard, A., Zhendre, V., Nolan, D. P., Lins, L., et al.** (2013). Mechanism of *Trypanosoma brucei* gambiense resistance to human serum. *Nature* **501**, 430–434.
- Vale, R. D. and Fletterick, R. J.** (1997). The Design Plan of Kinesin Motors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 745–777.
- Van der Ploeg, L. H. T., Cornelissen, A. W. C. A., Michels, P. A. M. and Borst, P.** (1984). Chromosome rearrangements in *trypanosoma brucei*. *Cell* **39**, 213–221.
- Vanhollebeke, B. and Pays, E.** (2010). The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill. *Mol. Microbiol.* **76**, 806–814.
- Van Xong, H., Vanhamme, L., Chamekh, M., Chimfwembe, C. E., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Van Meirvenne, N., Hamers, R., De Baetselier, P. and Pays, E.** (1998). A VSG Expression Site–Associated Gene Confers Resistance to Human Serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell* **95**, 839–846.
- Vaughan, S., Kohl, L., Ngai, I., Wheeler, R. J. and Gull, K.** (2008). A Repetitive Protein Essential for the Flagellum Attachment Zone Filament Structure and Function in *Trypanosoma brucei*. *Protist* **159**, 127–136.
- Vedrenne, C., Giroud, C., Robinson, D. R., Besteiro, S., Bosc, C., Bringaud, F. and Baltz, T.** (2002). Two related subpellicular cytoskeleton-associated proteins in *Trypanosoma brucei* stabilize microtubules. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1058–1070.
- Verhey, K. J. and Hammond, J. W.** (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 765–777.

- Versele, M. and Thorner, J.** (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol.* **15**, 414–424.
- Vidilaseris, K. and Dong, G.** (2014). Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of the N-terminal domain of Trypanosoma brucei BILBO1. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 628–631.
- Vidilaseris, K., Morriswood, B., Kontaxis, G. and Dong, G.** (2014a). Structure of the TbBILBO1 Protein N-terminal Domain from Trypanosoma brucei Reveals an Essential Requirement for a Conserved Surface Patch. *J. Biol. Chem.* **289**, 3724–3735.
- Vidilaseris, K., Shimanovskaya, E., Esson, H. J., Morriswood, B. and Dong, G.** (2014b). Assembly mechanism of Trypanosoma brucei BILBO1, a multidomain cytoskeletal protein. *J. Biol. Chem.*
- Walczak, C. E., Gayek, S. and Ohi, R.** (2013). Microtubule-depolymerizing kinesins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **29**, 417–441.
- Wang, Z., Morris, J. C., Drew, M. E. and Englund, P. T.** (2000). Inhibition of Trypanosoma brucei Gene Expression by RNA Interference Using an Integratable Vector with Opposing T7 Promoters. *J. Biol. Chem.* **275**, 40174–40179.
- Weirather, J. L., Wilson, M. E. and Donelson, J. E.** (2012). Mapping of VSG similarities in Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* **181**, 141–152.
- Wheeler, R. J.** (2010). The trypanolytic factor—mechanism, impacts and applications. *Trends Parasitol.* **26**, 457–464.
- Wickstead, B. and Gull, K.** (2006). A “Holistic” Kinesin Phylogeny Reveals New Kinesin Families and Predicts Protein Functions. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1734–1743.
- Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K.** (2002a). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* **125**, 211–216.
- Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K.** (2002b). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* **125**, 211–216.
- Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K.** (2004). The Small Chromosomes of Trypanosoma brucei Involved in Antigenic Variation Are Constructed Around Repetitive Palindromes. *Genome Res.* **14**, 1014–1024.
- Wilson, D., Pethica, R., Zhou, Y., Talbot, C., Vogel, C., Madera, M., Chothia, C. and Gough, J.** (2009). SUPERFAMILY—sophisticated comparative genomics, data mining, visualization and phylogeny. *Nucleic Acids Res.* **37**, D380–386.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C. and Cross, G. M.** (1999a). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**, 89–101.

- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C. and Cross, G. A.** (1999b). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**, 89–101.
- Woehlke, G. and Schliwa, M.** (2000). Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 50–58.
- Woehlke, G., Ruby, A. K., Hart, C. L., Ly, B., Hom-Booher, N. and Vale, R. D.** (1997). Microtubule Interaction Site of the Kinesin Motor. *Cell* **90**, 207–216.
- Wong, Y. L., Dietrich, K. A., Naber, N., Cooke, R. and Rice, S. E.** (2009). The Kinesin-1 Tail Conformationally Restricts the Nucleotide Pocket. *Biophys. J.* **96**, 2799–2807.
- Woods, A., Sherwin, T., Sasse, R., MacRae, T. H., Baines, A. J. and Gull, K.** (1989). Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* **93 (Pt 3)**, 491–500.
- Woods, K., Nic a'Bhaird, N., Dooley, C., Perez-Morga, D. and Nolan, D. P.** (2013). Identification and Characterization of a Stage Specific Membrane Protein Involved in Flagellar Attachment in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* **8**, e52846.
- Woodward, R. and Gull, K.** (1990). Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **95**, 49–57.
- Xia, X.-X., Qian, Z.-G. and Lee, S. Y.** (2011). Comparative proteomic and genetic analyses reveal unidentified mutations in *Escherichia coli* XL1-Blue and DH5 α . *FEMS Microbiol. Lett.* **314**, 119–124.
- Young, A.** (2007). Structural insights into the clathrin coat. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 448–458.
- Yu, Y. and Feng, Y.-M.** (2010). The role of kinesin family proteins in tumorigenesis and progression. *Cancer* **116**, 5150–5160.
- Zhao, Z., Lindsay, M. E., Roy Chowdhury, A., Robinson, D. R. and Englund, P. T.** (2008). p166, a link between the trypanosome mitochondrial DNA and flagellum, mediates genome segregation. *EMBO J.* **27**, 143–154.
- Zhou, Q., Gheiratmand, L., Chen, Y., Lim, T. K., Zhang, J., Li, S., Xia, N., Liu, B., Lin, Q. and He, C. Y.** (2010). A Comparative Proteomic Analysis Reveals a New Bi-Lobe Protein Required for Bi-Lobe Duplication and Cell Division in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* **5**, e9660.
- Zhou, Q., Liu, B., Sun, Y. and He, C. Y.** (2011). A coiled-coil- and C2-domain-containing protein is required for FAZ assembly and cell morphology in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **124**, 3848–3858.
- Zomerdijk, J. C., Kieft, R. and Borst, P.** (1991). Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. *Nature* **353**, 772–775.

Titre : Caractérisation de nouvelles protéines, partenaires potentiels de BILBO1, chez le parasite *Trypanosoma brucei*.

Résumé :

Le parasite *Trypanosoma brucei* est retrouvé en Afrique sub-Saharienne et est responsable de la maladie du sommeil chez l'homme et de la Nagana chez les animaux. Il cause de graves problèmes sanitaires et économiques car il affecte le bétail. La vaccination est impossible à cause de la variation antigénique. Les traitements actuels sont difficiles à mettre en place avec des effets secondaires importants. Il est donc urgent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer de nouveaux médicaments.

T. brucei possède un flagelle unique qui émerge de la cellule par une structure appelée la poche flagellaire (FP). Cette FP est une invagination de la membrane plasmique. Elle est nécessaire à la survie du parasite car c'est le seul site d'endo- et d'exocytose. Au cou de la FP on trouve le collier de la poche flagellaire (FPC) en forme d'anneau. Le FPC est composé de nombreuses protéines dont BILBO1 qui est nécessaire à la biogenèse de la FP et du FPC.

De nombreux partenaires de BILBO1 ont été identifiés. Dans cette thèse, je caractérise deux d'entre eux : FPC5, une kinésine putative et FPC9, une synaptotagmine putative. J'ai pu montrer que FPC5 est localisée aux corps basaux mais aussi au FPC. Cette protéine n'est pas essentielle à la survie des parasites bien que des phénotypes de croissance et de ségrégation de la FP apparaissent après induction de l'ARNi. Nous ne sommes pas parvenus à prouver sa fonctionnalité, cependant j'ai pu montrer que son domaine moteur est capable de lier les microtubules.

FPC9 est trouvée au niveau de la zone de transition du flagelle. L'ARNi contre cette protéine n'étant pas effectif, nous ne pouvons pas conclure quant à sa fonction dans la cellule.

Mots clés : *Trypanosoma brucei*, collier de la poche flagellaire, BILBO1, kinésine, synaptotagmine.

Title : Characterization of new BILBO1 putative partners in the parasite *Trypanosoma brucei*.

Abstract :

Trypanosoma brucei is a parasite found in sub-Saharan Africa and is responsible for sleeping sickness in humans and Nagana in animals. It is the source of serious health and economic problems because it kills livestock. Vaccination is not possible because of antigenic variation and current treatments are difficult to implement or have toxic side effects. For these reasons it is urgent to find new therapeutic targets in order to develop effective treatments.

T. brucei has a single copy flagellum that emerges from the cytoplasm through a unique structure called the Flagellar Pocket (FP). This pocket is an invagination of the pellicular membrane and because it is the sole site of endo- and exocytosis, it is essential for parasite survival. At the neck of the FP there is a cytoskeletal structure: the Flagellar Pocket Collar (FPC) that forms a “ring” around the flagellum. The FPC consists of numerous proteins, including the first to be identified - BILBO1, which is necessary for FP and FPC biogenesis.

A number of potential BILBO1 partners were identified. In this thesis I characterize two of these proteins: FPC5, a putative kinesin and FPC9, a putative synaptotagmin. I show that FPC5 localizes mainly in the basal body area, but also at the FPC. This protein is not essential for parasite survival although reduced FP segregation and growth phenotypes appear after RNAi induction. We are not able to prove its functionality, however I could show its motor domain is able to bind microtubules.

FPC9 is found in the transition zone of the flagellum. However RNAi knockdown against this protein was not efficient, so we are currently unable to define a function for this protein.

Keywords : *Trypanosoma brucei*, flagellar pocket collar, BILBO1, kinesin, synaptotagmin.