Journal de la Société de Biologie, 197 (4), 379-387 (2003)

Le flagelle du trypanosome : de la mobilité à la morphogenèse cellulaire

par Linda Kohl[1], Derrick Robinson[2] & Philippe Bastin[1]*

[1] INSERM U565 & CNRS UMR8646, Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle, 43, rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05, France ; [2] CNRS UMR5016, Laboratoire de Parasitologie Moléculaire, Université Victor Ségalen, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France
**Auteur pour correspondance (pbastin@mnhn.fr)*

Reçu le 18 juin 2003

RÉSUMÉ

Les cils et les flagelles sont des structures élaborées du cytosquelette, conservées des protistes aux mammifères chez qui ils accomplissent des fonctions reconnues de mobilité ou de sensibilité. Nous avons pu démontrer un nouveau rôle pour le flagelle dans la morphogenèse cellulaire, où il contrôle la taille, la forme, la polarité et la division cellulaire chez le protozoaire *Trypanosoma brucei*. Le trypanosome possède un flagelle unique qui est attaché le long du corps cellulaire. Lorsque la cellule se réplique, un nouveau flagelle est assemblé et suit le chemin du vieux flagelle existant. Afin d'étudier les fonctions du flagelle, sa formation a été perturbée par extinction, *via* ARN interférence inductible, des composantes nécessaires pour le transport intraflagellaire, un processus dynamique indispensable pour l'assemblage flagellaire. Tout d'abord, nous montrons que la réduction du transport intraflagellaire conduit à l'assemblage d'un flagelle plus court, démontrant l'importance de ce mécanisme pour le contrôle de la taille du flagelle. Il est frappant de constater que les cellules avec un flagelle plus court sont plus petites, avec une corrélation directe entre la longueur du flagelle et la taille de la cellule. Une analyse morphométrique détaillée révèle que l'extrémité du nouveau flagelle définit le point d'initiation de la cytokinèse. Ensuite, lorsque la formation du nouveau flagelle est complètement bloquée, les cellules non-flagellées sont très petites, perdent leur forme et leur polarité cellulaire normale et sont incapables de se diviser. Nous montrons que l'élongation du flagelle contrôle la formation d'autres structures du cytosquelette qui agissent comme organisateurs moléculaires de la cellule.

SUMMARY The flagellum : from cell motility to morphogenesis

Flagella and cilia are elaborate cytoskeletal structures conserved from protists to mammals, where they fulfil functions related to motility or sensitivity. We demonstrate a novel role for the flagellum in the control of cell morphogenesis and division of *Trypanosoma brucei*. To investigate flagellum functions, its formation was perturbed by inducible RNA interference silencing of components required for intraflagellar transport (IFT), a dynamic process necessary for flagellum assembly. First, we show that down-regulation of IFT leads to assembly of a shorter flagellum. Strikingly, cells with a shorter flagellum are smaller, with a direct correlation between flagellum length and cell size. Detailed morphogenetic analysis reveals that the tip of the new flagellum defines the point where cytokinesis is initiated. Furthermore, when new flagellum formation is completely blocked, non-flagellated cells are very short, lose their normal shape and polarity and fail to undergo cytokinesis. We show that flagellum elongation controls formation of cytoskeletal structures present in the cell body that act as molecular organisers of the cell.

INTRODUCTION

Les cils et les flagelles des eucaryotes sont des organites composés d'une structure de base appelée axonème, formée d'un cylindre de 9 doublets de microtubules encerclant une paire centrale, et d'une série de projections associées (Fig. 1). L'axonème montre une conservation remarquable des protistes jusqu'aux mammifères (Silflow & Lefebvre, 2001). En dépit de leur architecture structurelle hautement conservée, les cils et flagelles sont impliqués dans des fonctions très différentes : mobilité (de la cellule ou du matériel environnant), reproduction ou sensibilité (Bastin *et al.*, 2000b, Silflow & Lefebvre, 2001).

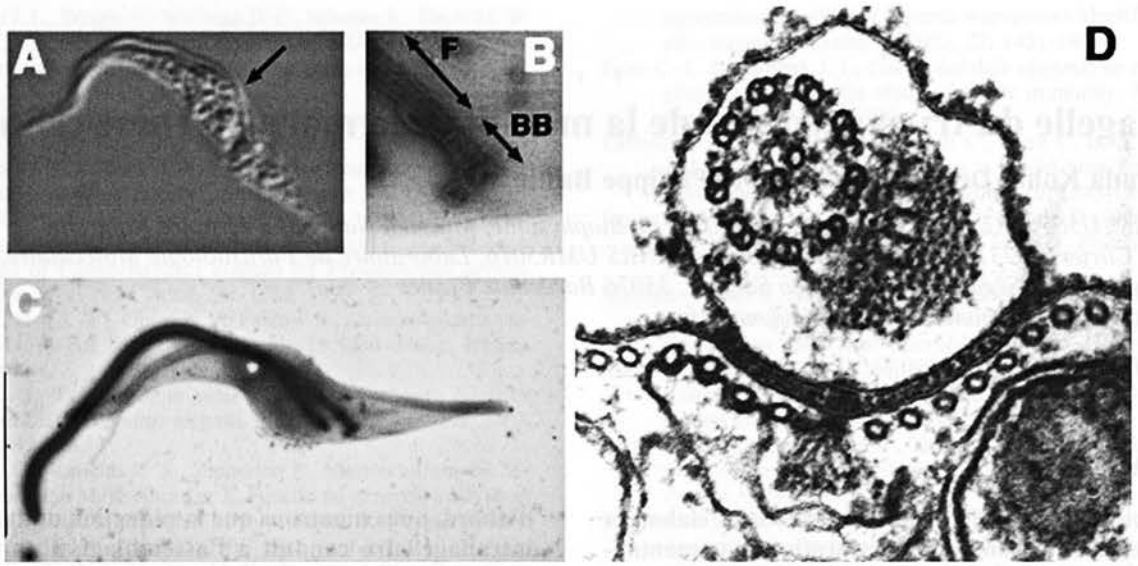

FIG. 1. – A. Trypanosome en contraste interférentiel différentiel, le flagelle est nettement visible le long du corps cellulaire (flèche). B-C. Cytosquelette de trypanosome après extraction au détergent. C. Vue globale et B. Agrandissement de la zone du corps basal (BB) et du début du flagelle (F). Les doublets périphériques et la paire centrale sont visibles. D. Coupe transversale du flagelle du trypanosome.

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des *Kinetoplastida* qui sont responsables de maladies tropicales, telle la maladie du sommeil. Ils possèdent un seul flagelle, avec un axonème classique et une structure additionnelle, appelée la fibre paraflagellaire (PFR) (Fig. 1D) (Gull, 1999). Le flagelle émerge d'une poche flagellaire et est attaché le long du corps cellulaire à l'exception de son extrémité distale. À la face cytoplasmique du corps cellulaire et adjacent au flagelle, se situe un ensemble défini de structures du cytosquelette, appelé zone d'attachement du flagelle ou FAZ. Le FAZ est composé de deux structures individuelles : 1) un ensemble de 4 microtubules, de caractéristiques biochimiques distinctes des autres microtubules présents dans le corps cellulaire, et connecté au réticulum endoplasmique lisse et 2) un filament dense aux électrons (Sherwin & Gull, 1989a). Les deux structures sont initiées à partir de la région du corps basal et se poursuivent jusqu'à l'extrémité antérieure de la cellule. La fonction du FAZ est inconnue, mais sa position suggère un rôle potentiel dans l'organisation cellulaire (Robinson *et al.*, 1995). Durant la réplication cellulaire, le vieux flagelle est maintenu et un nouveau est assemblé à partir d'un nouveau corps basal, toujours localisé à l'extrémité postérieure de la cellule. Les structures FAZ sont aussi répliquées et associées au nouveau flagelle (Kohl *et al.*, 1999). Lorsque le nouveau flagelle s'allonge, sa pointe distale reste en contact constant avec le vieux flagelle. Une structure discrète, appelée le connecteur des flagelles (FC), a été identifiée à cet endroit et est présente uniquement lors de la duplication cellulaire (Moreira-Leite *et al.*, 2001). Il a été postulé que le FC pourrait ancrer l'extrémité du nouveau flagelle au vieux flagelle. Ainsi l'assemblage du nouveau flagelle se ferait en suivant le chemin du flagelle existant et agirait comme guide pour la formation cellulaire, répliquant ainsi l'organisation existante (Moreira-Leite *et al.*, 2001). La cytokinèse est initiée à l'extrémité antérieure de la cellule et procède d'une manière hélicoïdale, coupant la cellule en deux en suivant l'axe du nouveau flagelle/FAZ (Vaughan & Gull, 2003).

Le flagelle du trypanosome est très mobile, et l'implication de la fibre paraflagellaire et de l'axonème dans sa mobilité a été démontrée (Bastin *et al.*, 2000a, Bastin *et al.*, 1999 ; Bastin *et al.*, 1998 ; Durand-Dubief *et al.*, 2003 ; Kohl *et al.*, 2001 ; McKean *et al.*, 2003). Toutefois les trypanosomes avec une mobilité réduite restent viables en culture (Bastin *et al.*, 1998). En tenant compte de l'omniprésence du flagelle durant le cycle cellulaire et biologique du trypanosome, nous postulons que cette structure pourrait remplir d'autres fonctions que la mobilité, et pourrait être impliquée dans le cycle cellulaire. Pour évaluer cette possibilité, nous avons considéré la possibilité de perturber la construction du flagelle en interférant avec le transport intraflagellaire (IFT). L'IFT est défini comme le transport de particules protéiques (cargos) entre les doublets de microtubules externes et la membrane du flagelle ou cil (Rosenbaum & Witman, 2002). Le transport vers l'extrémité distale du flagelle est actionné par la kinésine II hétérotrimérique (Kozminski *et al.*, 1995), tandis que les particules sont ramenées au corps basal par un moteur dynéine (Pazour *et al.*, 1999, Porter, 1999). L'inhibition de l'IFT bloque l'assemblage des cils et flagelles dans la plupart des eucaryotes étudiés jusqu'ici (Rosenbaum & Witman, 2002). Il a été suggéré que l'IFT est utilisé pour transporter des précurseurs de l'axonème à l'extrémité distale du flagelle, qui est le site d'assemblage de l'organite (Rosenbaum & Witman, 2002).

L'IFT EST NÉCESSAIRE POUR LA FORMATION DU FLAGELLE CHEZ LE TRYPANOSOME

En criblant les banques de données de séquençage de *T. brucei*, nous avons identifié au moins 7 gènes codant des homologues de protéines impliquées dans l'IFT : soit des protéines motrices, soit des protéines présentes dans les cargos (mais dont la fonction est inconnue). Toutes les protéines IFT du trypanosome montrent un degré élevé de conservation, suggérant que l'IFT pourrait être fonctionnel chez cet organisme. Par exemple, TbDHC1b (chaîne lourde de la dynéine cytoplasmique) présente toutes les signatures spécifiques des chaînes lourdes de dynéine impliquées dans l'IFT (Fig. 2A). Un gène de chaque catégorie a été sélectionné pour ce travail : *TbDHC1b* (moteur) et *TbIFT88* (cargo) respectivement.

Afin de résoudre la question d'une implication potentielle du flagelle dans le cycle cellulaire du trypanosome (Moreira-Leite *et al.*, 2001, Robinson *et al.*, 1995), nous avons décidé de perturber la formation du flagelle en éteignant *TbDHC1b* ou *TbIFT88* par ARN interférence (ARNi) (Fire *et al.*, 1998). Les trypanosomes ont été transformés avec des plasmides capables d'exprimer les ARN double brin (ARNdb) *TbDHC1b* ou *TbIFT88* sous le contrôle d'un promoteur inductible (Wang *et al.*, 2000). Après transfection et sélection, les lignées cellulaires recombinantes ont été induites pour exprimer l'ARNdb de *TbDHC1b* ou *TbIFT88* par croissance en présence de tétracycline pendant 48 heures. Dans les deux cas, la RT-PCR a démontré une réduction efficace et spécifique de la quantité d'ARN ciblé (Fig. 2B). Les mutants non-induits (TbDHC1b)ARNi et (TbIFT88) ARNi se comportent comme des trypanosomes sauvages. Au cours de l'induction de l'ARNi, les cellules mutantes (TbDHC1b)ARNi et (TbIFT88) ARNi ont été examinées par microscopie optique et le flagelle a été identifié par immunomarquage avec un anticorps anti-fibre paraflagellaire PFRA (Kohl *et al.*, 1999). Dans les deux cas, les cellules non-flagellées sont détectées 48 heures après induction de l'ARNi (Fig. 2C, D). Les phénotypes sont très semblables pour les deux mutants, avec un léger décalage pour *TbIFT88* (Fig. 1E). Le pourcentage de cellules non-flagellées augmente rapidement pour atteindre un maximum de 70 à 80 % de la population après 3 jours (Fig. 2E). Ceci démontre le rôle essentiel de TbDHC1b (une protéine motrice) et de TbIFT88 (une protéine totalement différente, présente dans les particules IFT) dans la formation du flagelle. En tenant compte de la présence d'homologues chez le trypanosome de toutes les protéines connues pour être impliquées dans l'IFT dans d'autres organismes, ces résultats suggèrent l'existence de l'IFT chez les trypanosomes et sa conservation fonctionnelle dans l'assemblage flagellaire. Une réduction progressive de la vitesse de croissance des deux mutants (TbDHC1b)ARNi et (TbIFT88) ARNi a été observée au cours de l'induction de l'ARNi (Fig. 1F), suggérant un rôle important de la formation flagellaire dans le développement du trypanosome.

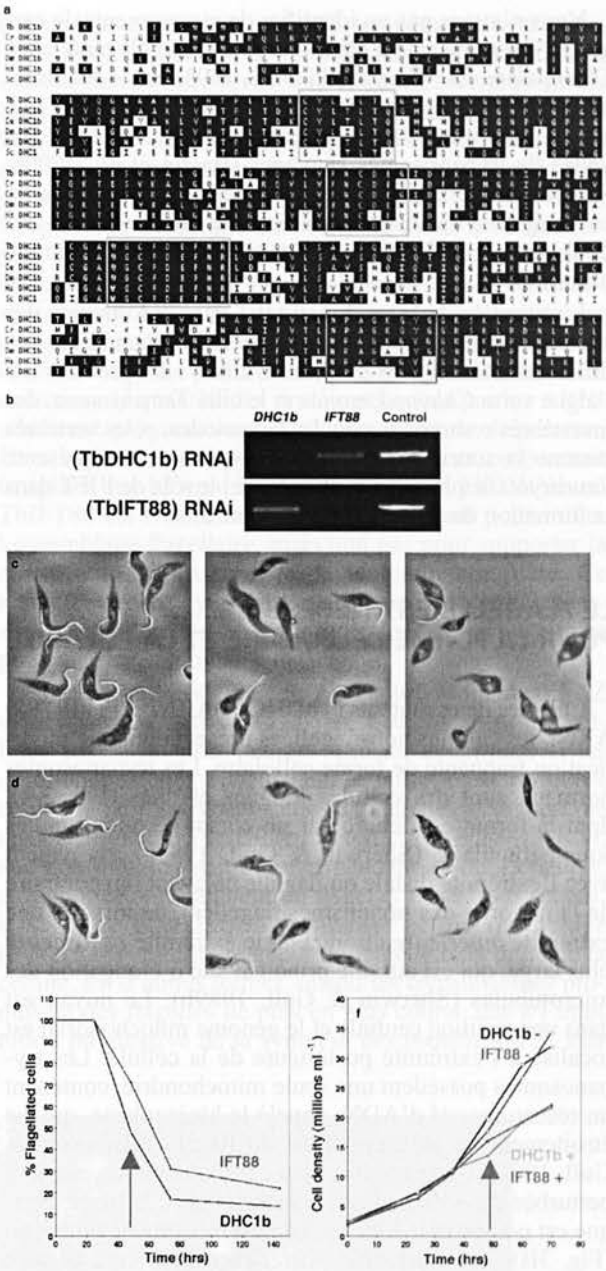

FIG. 2. – TbDHC1b et TbIFT88 sont indispensables pour l'assemblage flagellaire. (A) Alignement partiel de séquences protéiques du domaine central de DHC1b de *T. brucei* (Tb), *C. reinhardtii* (Cr), *C. elegans* (Ce), *D. melanogaster* (Dm), *H. sapiens* (Hs) et la dynéine cytoplasmique de *S. cerevisae* (Sc). Les résidus conservés sont en noir et les signatures des dynéines sont encadrées. (B) L'analyse par RT-PCR montre des réductions spécifiques des quantités d'ARN de *TbDHC1b* ou *TbIFT88* dans les échantillons induits. Le knock-down de *TbDHC1b* (C) ou *TbIFT88* (D) entraîne la production de cellules non-flagellées au cours du temps. Des cellules non-induites (gauche), induites 48 heures (milieu) ou 72 heures (droite) ont été marquées par l'anticorps anti-PFRA L8C4, comme marqueur du flagelle (blanc) (E). L'ARNi a été induit dans les lignées (TbDHC1b) ARNi et (TbIFT88) ARNi, les cellules ont été fixées aux temps indiqués et marquées avec l'anticorps anti-PFRA. Les flèches indiquent quand les cellules non-flagellées commencent à être détectées. (F) Au cours de la même expérience, la croissance cellulaire a été suivie en présence (+) ou en absence (–) d'induction.

Nous n'avons pas pu identifier de mouvements de cargos IFT comme cela a été montré de façon élégante chez *Chlamydomonas* (Kozminski *et al.*, 1993), mais des structures ressemblant morphologiquement aux cargos d'IFT ont été identifiées dans des sections transversales de flagelles de trypanosomes sauvages (Bastin *et al.*, 2000b, Sherwin & Gull, 1989a). Comme chez *Chlamydomonas*, ces cargos se localisent aussi entre le microtubule B des doublets périphériques de l'axonème et la membrane plasmique.

L'utilisation de la machinerie IFT dans la formation des cils ou flagelles a été démontrée chez des organismes très différents (Rosenbaum & Witman, 2002) : des protistes tels l'algue verte *Chlamydomonas* et le cilié *Tetrahymena*, des invertébrés comme l'oursin, les Nématodes, et les vertébrés comme la souris. À ce jour, le trypanosome représente l'eucaryote le plus ancien chez lequel le rôle de l'IFT dans la formation du flagelle a été démontré.

LE FLAGELLE EST NÉCESSAIRE POUR LA FORME CELLULAIRE ET LA POLARITÉ

Chez les deux mutants (TbDHC1b)ARNi et (TbIFT88) ARNi, les cellules non-flagellées présentaient une modification frappante de forme cellulaire. Les trypanosomes normaux sont des cellules longues et fines (Fig. 3A), dont la forme est définie par un corset de microtubules sous-pelliculaire (Sherwin & Gull, 1989a). Ils nagent avec l'extrémité distale du flagelle en avant (au contraire de la majorité des organismes flagellés), définissant une extrémité *antérieure* étroite et une extrémité *postérieure* plus large, qui est aussi le principal site d'élongation des microtubules (Sherwin & Gull, 1989b). Le noyau est dans une position centrale et le génome mitochondrial est localisé à l'extrémité postérieure de la cellule. Les trypanosomes possèdent une seule mitochondrie, contenant un réseau massif d'ADN, appelé le kinétoplaste, qui est étroitement lié au corps basal du flagelle (Robinson & Gull, 1991). Cette organisation cellulaire est sévèrement perturbée dans les cellules non-flagellées : la forme typique est perdue et le kinétoplaste est très proche du noyau (Fig. 3B). Les extrémités postérieure/antérieure ne sont plus reconnaissables, ni pour la cellule complète, ni pour son cytosquelette (Fig. 3B, C), démontrant dramatiquement que le flagelle est indispensable à la définition de la forme cellulaire.

Nous nous sommes alors demandé si de telles cellules étaient toujours polarisées. Comme marqueur de polarité nous avons utilisé un anticorps anti-clathrine (Morgan *et al.*, 2001). Chez les trypanosomes, l'endocytose est limitée à une zone restreinte de la surface cellulaire, appelée la poche flagellaire, située à la base du flagelle. Chez les trypanosomes non-induits (Fig. 3D), la clathrine est localisée presque exclusivement à l'extrémité postérieure de la cellule, entre le kinétoplaste et le noyau (Morgan *et al.*, 2001). Dans les cellules non-flagellées des mutants (TbDHC1b) ARNi et (TbIFT88) ARNi (Fig. 3E) induites pendant 72 heures, la clathrine est dispersée à travers le cytoplasme, suggérant des défauts sévères dans l'organisation et la polarité cellulaire.

La croissance polarisée est une autre caractéristique du trypanosome, procédant par extension et insertion de

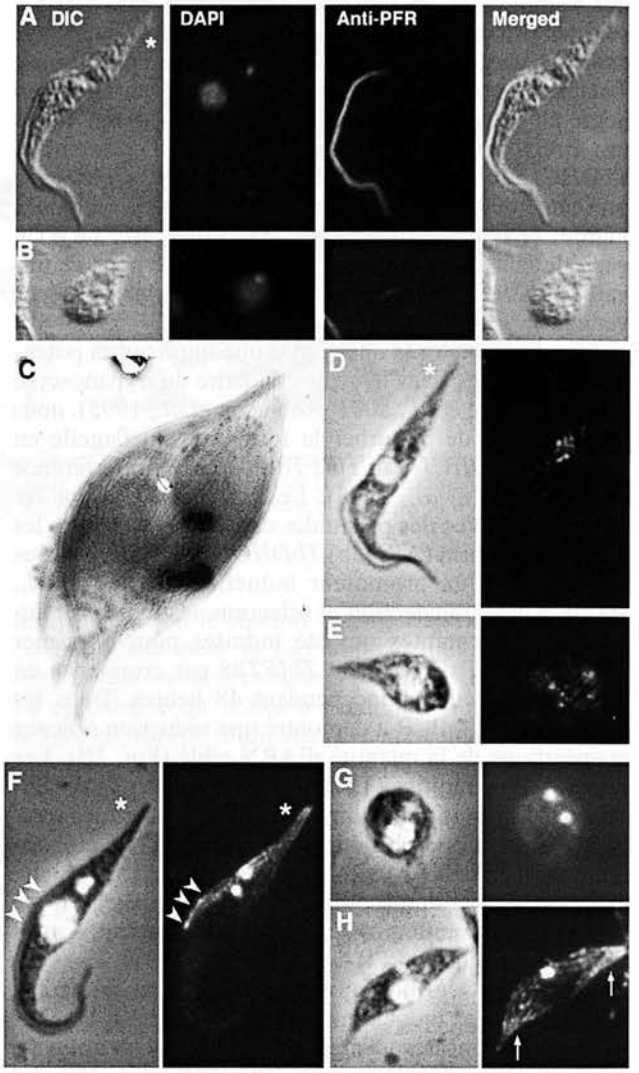

FIG. 3. – Les trypanosomes non-flagellés perdent leur forme cellulaire et leur polarité. (A, B) Marquage avec l'anticorps anti-PFRA (flagelle) et avec le DAPI. (A) Cellules (TbDHC1b) ARNi non induites montrant la polarité typique des trypanosomes, l'astérisque indiquant l'extrémité postérieure de la cellule. (B) Trypanosome (TbDHC1b) ARNi induit pendant 48 heures, sans flagelle il ne présente pas la forme cellulaire normale. (C) Micrographie électronique d'une cellule (TbDHC1b)ARNi non flagellée (induction 48 heures) extraite au détergent, révélant l'absence de polarité et la désorganisation partielle des microtubules. (D, E) Images en contraste de phase de trypanosomes marqués au DAPI (blanc, gauche) et avec des anticorps anti-clathrine (droite). Cellules non induites (TbIFT88)ARNi (D), cellules non-flagellées (TbIFT88) ARNi induites pendant 72 heures (E). (F-H) Les trypanosomes non flagellés présentent une croissance cellulaire anormale. Images de contraste de phase de trypanosomes (TbIFT88) ARNi marquées au DAPI (gauche) et avec l'anticorps anti-tubuline tyrosinée YL1/2 (droite). (F) Trypanosomes non induits, les têtes de flèche indiquent la position du nouveau flagelle. (G, H) Cellules (TbIFT88) ARNi induites pendant 72 heures : l'incorporation de tubuline tyrosinée a été observée sur tout le cytosquelette (G) ou aux 2 pôles opposés de la cellule (H).

microtubules à l'extrémité postérieure de la cellule. Ceci est illustré au moyen d'un anticorps monoclonal qui reconnaît uniquement l'α-tubuline tyrosinée, un marqueur de la tubuline récemment incorporée dans les microtubules (Robinson *et al.*, 1995, Sherwin & Gull, 1989b). Dans les cellules normales en duplication (identifiées par la présence de deux corps basaux), cet anticorps marque les corps basaux, l'extrémité postérieure de la cellule et l'extrémité distale du nouveau flagelle (Fig. 3F). Par contre, dans les mutants (TbIFT88) ARNi induits pendant 72 heures, 60,5 % (n = 162) des cellules non-flagellées ayant dupliqué leur corps basaux ne montrent pas d'incorporation polaire typique de tubuline tyrosinée. Seul un marquage diffus relativement faible est observé partout sur le cytosquelette (Fig. 3G). En plus, 19,1 % de cellules non-flagellées en duplication présentent de l'incorporation de tubuline tyrosinée aux deux extrémités de leur cytosquelette (Fig. 3H). Ces trypanosomes présentent souvent une forme de noix. Ces résultats démontrent que les cellules non-flagellées ont perdu les éléments nécessaires à la réplication correcte de leur cytosquelette.

LA LONGUEUR DU FLAGELLE DÉTERMINE LA TAILLE CELLULAIRE ET LA CYTOKINÈSE

Au cours du ciblage de l'ARN de *TbDHC1b* ou *TbIFT88* par ARNi, nous avons remarqué la présence de nombreuses cellules avec un flagelle plus court que la normale (Fig. 4A et B). Chez *Chlamydomonas*, l'IFT est indispensable pour contrôler la longueur du flagelle en balançant le turn-over des microtubules à l'extrémité distale de l'axonème (Marshall & Rosenbaum, 2001). Ceci est illustré par le mutant température-dépendant *FLA10*, qui ne réussit pas à assembler ni à maintenir ses flagelles quand leur croissance se fait à température restrictive. Toutefois l'incubation de ces cellules à des températures intermédiaires entre restrictive et permissive produit des flagelles de longueur intermédiaire (Marshall & Rosenbaum, 2001). Ces résultats suggèrent que des altérations de l'IFT peuvent mener à des changements dans la longueur flagellaire. Dans les mutants ARNi de *T. brucei*, l'expression inductible de l'ARNdb mène à la destruction de l'ARN et à l'inhibition de la synthèse de nouvelles protéines, mais les protéines existantes, synthétisées avant l'ARNi ne sont pas affectées et disparaissent uniquement d'après leur vitesse de turn-over (Bastin *et al.*, 2000a). Le résultat est que, lorsque l'ARNi entre en action, la quantité des protéines codées par les ARNs ciblés est progressivement réduite avant de disparaître. Dans le cas de nos mutants IFT de *T. brucei*, on pourrait imaginer que lorsque le pool de protéines TbDHC1b ou TbIFT88 est réduit, il est toujours suffisant pour initier l'assemblage flagellaire, mais non pas pour supporter la construction d'un flagelle de longueur complète. Ce résultat suggère que la régulation de la quantité accessible de protéines IFT pourrait agir comme un moyen pour réguler la longueur du flagelle.

Chez les cellules à flagelle plus court, le filament FAZ associé apparaît aussi plus court. Curieusement ces cellules paraissent plus petites. Afin de déterminer si les deux phénomènes étaient liés, la taille totale du corps cellulaire de 100 trypanosomes uniflagellés a été mesurée dans les lignées (TbDHC1b) ARNi et (TbIFT88) ARNi, soit non-induites, soit induites pendant 24 ou 48 heures, et rapportée à la longueur du flagelle. Dans les deux cas, il y a une corrélation frappante et quasi linéaire ($r^2 = 0,834$) entre la longueur du flagelle et la taille de la cellule. En d'autres termes, quand les trypanosomes produisent des flagelles de plus en plus courts, dus à l'inhibition progressive de la synthèse des protéines IFT, leur

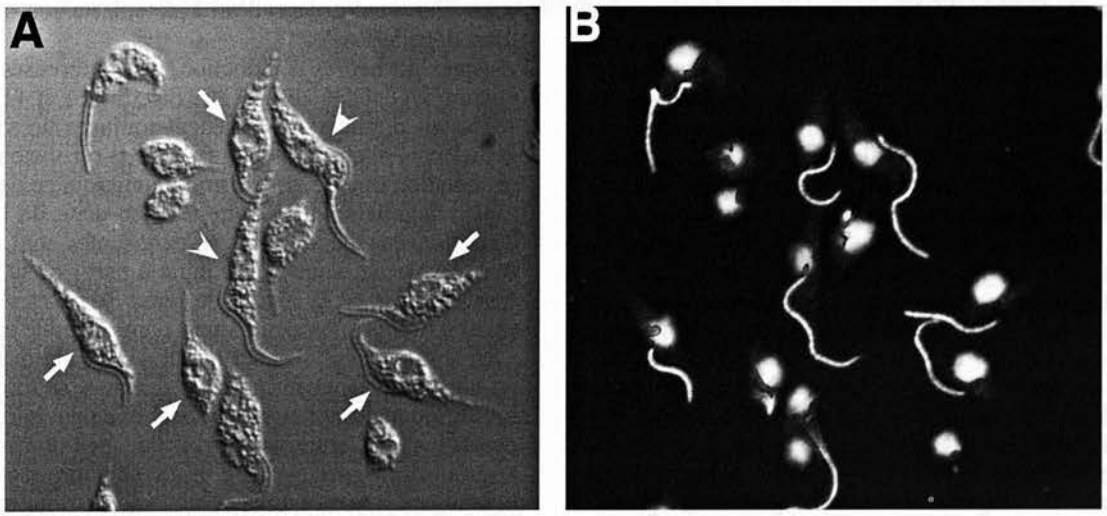

FIG. 4. – La longueur du flagelle contrôle la taille cellulaire. (A, B) Champ de trypanosomes (TbDHC1b) ARNi induits pendant 48 heures. Le flagelle a été marqué avec l'anticorps L8C4 (lignes blanches) et l'ADN avec le DAPI (cercles blancs). (A) image DIC, (B) image combinée de fluorescence. Les cellules avec un flagelle plus court apparaissaient plus petites (flèches) que les cellules avec un flagelle normal (têtes de flèche).

corps cellulaire est aussi plus petit. Afin d'évaluer si cette réduction affecte de la même façon toutes les parties du corps cellulaire, nous avons mesuré les distances de l'extrémité antérieure de la cellule au noyau, du noyau au kinétoplaste et du kinétoplaste à l'extrémité postérieure des mêmes cellules qu'auparavant. Ces mesures ont montré que la réduction en taille était causée majoritairement par une réduction dans la distance entre l'extrémité antérieure de la cellule et le kinétoplaste, c'est-à-dire la zone où le flagelle est attaché. Par contre, la distance entre le kinétoplaste et l'extrémité postérieure de la cellule n'était pas modifiée. Cette corrélation inattendue suggère que l'élongation du flagelle contrôle la taille cellulaire.

Afin de comprendre comment la longueur du flagelle pourrait être impliquée dans ce processus, nous nous sommes intéressés à la cellule-mère dont sont dérivés les trypanosomes plus courts. Les trypanosomes se divisent par fission binaire après avoir répliqué corps basaux, kinétoplastes, FAZ et flagelles et avoir subi la mitose nucléaire (voir plus bas pour une description complète du cycle cellulaire). Une hypothèse simple pour expliquer la taille plus petite observée chez les cellules avec des flagelles plus courts serait de postuler que l'élongation du nouveau flagelle est nécessaire à la croissance cellulaire normale à l'extrémité postérieure. Dans ces conditions, l'extrémité postérieure de la cellule mère serait trop courte et la cellule fille héritant du nouveau flagelle serait trop petite. Pour évaluer cette possibilité, nous avons mesuré la taille du corps cellulaire et la longueur du nouveau flagelle dans des trypanosomes avec 2 noyaux de lignées (TbDHC1b) ARNi et (TbIFT88) ARNi, soit non-induites, soit induites pendant 24 ou 48 heures. Ces données montrent que malgré la production de nouveaux flagelles de plus en plus courts (et finalement pas de nouveau flagelle du tout), l'élongation de la cellule mère avait lieu normalement pour atteindre ~ 25 µm. Par conséquent l'élongation cellulaire à l'extrémité postérieure n'est pas modifiée dans les lignées induites (TbDHC1b) ARNi et (TbIFT88) ARNi et n'explique donc pas les résultats observés.

Une deuxième possibilité pour expliquer la taille plus petite des cellules avec un flagelle trop court est que ce soit l'extrémité du nouveau flagelle qui détermine la position du clivage de la cellule. Dans ces conditions, le clivage de la cellule serait « trop postérieur », produisant une cellule-fille plus petite avec un nouveau flagelle court et, comme l'élongation cellulaire a eu lieu normalement, une cellule fille plus grande ayant hérité du vieux flagelle (de longueur normale). Pour évaluer cette possibilité, nous avons réexaminé les mesures de taille cellulaire et de longueur de flagelle de 100 cellules uniflagellées des lignées (TbDHC1b) ARNi et (TbIFT88) ARNi, soit non-induites, soit induites pendant 24 ou 48 heures, décrites auparavant. Il est spectaculaire de constater que la taille de la cellule héritant du vieux flagelle (celui de longueur normale) augmente progressivement au cours de l'induction. Ceci favorise l'hypothèse que l'extrémité du nouveau flagelle définit la taille cellulaire en précisant le positionnement de l'initiation de la cytokinèse.

Les trypanosomes sont des organismes parasites, avec un cycle de vie complexe où ils alternent entre un insecte vecteur et un hôte mammifère. Suite à ces changements d'environnement, les trypanosomes doivent s'adapter et activent des programmes stricts de différentiation (Matthews, 1999). Ces étapes de différentiation sont accompagnées par des modulations de la taille et de la forme cellulaire (Vickerman, 1985) et le flagelle suit ces changements de près (Van den Abbeele *et al.*, 1999 ; Tyler *et al.*, 2001). Il est tentant de spéculer que la régulation de la quantité de particules IFT fonctionnelles pourrait servir à contrôler la longueur flagellaire et, par là, la taille cellulaire.

Dans ces conditions, il est surprenant de trouver que les cellules non flagellées puissent se former, étant donné que le nouveau flagelle apparaît essentiel pour la division cellulaire. Pour comprendre comment ces cellules non flagellées sont nées, nous avons tout d'abord examiné le cycle cellulaire normal du trypanosome (Fig. 5A-C). Les cellules qui sont au début de leur cycle possèdent un corps basal mature (soutenant le flagelle) et un pro-corps basal, un seul flagelle et un FAZ associé, un seul kinétoplaste et un seul noyau (Fig. 5A). Les corps basaux se dupliquent en premier, suivis par la réplication et la ségrégation du génome mitochondrial (Sherwin & Gull, 1989a). Le nouveau corps basal et le kinétoplaste associé migrent vers l'extrémité postérieure de la cellule qui augmente en longueur. Un nouveau FAZ est assemblé, vraisemblablement nucléé à partir de la région du corps basal, précédant la formation du nouveau flagelle (Kohl *et al.*, 1999). Le corps basal postérieur mature soutient le nouveau flagelle qui s'allonge vers l'extrémité antérieure de la cellule (Fig. 5B). Le FAZ est aussi allongé à ce stade, suivant le chemin du nouveau flagelle. Ensuite, la mitose a lieu et le noyau le plus postérieur migre entre les deux kinétoplastes (Fig. 5C). La cytokinèse est initiée à partir de l'extrémité antérieure et procède d'une façon hélicoïdale pour donner deux cellules filles, héritant chacune d'un seul noyau, d'un kinétoplaste/corps basal et d'un flagelle/FAZ.

Après 48 heures d'induction, de nombreuses cellules mutantes (TbDHC1b) ARNi (Fig. 5D-F) et (TbIFT88) ARNi en duplication possèdent toujours un vieux flagelle, mais aucun nouveau flagelle n'est visible, ni par observation directe, ni par immunomarquage de composantes flagellaires. Etonnamment, en dépit de l'absence d'un nouveau flagelle, ces trypanosomes sont capables d'assembler un court FAZ, initié à partir de la localisation attendue de la région du corps basal et s'étendant vers l'extrémité antérieure où sa pointe semble en contact avec le vieux FAZ. Toutefois ce FAZ est limité à environ un tiers de sa longueur normale. En plus, sa forme apparaît différente : au lieu de l'aspect ondulant harmonieux, observé chez les trypanosomes flagellés non induits, il apparaît droit, presque étiré. Cette structure a été immunomarquée par des anticorps monoclonaux qui reconnaissent le filament FAZ (Kohl *et al.*, 1999) (Fig. 5D-F) et les 4 microtubules spécialisés associés au FAZ (Gallo *et al.*, 1988), suggérant que la formation des deux structures est liée.

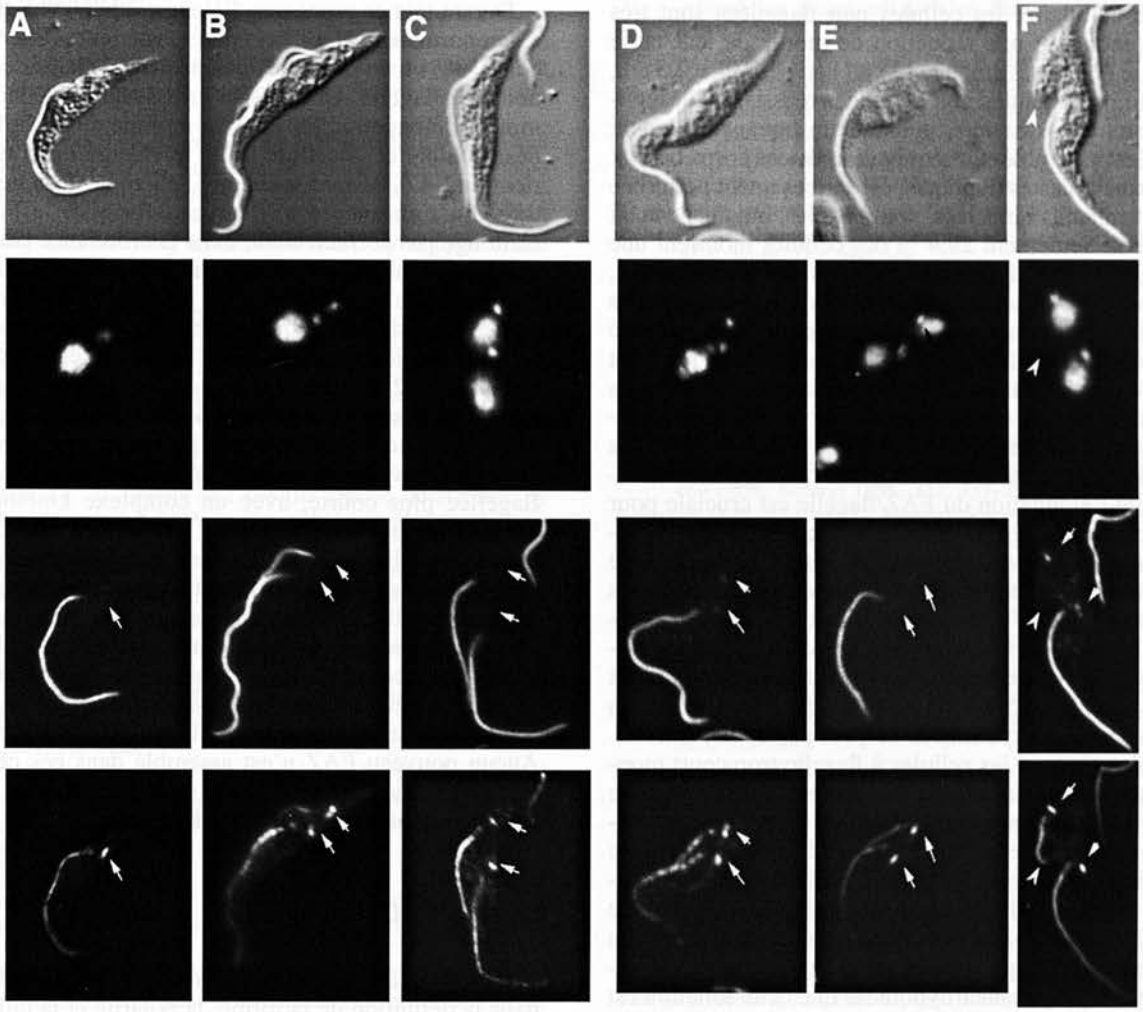

FIG. 5. – Le nouveau et le vieux flagelles sont indispensables pour la morphogenèse cellulaire. Cycle cellulaire de trypanosomes normaux, non induits (TbDHC1b) ARNi (A-C), ou après 48 heures d'induction (D-F). L'ADN a été marqué avec le DAPI (panneaux du haut), le flagelle avec l'anticorps L8C4 (milieu), le filament FAZ avec L6B3 (lignes) et le corps basal (points) avec BBA4 (bas).

Ces cellules passent par une mitose nucléaire apparemment normale, mais le noyau postérieur migre au delà du kinétoplaste/corps basal postérieur (Fig. 5E) au lieu d'être entre les 2 kinétoplastes/corps basaux (comparer avec Fig. 5C). Les mesures cellulaires ont montré que la position du noyau est correcte par rapport à l'extrémité postérieure, mais que la ségrégation des kinétoplastes/corps basaux (flèches) était souvent incomplète. La distance interkinétoplastes dans des cellules binucléées sans nouveau flagelle est de 2,67 ± 0,46 µm pour les mutants (TbDHC1b) ARNi (n = 40) au lieu de 5,33 ± 0,47 µm (n = 101) dans les cellules binucléées non induites normales. Comme cela a été mentionné précédemment pour des cellules assemblant un flagelle court, l'élongation du corps cellulaire du côté postérieur a lieu normalement. De telles cellules se divisent pour donner deux types de cellules-filles : l'une courte et non-flagellée, avec un petit FAZ limité et l'autre, apparemment normale et flagellée. L'extrémité antérieure du nouveau FAZ court est toujours positionnée au point d'initiation du sillon de clivage (indiqué par des têtes de flèches sur les figures 5F). Ces résultats montrent que, même en absence du nouveau flagelle, la formation du nouveau FAZ peut être initiée, mais son élongation ne peut pas procéder complètement. Toutefois, ces cellules peuvent se diviser, suggérant que l'extrémité du FAZ pourrait être le déterminant critique pour l'initiation de la division cellulaire.

LA FORMATION DES STRUCTURES FAZ EST INDISPENSABLE POUR LA SÉGRÉGATION DES CORPS BASAUX ET LA CYTOKINÈSE

Nous avons ensuite cherché à savoir si les trypanosomes non flagellés, non polaires, avec seulement un FAZ court peuvent ré-entrer dans le cycle cellulaire et se diviser. En accord avec le rôle du flagelle dans le contrôle de

la taille cellulaire, les cellules non flagellées sont très petites, montrant une réduction de moitié de leur taille cellulaire (9,8 ± 2,2 µm, n = 121 au lieu de 19,4 ± 2,5 µm, n = 106). Les cellules non flagellées réussissent à dupliquer leurs corps basaux, mais aucun nouveau filament FAZ n'est assemblé. La ségrégation de ces corps basaux et des kinétoplastes dupliqués est sérieusement perturbée chez les mutants binucléés, non flagellés, induits pendant 72 heures. Seulement 28,4 % des cellules montrent une ségrégation nette des corps basaux et des kinétoplastes, alors que 57,4 % séparent leurs corps basaux, mais sans migration, possédant un seul, gros kinétoplaste coincé entre eux. Les 14,2 % de cellules restantes ne séparent ni leur corps basaux, ni leurs kinétoplastes. Ces données peuvent être mises en corrélation avec la mauvaise ségrégation des corps basaux/kinétoplastes observée lors de la formation des cellules non flagellées et suggèrent fortement que l'élongation du FAZ/flagelle est cruciale pour ce processus de ségrégation. Si ces cellules non flagellées sont capables de compléter la mitose nucléaire, elle ne réussissent toutefois pas à se diviser. Ces résultats démontrent que la présence du vieux flagelle est indispensable pour la formation d'un nouveau FAZ (des cellules avec un vieux flagelle pouvaient produire un court FAZ, voir figures 5D-F) et révèlent qu'en absence d'un nouveau FAZ, la cytokinèse ne peut pas avoir lieu.

Les données sur les cellules à flagelle trop court montrent que l'extrémité distale du nouveau flagelle marque le point d'initiation de la cytokinèse. Toutefois, des trypanosomes binucléés sans nouveau flagelle, mais avec un ancien, sont toujours capables de se diviser et de former une cellule flagellée et une cellule non-flagellée (Fig. 5D-F). Ceci démontre que la présence du nouveau flagelle seul n'est pas responsable de l'initiation du clivage. Nous proposons l'hypothèse que cette fonction est en fait remplie par le FAZ. Dans toutes les cellules sans un nouveau, mais avec un vieux flagelle, un nouveau FAZ est toujours formé, mais il est beaucoup plus court. L'extrémité de cette structure est toujours en contact avec le vieux FAZ (Fig. 5D,E). Quand de telles cellules sont observées aux stades précoces de cytokinèse, l'extrémité antérieure du FAZ est toujours positionnée à l'endroit où le clivage semblait être initié (Fig. 5F).

La contribution du flagelle et des structures associées (FAZ et FC) à la morphogenèse et au cycle cellulaire peut être résumée dans le modèle de travail suivant. D'abord le corps basal est dupliqué (Sherwin & Gull, 1989a) et un nouveau FAZ est assemblé, préalablement à la sortie du flagelle de la poche flagellaire (Kohl *et al.*, 1999). Ces étapes sont indépendantes de la formation d'un nouveau flagelle, comme cela est illustré chez les mutants (TbDHC1b) ARNi et (TbIFT88) ARNi qui possèdent un vieux, mais pas un nouveau flagelle (Fig. 5D-F). Ensuite, le flagelle s'allonge et d'une façon ou d'une autre entraîne l'élongation du FAZ. A partir de ce moment du cycle cellulaire, la croissance du FAZ est contrôlée par celle du flagelle. Lors de son élongation, le FAZ pourrait participer aussi à la ségrégation des corps basaux. En l'absence d'un nouveau flagelle, le FAZ est beaucoup plus court et la ségrégation des corps basaux moins efficace.

Durant tout ce processus, l'élongation du cytosquelette a lieu normalement à l'extrémité postérieure (Sherwin & Gull, 1989b), un processus indépendant de la présence du nouveau flagelle. Une fois la croissance flagellaire terminée, l'élongation du FAZ se termine aussi, le FC est désassemblé et la cellule initie le clivage du côté antérieur du FAZ, suivant le chemin hélicoïdal de cette structure. En l'absence d'un nouveau flagelle, le FAZ ne s'allonge pas correctement, mais la croissance cellulaire continue, la mitose nucléaire a lieu et le noyau postérieur migre dans la position normale par rapport à l'extrémité postérieure, suggérant que ces étapes sont indépendantes de la formation du flagelle. A cause de leur migration réduite, les 2 complexes kinétoplaste/corps basal sont maintenant coincés entre les 2 noyaux. La présence d'un court FAZ semble suffisante pour initier la division. Quand le clivage a lieu, il produit une cellule-fille non flagellée plus courte, avec un complexe kinétoplaste/corps basal très près du noyau, et une cellule-fille plus longue, flagellée avec une extrémité postérieure excessivement longue. Le FAZ pourrait aussi être impliqué dans la polarité cellulaire, étant donné que les cellules non flagellées montrent une perte rapide de polarité et d'organisation. La cellule-fille non flagellée peut dupliquer son complexe kinétoplaste/corps basal, mais ces organites sont peu ou pas ségrégés et les cellules ne se divisent pas. Aucun nouveau FAZ n'est assemblé dans ces cellules, suggérant que la présence du vieux flagelle est indispensable pour la formation du FAZ.

CONCLUSION

Nos résultats démontrent un rôle crucial du flagelle dans la définition de la forme, la polarité et la taille cellulaire, de même que dans l'initiation de la cytokinèse et la ségrégation des corps basaux. La modulation de la longueur du flagelle *via* l'IFT pourrait représenter une façon originale de contrôler la taille et la forme cellulaire, comme cela est suggéré par les variations des ces paramètres au cours du cycle biologique du trypanosome. Le rôle du flagelle dans la morphogenèse cellulaire est probablement accompli par la formation associée de la structure FAZ (filament FAZ et 4 microtubules associés). Comprendre comment ces éléments du cytosquelette sont assemblés et contrôlés va certainement révéler davantage de caractéristiques cellulaires intrigantes.

Remerciements. – Nous souhaitons remercier K. GULL, M. FIELD et P. GRELLIER pour nous avoir fourni différents anticorps, P. ENGLUND pour le plasmide pZJM, G. CROSS pour la lignée 29-13, C. WALSH et H. NGÔ pour des discussions utiles au sujet de la biologie cellulaire des protistes et E. CHARLIER pour l'assistance technique. Nous sommes reconnaissants à M. GEZE et M. DELLINGER pour leur aide en microscopie dans les étapes précoces de ce travail. Le séquençage de *Trypanosoma brucei* a été réalisé à TIGR et à l'Institut Sanger avec le support de NIAID et du Wellcome Trust, respectivement. Ce travail a été financé par des bourses ATIPE du CNRS et par « Aides à l'Implantation de Nouvelle Équipes » attribuées par la Fondation pour la Recherche Médicale.

BIBLIOGRAPHIE

Bastin P., Ellis K., Kohl L. & Gull K., Flagellum ontogeny studied *via* an inherited and regulated RNA interference system. *J. Cell Sci.*, 2000a, *113*, 3321-3328.

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

Bastin P., Pullen T. J., Sherwin T. & Gull K., Protein transport and flagellum assembly dynamics revealed by analysis of the paralysed trypanosome mutant snl-1. *J. Cell Sci.*, 1999a, *112*, 3769-3777.

Bastin P., Sherwin T. & Gull K., Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature*, 1998, *391*, 548.

Durand-Dubief M., Kohl L. & Bastin P., Efficiency and specificity of RNA interference generated by intra- and intermolecular double stranded RNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2003, *129*, 11-21.

Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. & Mello C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, *391*, 806-811.

Gallo J. M., Precigout E. & Schrevel J., Subcellular sequestration of an antigenically unique β-tubulin. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 1988, *9*, 175-183.

Gull K., The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999, *53*, 629-655.

Kohl L., Durand-Dubief M. & Bastin P., Genetic inhibition of intraflagellar transport in trypanosomes. *Mol. Biol. Cell*, 2001, *12*, 445a.

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

Kozminski K. G., Beech P. L. & Rosenbaum J. L.,The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J. Cell Biol.*, 1995, *131*, 1517-1527.

Kozminski K. G., Johnson K. A., Forscher P. & Rosenbaum J. L., A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, *90*, 5519-5523.

Marshall W. F. & Rosenbaum J. L., Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J. Cell Biol.*, 2001, *155*, 405-414.

Matthews K. R., Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today*, 1999, *15*, 76-80.

McKean P. G., Baines A., Vaughan S. & Gull K., γ-Tubulin functions in the nucleation of a discrete subset of microtubules in the eukaryotic flagellum. *Curr. Biol.*, 2003, *13*, 598-602.

Moreira-Leite F. F., Sherwin T., Kohl L. & Gull K., A trypanosome structure involved in transmitting cytoplasmic information during cell division. *Science*, 2001, *294*, 610-612.

Morgan G. W., Allen C. L., Jeffries T. R., Hollinshead M. & Field M. C., Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.*, 2001, *114*, 2605-2615.

Pazour G. J., Dickert B. L., Vucica Y., Seeley E. S., Rosenbaum J. L., Witman G. B. & Cole D. G., *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, Polycystic Kidney Disease gene Tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.*, 2000, *151*, 709-718.

Pazour G. J., Dickert B. L. & Witman G. B., The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J. Cell Biol.*, 1999, *144*, 473-481.

Porter M. E., Cytoplasmic dynein heavy chain 1β is required for flagellum assembly in *Chlamydomonas*. *Mol. Biol. Cell*, 1999, *10*, 693-712.

Robinson D. R. & Gull K., Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature*, 1991, *352*, 731-733.

Robinson D. R., Sherwin T., Ploubidou A., Byard E. H. & Gull K., Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J. Cell Biol.*, 1995, *128*, 1163-1172.

Rosenbaum J. L. & Witman G. B., Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2002, *3*, 813-825.

Sherwin T. & Gull K., The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 1989a, *323*, 573-588.

Sherwin T. & Gull K., Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell*, 1989b, *57*, 211-221.

Silflow C. D. & Lefebvre P. A., Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 2001, *127*, 1500-1507.

Tyler K. M., Matthews K. R. & Gull K., Anisomorphic cell division by African trypanosomes. *Protist*, 2001, *152*, 367-378.

Van Den Abbeele J., Claes Y., van Bockstaele D., Le Ray D. & Coosemans M., *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology*, 1999, *118*, 469-478.

Vaughan S. & Gull K., The trypanosome flagellum. *J. Cell Sci.*, 2003, *116*, 757-759.

Vickerman K., Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br. Med. Bull.*, 1985, *41*, 105-114.

Wang Z., Morris,J. C., Drew M. E. & Englund P. T., Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275*, 40174-40179.