



HAL
open science

Régulations génétique et moléculaire par ARN interférence chez *Trypanosoma brucei*

Mickaël Durand-Dubief

► **To cite this version:**

Mickaël Durand-Dubief. Régulations génétique et moléculaire par ARN interférence chez *Trypanosoma brucei*. Biochimie [q-bio.BM]. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2005. Français. NNT: . tel-00202018

HAL Id: tel-00202018

<https://theses.hal.science/tel-00202018>

Submitted on 3 Jan 2008

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 de doctorat
du Muséum National d'Histoire Naturelle

Présentée par :

Mickaël DURAND-DUBIEF

Pour obtenir le grade de :

Docteur du Muséum National d'Histoire Naturelle
Spécialité : Génétique Moléculaire

**Régulations génétique et cellulaire
par ARN interférence chez *Trypanosoma brucei***

Soutenue le 7 mars 2005

Directeur de thèse :

Dr. Philippe BASTIN

Jury :

Pr. Thérèse GARESTIER-HÉLÈNE
Dr. Christophe ANTONIEWSKI
Dr. Frédéric BRINGAUD
Dr. Évelyne FRIEDERICH
Dr. Annick HAREL-BELLAN

Président
Examineur
Rapporteur
Examineur
Rapporteur

« APRÈS » PROPOS

Avant tout, je souhaite dire que ces premières années de recherche m'ont absolument captivé et surtout amusé !

Depuis mon enfance, je souhaitais devenir un chercheur comme mes vénérés Hubert Reeves et Théodore Monod, mais à vrai dire... Je ne savais pas dans quel domaine, trop de choses me plaisaient. Ce ne fut par la suite qu'au lycée que mes réelles compétences et donc mes attraits se révélèrent. J'étais médiocre (et très paresseux) en mathématiques, la physique et la chimie se montrèrent captivantes mais trop rigoureuses à mon goût (malgré mon adoration pour l'astrophysique et la physique quantique). Bref, le hasard de ma naissance me donna un peu plus de facilité dans les Sciences du Vivant... Après de nombreux combats contre moi-même et mes aptitudes, dans une rigueur souvent chancelante, j'ai enfin été secouru par de bons Saint Bernard et Saint Albert le Grand (Patron de la Science) bien décidés à me sauver !

Oh joie ! Surprise et fascination pour un néophyte, d'apercevoir et de tenter de comprendre le fonctionnement de la Vie sous toutes ses formes ! J'ai pris et je continue à prendre de nombreuses notes sur les us et coutumes de ces petites et grandes sociétés qui, à mon avis, se ressemblent en beaucoup de points... À vrai dire, malgré des difficultés de toutes sortes, je crois que je ne regrette vraiment rien de la marche entreprise pour vivre une passion : Étudier le Vivant...

Pour finir ce petit bilan personnel (assez positif finalement), je tiens absolument à donner la citation rituelle de tout bon manuscrit de thèse d'un grand scientifique :

« Il n'y a pas de contribution à la Physique digne de ce nom qui ne traduisent également le désir de fuir la compagnie de ses semblables vers la vérité d'une réalité qui transcende les passions et les déceptions humaines »

Albert Einstein

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux Docteurs Frédéric Bringaud et Annick Harel-Bellan pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie également Madame le professeur Thérèse Garestier-Hélène et les Docteurs Evelyne Friederich, Philippe Bastin et Christophe Antoniewski qui m'ont fait l'honneur d'être les membres du jury en tant qu'examineurs.

Je remercie le Grand-Duché du Luxembourg et le Ministère de la Recherche du Luxembourg pour avoir financé cette thèse. Je remercie également Evelyne Friederich pour avoir collaboré scientifiquement dans ces travaux et suivi la progression de cette thèse.

Je remercie sincèrement Madame le professeur Thérèse Garestier-Hélène et le professeur Claude Hélène pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire qui ont su me montrer leur rigueur et leur droiture. Je remercie Carine Giovannangeli et Jian Sheng Sun pour avoir dirigé le laboratoire durant ma thèse.

Je tiens à remercier vivement mon maître, tuteur et ami Philippe Bastin qui a su me transmettre avec une extrême patience les bases essentielles pour devenir un scientifique de qualité. Encore merci de ta passion des sciences, de tes grandes qualités humaines et de tes enseignements si précieux dans ce monde parfois si difficile.

Merci à l'intrépide Michaël pour ton amitié sincère et ta détermination sans faille qui m'ont vraiment aidé dans les moments difficiles... Merci également pour ces conversations fumantes et caféinées au labo mais également enflammées, alcoolisées et ruineuses aux bars du coin où nous avons pu refaire le monde et la Science...

Merci à la merveilleuse Carole pour ton amitié et ta rafraîchissante compagnie. Pour ces brises de bonheur et de légèreté au coin d'un couloir, au coin d'une paillasse. Et également pour ces coups de sang brefs comme l'éclair et ces petits cafés amicaux...

Merci au vieux sage du labo, ce cher Jean. Ce vieil ours grincheux, reclus dans sa tanière de silice, qui m'a donné son amitié, sa confiance et ses encouragements dès mon arrivée au laboratoire.

Merci aussi à Bénédicte pour sa force tranquille et sa détermination ; et Maria pour sa charmante et énergique compagnie.

Je remercie la « sectarium » : Lionel, Samir, Anne, Patrizia, Rosalie et Erika avec qui j'ai bien rigolé et à leurs éminents gourous : Le calife Jean-Louis et son grand vizir Laurent.

Merci à Linda pour ses coups de mains, sa patience, sa bonne humeur et sa participation dans notre collaboration avec le Luxembourg, à Sacha pour ses bonnes histoires et ses blagues russes, à Karine pour sa compagnie chaleureuse et sa gentillesse...

Merci au secrétariat, aux courageuses Catherine, Fara, Shenaz, Corine ; à Evelyne pour les coups de mains, de gueules et son caractère passionné, à Bernard pour tous ces coups de tournevis et les bonnes papottes, à François pour ses enseignements scrupuleux et intrusifs dans « l'art du western », à l'intuitive Masashi que m'a permis de l'approcher et de mieux la connaître, à Loïc et Catherine pour leurs aides et tentatives d'organisation sans faille du grand labo, à Sabrina pour sa participation dans les études de la surexpression des transposons dans les lignées pZJM, à Filipo pour le projet de complémentarité fonctionnelle.

Merci aussi à tous les membres du laboratoire de Biophysique : Christophe, Tula, Christine, Paola, Danièle, Kahina, Gildas, Danielle, Erwan, Nadia, Ludovic, Lionel, Jean-Christophe, David et les autres...

Je remercie également Klaus Ersfeld et Keith Gull pour avoir fourni les anticorps KMX et anti-HMG, George Cross et Christine Clayton pour avoir fourni la lignée 29-13 et Paul Englund pour le plasmide pZJM.

Merci aux stagiaires qui m'ont beaucoup appris et aidé : Ma chère Sandra, Lionel, Helena et Julia.

Merci aussi à Sétha Douc-Rasy, Etienne Blanc et Jean Benard pour m'avoir accueilli dans mes premiers pas en Science, pour leur gentillesse et leurs encouragements...

Merci à mes amis qui m'ont supporté durant ma thèse : Chrystèle, Brun's & Sophie, Zinoo & Jenny, Ben & Violaine, Caro, François, Pierre, Romain, Gaël, Greg, Gautier, Antoine, Nico et les autres...

Je remercie avec toute ma reconnaissance, ma mère qui m'a donné tous les bagages pour affronter une vie que j'aime et mes frères et sœur : Doudou, Xixi et Nounette pour m'avoir soutenu dans cette aventure

Enfin merci à la femme que j'aime. À toi Céline, qui me donne les ailes du bonheur, qui m'apporte la paix et l'équilibre, tout ce qu'il me faut pour vivre cette vie de passionné ...

TABLE DES MATIERES

ABRÉVIATIONS.....	2
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	6
I. INTRODUCTION.....	8
I.A L'ARN interférence.....	10
I.A.1. Découverte de l'ARN interférence.....	10
I.A.1.a Extinction post-transcriptionnelle chez les plantes.....	10
I.A.1.b L'extinction des gènes : fantôme ou réalité ?.....	10
I.A.2. VIGS (« Virus-Induced Gene Silencing »).....	11
I.A.3. « Quelling » chez les champignons.....	11
I.A.4. Interférence chez les animaux.....	12
I.A.5. Caractéristiques de l'ARN interférence.....	13
I.A.5.a Les petits ARN interférents (siARN) effecteurs de l'extinction des ARN.....	13
I.A.5.b Les microARN.....	16
I.A.5.c Les ribonucléases Dicer et Drosha.....	18
I.A.5.d Les protéines de la famille Argonaute.....	21
I.A.5.e Les ADN et ARN hélicases.....	24
I.A.5.f Protéines impliquées dans l'amplification et transmission du phénomène.....	26
I.A.5.g Autres protéines impliquées dans l'ARNi.....	28
I.A.6. Fonctions de l'ARN interférence.....	29
I.A.6.a Régulation des gènes par les microARN.....	29
I.A.6.b Régulation transcriptionnelle et interaction avec la chromatine.....	31
I.A.7. Applications en génomique fonctionnelle.....	41
I.A.8. Applications thérapeutiques.....	42
I.B Le trypanosome africain.....	46
I.B.1. L'ordre des Kinétoplastidés.....	46
I.B.2. Le trypanosome africain.....	47
I.B.2.a L'agent responsable de la maladie du sommeil.....	47
I.B.2.b Répartition géographique de la maladie.....	48
I.B.2.c Symptômes de la maladie.....	49
I.B.2.d Trypanosomiase animale et réservoir animal.....	50
I.B.2.e Cycle du parasite.....	51
I.B.3. Caractéristiques cellulaires et moléculaires des trypanosomes.....	52
I.B.3.a Une cellule eucaryote sophistiquée.....	52
I.B.3.b Structure générale.....	53
I.B.3.c Cycle cellulaire.....	55
I.B.3.d Génomes.....	58
I.B.3.e Régulations génétiques.....	63
I.C Présentation générale de la thèse.....	76
I.C.1. L'ARNi dans son contexte en 2001.....	76
I.C.2. Objectif de la thèse.....	77
II. RÉSULTATS.....	78
II.A L'ARNi et la génomique fonctionnelle.....	80
II.A.1. Etude de la spécificité et de l'efficacité de l'ARNi chez le trypanosome.....	80
II.A.1.a Résumé de l'article.....	80
II.A.1.b Article.....	82
II.A.2. Complémentation fonctionnelle de mutants ARNi.....	84
II.A.2.a Résumé de l'article.....	84
II.A.2.b Article.....	86
II.B Protéines impliquées dans l'ARN interférence.....	90
II.C L'ARNi et la mitose.....	96
II.C.1. La protéine Argonaute est impliquée dans la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes.....	96
II.C.1.a Résumé de l'article.....	96
II.C.1.b Article.....	98
II.C.2. Rôles distincts de la protéine Argonaute TbAGO1 et dans la mitose et le contrôle des transcrits de rétrovirus.....	100
II.C.2.a Introduction.....	100
II.C.2.b Résultats.....	102

II.D	<i>Interactions machinerie ARNi et rétroposons</i>	122
II.D.1.	L'absence de TbAGO1 affecte le profil d'expression des rétroposons RIME	122
II.D.2.	Les rétroposons ingi produisent deux classes de transcrits	124
II.D.3.	TbAGO1 contrôle l'expression des gènes <i>RHS1</i>	126
II.D.4.	Extinction par ARN interférence dans le noyau	128
II.D.5.	Conséquences d'expression d'ARN non épissés sur l'expression des rétroéléments	134
III.	DISCUSSION	142
III.A	<i>ARNi et génomique fonctionnelle</i>	142
III.B	<i>Composantes de l'ARNi</i>	144
III.C	<i>ARNi et mitose</i>	148
III.D	<i>ARNi et transposons</i>	152
III.E	<i>Conclusion</i>	162
IV.	MATERIELS & METHODES	166
IV.A	<i>Matériels</i>	166
IV.A.1.	Lignées cellulaires	166
IV.A.1.a	La souche <i>T. brucei</i> 427	166
IV.A.1.b	La lignée 29-13	166
IV.A.1.c	La lignée <i>snl-2</i>	167
IV.A.2.	Le vecteur pZJM	167
IV.B	<i>Méthodes</i>	168
IV.B.1.	Culture cellulaire	168
IV.B.2.	Transfections par électroporation	168
IV.B.2.a	Stable	168
IV.B.2.b	Transitoire	168
IV.B.3.	Western Blot	169
IV.B.3.a	Préparation des échantillons protéiques	169
IV.B.3.b	Migration, transfert sur membrane et détection	169
IV.B.4.	Immunofluorescence	170
IV.B.4.a	Généralités	170
IV.B.4.b	Fixation au méthanol	170
IV.B.4.c	Fixation au formaldéhyde	170
IV.B.4.d	Fluorescence Assay Cell Sorting (FACS)	171
IV.B.5.	Southern Blot	171
IV.B.6.	Northern Blot	171
IV.B.7.	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridisation (FISH)	172
IV.B.7.a	Principe	172
IV.B.7.b	FISH avec une sonde Peptide Nucléique Acide (PNA)	172
IV.B.7.c	FISH avec une sonde ADN	173
IV.B.7.d	IF & ADN-FISH	173
V.	BIBLIOGRAPHIE	177
VI.	ANNEXES	199

Abréviations

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
B-ES	« Bloodstream Expression Site » ou site d'expression des VSG au stade sanguin
M-ES	« Metacyclic Expression Site » ou site d'expression des VSG au stade métacyclique
DAPI	4', 6-Diamino-2-phenylindole
IF	Immunofluorescence
FISH	Fluorescence par hybridation <i>in situ</i>
GFP	« Green Fluorescent Protein » ou protéine fluorescente verte
kb	Kilobase
Mb	Mégabase
miARN	microARN
NLS	« Nuclear Localisation Signal » ou signal de localisation nucléaire
PBS	« Phosphate Buffer Saline » ou tampon phosphate salin
PFRA	« Paraflagellar Rod A » ou fibre paraflagellaire A
PCR	« Polymerase Chain Reaction » ou réaction de polymérisation en chaîne
PTGS	« Post Transcriptional Gene Silencing » ou Extinction post-transcriptionnelle des gènes
SLACS	« spliced leader-associated conserved sequence »
siARN	« Short interfering RNA » ou petit ARN interférent
RIME	« Ribosomal Mobile Element »
RHS	« Retroposon Hot Spot » ou haut point de recombinaison
TGS	« Transcriptional Gene Silencing » ou extinction transcriptionnelle des gènes
scanARN	petits ARN « scanneurs »
VIGS	« Virus Induced Gene Silencing » ou extinction des gènes induite par un virus
VSG	« Variant Surface Glycoprotein » ou Glycoprotéine variable de surface

Durant ma thèse, j'ai eu la chance d'aborder un sujet particulièrement riche : l'implication de l'ARN interférence dans la biologie d'un organisme unicellulaire atypique : *Trypanosoma brucei*.

Après une brève introduction générale, nous aborderons la première partie de l'introduction résumant les caractéristiques du mécanisme de l'ARN interférence (ARNi) et dans la seconde partie, nous présenterons le trypanosome africain, modèle cellulaire que nous avons utilisé pour étudier l'ARNi. Les résultats seront présentés en quatre parties : une partie essentiellement technologique sur l'utilisation de l'ARNi chez *T. brucei*, la seconde partie développera l'étude des candidats potentiels impliqués dans l'ARNi chez le trypanosome. La troisième partie traitera des relations entre l'ARNi et la mitose. Enfin, la dernière partie développera l'implication de ce mécanisme dans le contrôle de l'expression des gènes et des rétroposons chez le trypanosome. Ce manuscrit se terminera par une discussion générale.

~

Introduction générale

Les premières traces de la découverte des acides nucléiques remontent à la fin du XIX^e siècle, le biochimiste suisse F. Miescher décrit en 1869 la nucléine, un composant phosphoré, principal constituant du noyau cellulaire. Bien plus tard en 1944, O. T. Avery démontre formellement que le stockage et la transmission des caractères héréditaires se réalisent par l'intermédiaire de l'acide désoxyribonucléique ou ADN. Puis en 1953, J. Watson, F. Crick et R. Franklin élucident la structure en double hélice de l'ADN.

En 1960, J. Monod et F. Jacob découvrent que la molécule d'ARN, le produit de l'ADN, est capable de transmettre l'information génétique du noyau vers le cytoplasme, où sont fabriquées les protéines. Quelques années plus tard, M. Nirenberg déchiffre en 1965, le code génétique. Grâce à ses travaux, les 20 acides aminés existants dans tous les organismes vivants peuvent être décryptés par l'enchaînement de 4 composés chimiques A, T, C et G (pour adénine, thymine, cytosine et guanine).

Au cours des dix dernières années, les génomes de nombreux organismes ont été complètement séquencés, et il s'avère qu'une grande proportion de l'ADN peut être transcrite en ARN non codants. Ces ARN non codants sont impliqués dans des mécanismes cellulaires très variés comme la traduction des protéines, la maturation des ARN, l'intégrité des chromosomes...

En 1998, A. Fire et C. Mello publient dans la revue Nature leur découverte sur le phénomène de l'ARN interférence (ARNi), un mécanisme capable d'interférer avec l'expression des ARN messagers. La découverte de ce mécanisme a donné une clé ouvrant la voie sur de nombreux et passionnants mécanismes du Vivant !

Aujourd'hui, il apparaît que l'ARN interférence est impliquée dans des mécanismes importants et variés comme le développement, la mitose, la résistance aux virus, le contrôle de l'ADN et de l'expression des gènes. De plus, l'ARN interférence ouvre des portes concrètes sur un important éventail de débouchés thérapeutiques...

Introduction

1^{ère} partie

L'ARN interférence

I.A L'ARN interférence

I.A.1. Découverte de l'ARN interférence

I.A.1.a Extinction post-transcriptionnelle chez les plantes

Chez les plantes, les premières découvertes sur l'extinction génique proviennent des recherches sur les fleurs de pétunias transgéniques. L'équipe de Jorgensen désirait augmenter la couleur pourpre des pétales de la fleur en surexprimant un gène codant pour la chalcone synthétase (*chsA*). Cette enzyme est impliquée dans la production des pigments pourpres d'anthocyanine. Ils furent surpris d'observer que certaines des pétunias, exprimant plusieurs copies du gène transgénique, présentaient une réduction voire une perte totale de la pigmentation des pétales indiquant une absence de l'activité chalcone synthétase (Napoli et al., 1990). Une analyse plus poussée du phénomène révèle une diminution dramatique de l'ARN messenger (ARNm) de *chsA* dans le cytoplasme sans que la transcription des gènes correspondants soit affectée (Napoli et al., 1990). Dans un premier temps, ce mécanisme induisant l'absence conjointe des ARNm endogènes et du transgène fut nommé la co-suppression. Ce mécanisme fut renommé extinction post-transcriptionnelle des gènes (« Post-Transcriptional Gene Silencing » ou PTGS).

I.A.1.b L'extinction des gènes : fantasme ou réalité ?

Comme beaucoup de grandes découvertes, l'idée de l'existence d'un mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle a mis un certain temps pour être acceptée par la communauté scientifique. En effet, un transgène fonctionnel qui ne s'exprime pas et provoque la diminution des ARNm de séquences homologues pouvait laisser perplexe bon nombre de chercheurs... Cependant, ces observations furent ensuite confirmées sur d'autres gènes impliqués dans des fonctions très diverses, ainsi que chez d'autres espèces de plantes, généralisant ce phénomène dans le monde végétal (Flavell, 1994; Matzke and Matzke, 1995)

Plus tard, plusieurs études montrèrent que l'initiation du PTGS chez les plantes est due à la formation d'ARNdb résistant aux ribonucléases, et provenant du transgène (Hamilton and Baulcombe, 1999; Metzloff et al., 1997; Pandolfini et al., 2003) qui pourrait initier le PTGS par la présence excessive d'ARN sens ou antisens.

I.A.2. VIGS (« Virus-Induced Gene Silencing »)

Un mécanisme apparenté au PTGS peut se produire également lors de l'infection de virus chez les plantes (Dougherty and Parks, 1995). Des lignées de plantes transformées par des transgènes d'ADNc viral sont capables d'inhiber l'accumulation de virus similaires ayant la séquence correspondante (Baulcombe, 1996; Lindbo et al., 1993). La résistance aux virus peut être immédiate si l'extinction post-transcriptionnelle du transgène est déjà activée. Dès lors, l'ARN viral est reconnu et dégradé rapidement, empêchant l'infection de plante par le virus.

Dans d'autres cas, certains virus peuvent infecter efficacement les plantes dotées du transgène exprimant leurs séquences virales. Pendant la prolifération virale, l'expression du transgène n'est pas affectée. Dans une seconde phase, le PTGS s'active dans tout l'organisme et dégrade spécifiquement l'ARN viral et transgénique. Les nouvelles feuilles en développement continuent à exprimer faiblement l'ARN transgénique, mais ne possèdent plus de particules virales et deviennent résistantes aux infections suivantes du même type de virus (Lindbo et al., 1993). Cette immunité acquise est à l'origine de l'hypothèse que le PTGS serait un mécanisme de défense naturelle contre les virus. Ainsi, les virus peuvent être des cibles du PTGS mais également des inducteurs (Vaucheret et al., 2001).

I.A.3. « Quelling » chez les champignons

Parallèlement, une observation similaire au PTGS a été effectuée chez le champignon *Neurospora crassa*. L'équipe de Macino tenta d'augmenter l'expression du gène *all* codant pour la phytoène désaturase. Cette enzyme transforme, par le biais d'intermédiaires de couleur orange, le phytoène en un caroténoïde: le lycopène (Rosati et al., 2000). En introduisant un plasmide codant pour une copie supplémentaire de *all*, plusieurs transformants montrèrent une atténuation voire une extinction totale de la couleur orange. Une analyse approfondie révèle une réduction significative de l'ARNm *all* sans que l'expression de son ARN non épissé soit affectée (Cogoni et al., 1996). Ce phénomène affectant l'ARNm mature fut appelé l'étouffement ou « quelling ».

I.A.4. Interférence chez les animaux

En 1998, Andrew Fire et ses collaborateurs décortiquent l'ARN interférence, un phénomène similaire au PTGS et au « quelling » chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Les premiers signes conduisant à cette découverte provenaient d'une approche par ARN antisens en vue d'inhiber la fonction d'un gène. Guo et Kemphues furent surpris de trouver que le contrôle ARN sens inactivait l'expression du gène ciblé aussi bien que l'ARN antisens (Guo and Kemphues, 1995). L'ambiguïté de ces résultats ne fut expliquée que quelques années plus tard...

L'induction de l'ARNi était due à l'introduction d'ARN double brin (ARNdb). Il démontra brillamment ce phénomène en ciblant plusieurs gènes par ARNdb : *unc-22*, *unc-54* et *hllh-1* (nécessaires à la mobilité), *fem-1* (requis pour la production du sperme) et le gène codant pour la protéine fluorescente GFP. D'autre part, il postula que les résultats d'autres équipes, utilisant un ARN simple brin antisens produisant un effet d'extinction, pouvaient être dûs à la présence d'ARNdb contaminant synthétisé *in vitro* (Fire et al. Nature 1998). Pour argumenter cette hypothèse, il purifia de l'ARN simple brin sens et montra que la présence de cet ARN simple brin n'induisait pas l'ARNi chez le nématode.

Par la suite, ce mécanisme fut démontré également dans d'autres organismes tel que le trypanosome africain (Bastin et al., 1998; Ngo et al., 1998), la paramécie (Galvani and Sperling, 2001; Ruiz et al., 1998), la drosophile (Kennerdell and Carthew, 1998), l'hydre (Lohmann et al., 1999) mais également chez les vertébrés comme le poisson-zèbre (Wargelius et al., 1999) et la souris (Svoboda et al., 2000; Wianny and Zernicka-Goetz, 2000).

1.A.5. Caractéristiques de l'ARN interférence

Les nombreuses études dans les organismes décrits ci-dessus montrent une forte convergence dans le fonctionnement de l'extinction des gènes, avec plusieurs éléments communs :

- 1- L'induction de l'extinction par de l'ARN double brin,
- 2- L'extinction dépendante de l'homologie entre la séquence de l'ARNdb et celle de l'ARN cible,
- 3- L'activation d'un complexe ribonucléoprotéique,
- 4- Une amplification et un maintien temporaire du phénomène au sein de la cellule, voire au niveau de l'organisme.

1.A.5.a Les petits ARN interférents (siARN) effecteurs de l'extinction des ARN

Une découverte essentielle fut effectuée au sein du laboratoire de David Baulcombe : la dégradation de l'ARN induite par le PTGS s'accompagne de la production d'ARN de petite taille («small interferent RNA » ou siARN). Ces siARN sont d'une longueur moyenne de 25 nucléotides correspondant aux séquences sens et antisens de l'ARN cible (Hamilton and Baulcombe, 1999). Les siARN produits par le mécanisme PTGS/ARNi/Quelling furent ensuite détectées dans de nombreuses autres d'espèces.

Les plus importantes découvertes furent réalisées chez l'insecte *Drosophila melanogaster* par une dissection approfondie du phénomène ARNi en utilisant des systèmes d'études *in vitro* et *in vivo*. Dans un système *in vitro* dérivé d'embryon de drosophile, l'introduction d'ARNdb entraîne la dégradation spécifique de l'ARNm correspondant en produisant des fragments d'ARN de 21 à 23 nucléotides. Thomas Tuschl et ses collaborateurs démontrèrent que ces siARN sont générés à partir du double brin d'ARN et suggérèrent que les siARN sont les éléments nécessaires pour guider le clivage de l'ARN cible (Elbashir et al., 2001b; Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Ces petits fragments d'ARN sont caractérisés par une extrémité dépassante hydroxylée en 3' de deux à trois nucléotides et avec une phosphorylation en 5' (5'-P) (Elbashir et al., 2001a).

Par ailleurs, le traitement de cellules de drosophile S2 en culture avec de l'ARNdb a permis de purifier une fraction active possédant l'activité d'extinction spécifique dégradant l'ARN cible. La fraction active purifiée perd son activité suite au traitement avec la nucléase de microcoque (ARN + ADN) mais pas après incubation avec la DNase, indiquant la présence indispensable d'ARN (Hammond et al., 2000). Cette fraction purifiée ayant une activité ribonucléase spécifique fut appelée RISC (pour « RNA-Induced Silencing Complex »). Une analyse plus poussée démontre que ce complexe ribonucléoprotéique, faisant 500kDa, cofractionne avec des ARN d'une taille de 25 nucléotides dérivant de la séquence de l'ARNdb introduit (Hammond et al., 2000). Ces résultats suggèrent donc que les petits ARN associés au complexe guident la nucléase pour permettre la reconnaissance spécifique de l'ARN cible (**figure 1**)(Elbashir et al., 2001a).

En résumé :

- (a) les longs fragments d'ARNdb sont découpés en petits ARNdb de 21-23pb par une ribonucléase spécifique de l'ARNdb, Dicer ;
- (b) les siARN guident un complexe protéique contenant l'activité enzymatique RISC, vers le substrat *via* un appariement du brin siARN antisens à l'ARNm induisant sa dégradation.

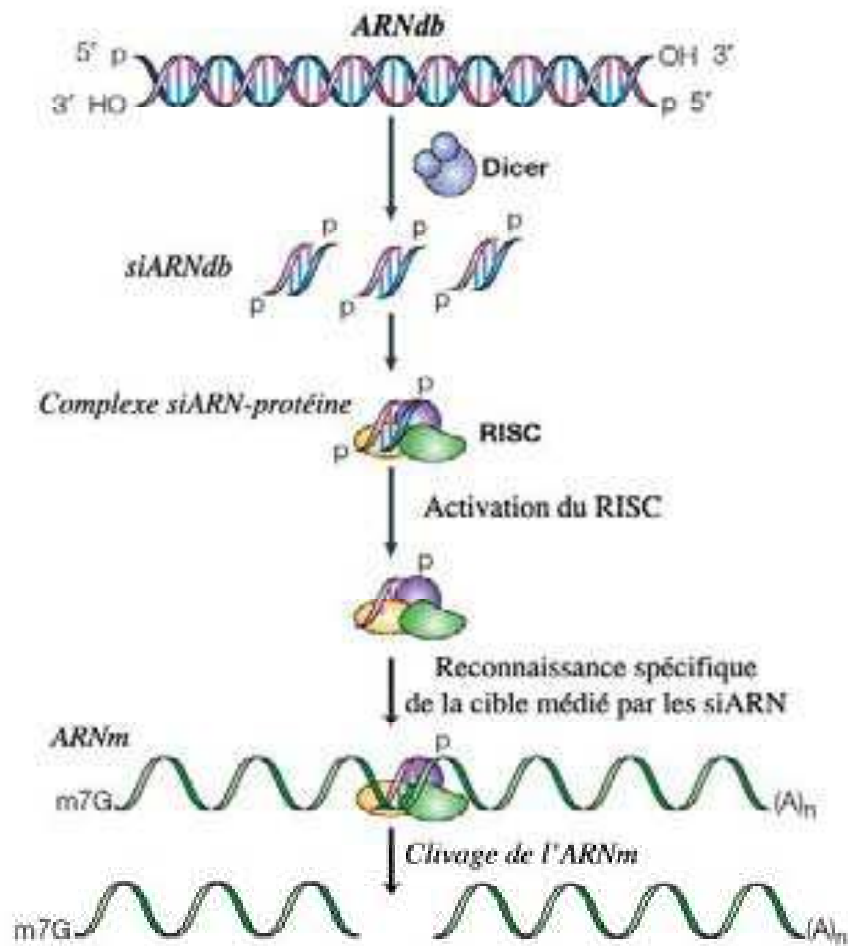


Figure 1

Représentation schématique de la voie ARN interférence

L'ARNdb est fragmenté en siARN par la ribonucléase Dicer. Les siARN sont ensuite pris en charge par le complexe RISC. L'activation du complexe RISC permet la dégradation spécifique de l'ARN correspondant guidé par le siARN (Adaptée de Dykxhoorn et al. 2003).

1.A.5.b Les microARN

Le clonage et le séquençage des siARN ont permis l'identification d'une sous-classe de petits ARN : les microARN ou miARN. Les membres de cette nouvelle classe d'ARN n'ont pas de fonctions codante (Lagos-Quintana et al., 2001; Nelson et al., 2001; Rosalind et al., 2001; Bartel, 2004).

Les microARN sont synthétisés à partir de précurseurs dont la maturation fait intervenir au moins deux ribonucléases de type III (doubles brins) : Drosha et Dicer (Hutvagner et al., 2001; Lee et al., 2003). Dans le nucléoplasme, l'enzyme Drosha convertit un transcrite primaire (ou pri-miARN) en une structure en épingle à cheveux : le pré-miARN, d'une longueur d'environ 70 nucléotides. Les pré-miARN sont ensuite exportés dans le cytoplasme par un processus Ran-GTP dépendant impliquant l'exportine-5 (Lee et al., 2003; Lund et al., 2004) puis sont pris en charge par la ribonucléase Dicer (Lee et al., 2003). Celle-ci génère alors des petits ARNdb, similaires aux siARN et nommés miARN:miARN. Un seul des brins du duplex miARN:miARN est alors intégré dans un complexe de type RISC qui interagit ensuite avec l'ARNm : le RISC-miRNP (« RNA-induced silencing complex- micro-ribonucleoprotein ») (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003).

Les modalités d'action de RISC-miRNP, encore mal comprises, semblent être contrôlées par la qualité du duplex miARNguide:ARNm mis en jeu (**figure 2**) (Bartel, 2004; Murchison and Hannon, 2004):

→ Si la complémentarité du miARN est parfaite avec l'ARN cible : le complexe RISC-miARN clive au milieu de l'hybride miARN-ARNm, comme les siARN.

→ Si le miARN guide n'est pas totalement complémentaire à la séquence de l'ARNm (mésappariement): l'ARNm n'est pas clivé, mais on observe alors une inhibition de sa traduction.

Selon le type d'organisme (plantes ou animaux), il semble que le degré de complémentarité des miARN avec leur cible varie. Les plantes favoriseraient davantage un mode de dégradation de l'ARNm par une forte homologie du miARN avec l'ARNm cible alors que la branche animale s'orienterait d'avantage sur un mode de répression traductionnelle qui préserverait la stabilité des ARNm ciblés (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Dans le cas d'une inhibition de la traduction, on remarque que les microARN ciblent généralement dans la région 3' non traduite des ARNm (ou 3'UTR) (Jackson et al., 2003; Rhoades et al., 2002).

Les miARN sont parfois regroupés et pourraient être transcrits de manière polycistronique (Bartel, 2004).

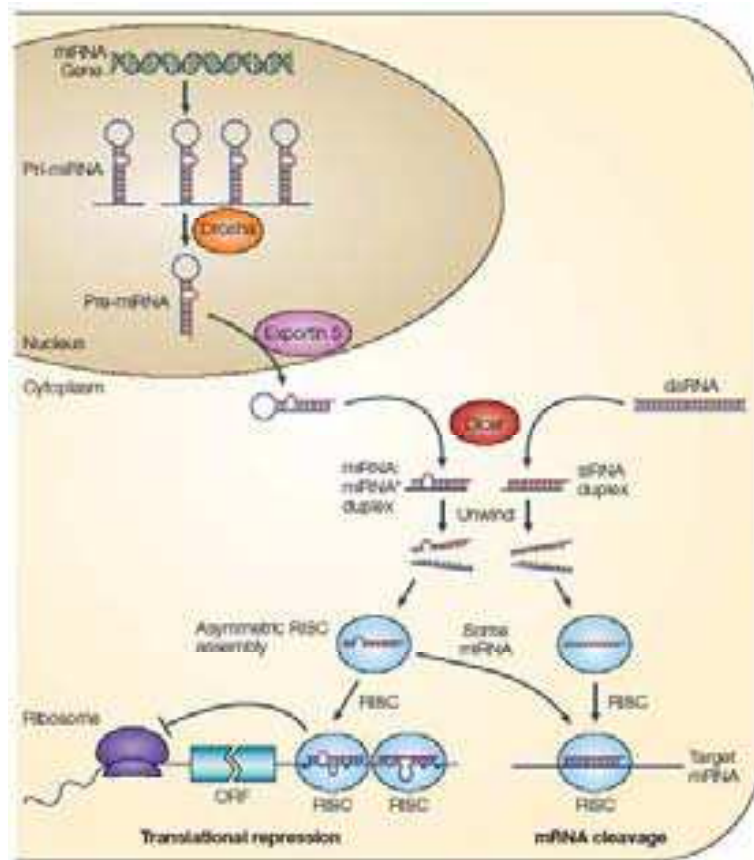


Figure 2

Modèle actuel sur la biogenèse des microARN et la répression post-transcriptionnelle

Le transcrite pri-microARN (pri-miARN) est transformé en pre-miARN d'environ 70nt par la ribonucléase Drosha dans le noyau. Les pre-miARN sont transportés vers le cytoplasme par l'exportine 5 et sont transformés en duplexes miARN:miARN* par Dicer (comme les longs ARNdb). Un seul brin du duplex miARN:miARN* est préférentiellement assemblé dans le complexe RISC. En fonction du degré de complémentarité du miARN*, celui-ci va agir comme répresseur traductionnel ou dans la voie de clivage de l'ARNm correspondant. (He *et al* 2004)

Le complexe RISC fait intervenir plusieurs acteurs. Pour identifier les protéines participant à la machinerie ARNi, en plus des purifications biochimiques, de nombreux mutants ont été produits chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, la plante *Arabidopsis thaliana*, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et le champignon *Neurospora crassa*. Ici, nous décrivons la majeure partie des connaissances actuelles sur le rôle des différents intervenants du mécanisme de l'ARN interférence.

I.A.5.c Les ribonucléases Dicer et Drosha

Les ribonucléases III ont été décrites pour la première fois en 1968 au laboratoire de Zinder (Robertson et al., 1968). Ces protéines coupent spécifiquement l'ARNdb et sont impliquées dans le métabolisme des ARN chez la plupart des êtres vivants allant des phages aux mammifères. Trois classes structurales de RNase III ont été décrites (**figure 3**):

- La première classe, la plus simple est retrouvée chez de nombreux organismes, contient un domaine catalytique endonucléase unique (domaine RIII) et un domaine de liaison à l'ARNdb (dsRNA-binding domain, " dsRBD "). Cette classe de RNase III est impliquée dans la maturation des ARNr, des ARNt, et des ARNm (Lamontagne et al., 2003).
- La seconde classe est la famille des ribonucléases Drosha, contenant deux domaines catalytiques RIII et un domaine RS, riche en arginine et en sérine (Filippov et al., 2000).
- La troisième classe est la famille des enzymes Dicer qui possède également deux domaines catalytiques RIII mais aussi un domaine hélicase et un domaine PAZ (Bernstein et al., 2001).

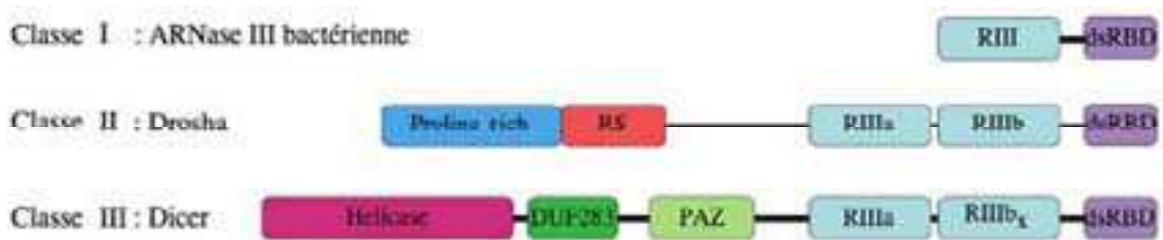


Figure 3

Les différentes classes de RNase III

La classe I est représentée par la RNase III de *E. coli*, la classe II est représentée par la protéine Drosha mammifère et la classe III par Dicer. Le schéma n'est pas à l'échelle (d'après Carmel et al. 2004).

La famille des ribonucléases Dicer (Classe III) est relativement bien conservée au cours de l'évolution. L'implication de l'enzyme Dicer dans le mécanisme de l'ARNi a été démontrée initialement chez *D. melanogaster* (Bernstein et al., 2001). L'activité enzymatique de Dicer a été démontrée par l'incubation d'ARNdb avec la fraction active purifiée de drosophile générant des siARN (Bernstein et al., 2001). Par la suite, cette activité a été démontrée chez d'autres espèces comme chez la plante *A. thaliana*, l'insecte *Spodoptera frugiperda*, le tabac, le nématode *C. elegans*, les mammifères et le champignon *N. crassa* (Carmell and Hannon, 2004).

La famille des enzymes Dicer possède au minimum quatre domaines distincts relativement conservés : un domaine ARN hélicase en position aminoterminal, deux motifs RNase III, un domaine de liaison à l'ARNdb (dsRNA binding domain, dsRBD) et un domaine PAZ (domaine d'environ 150 aa). Ce domaine PAZ (Piwi, Argonaute, et Zwille/Pinhead) est présent chez les protéines de la famille Argonaute dont certains membres sont impliqués dans l'ARNi (Catalanotto et al., 2000; Fagard et al., 2000; Tabara et al., 1999) (**figure 3**).

Le clivage de l'ARNdb par Dicer est effectué par le tandem de domaines RNase III. Les protéines Dicer contiennent un motif de liaison à l'ATP situé dans le domaine hélicase de type DEAD (Aspartate-Glutamate-Alanine-Aspartate) (Rocak and Linder, 2004).

Récemment, des études sur la structure du domaine catalytique des RNases III ont conduit à un modèle de clivage expliquant la production des siARN. L'analyse de la structure cristalline de la RNase III de l'archaebactérie *Aquifex aeolicus* avec la mutation induite des sites actifs des domaines RNase III de l'enzyme Dicer humaine et celle de la RNase III de *E. coli* indique que Dicer fonctionnerait en enzyme monomérique. Le centre enzymatique de Dicer contient deux sites catalytiques fonctionnels pouvant générer de petits siARN avec des extrémités de deux nucléotides simple brin en 3'. Cette ribonucléase fonctionnerait par une dimérisation intramoléculaire des deux domaines RNase III. Le clivage des longs ARNdb par Dicer serait assisté par les domaines flanquants de fixation à l'ARN, le domaine PAZ et le domaine dsRBD (Zhang et al., 2004)(**figure 4**).

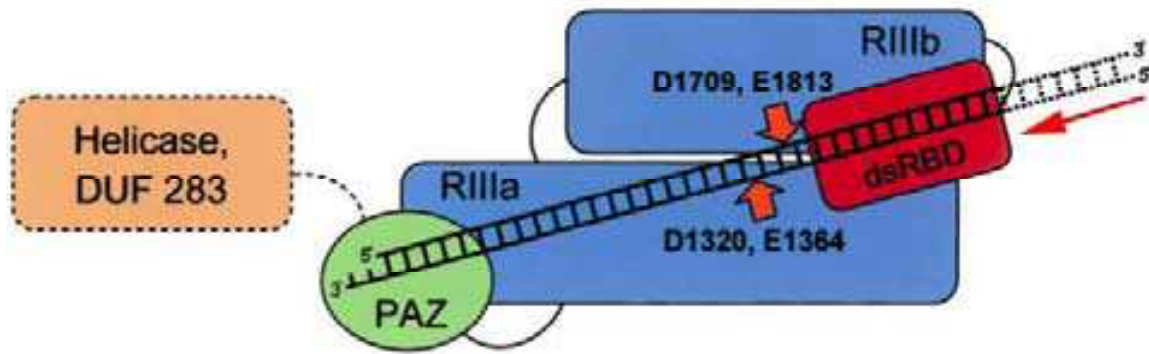


Figure 4

Modèle de clivage d'un long ARNdb en siARN par Dicer

Les domaines individuels de Dicer sont colorés différemment. Le rôle des domaines hélicase/ATPase et DUF283 (pointillés) n'est pas encore défini. Les résidus responsables du clivage de l'ARNdb sont annotés dans les deux domaines RIIIa et RIIIb (rectangles bleus). La fine flèche rouge indique le sens processif de dégradation de l'ARNdb par Dicer (Zhang et al., 2004).

Au point de vue biologique, l'absence de Dicer génère de nombreux désordres dont les causes sont liées au dysfonctionnement des mécanismes relatifs à l'ARNi. Chez *C. elegans*, les mutants de Dicer sont incapables de faire l'ARNi sur des ARNm exprimés dans la lignée germinale, mais sont capables d'induire la réponse ARNi dans les cellules somatiques. Ces mutants sont stériles, ce qui suggère un rôle essentiel de l'ARNi dans le développement des lignées germinales (Knight and Bass, 2001). Étrangement, chez la plante *A. thaliana*, un homologue de Dicer : CAF1, n'est pas impliqué dans l'activité PTGS, bien qu'il montre des domaines similaires à la protéine Dicer de *D. melanogaster* ou de l'homme (Bernstein et al., 2001; Cerutti et al., 2000). Cependant, une analyse phylogénétique de ces protéines montre que ces protéines possèdent un ancêtre commun (Cerutti et al., 2000). La localisation de Dicer est cytoplasmique (Billy et al., 2001). Chez la drosophile, *dicer-1* et *dicer-2* jouent des rôles distincts dans la voie ARNi et interagissent avec les complexes RISC liés aux voies miARN ou siARN, et dans le cas de *dicer-2* l'assemblage et l'activation du complexe RISC (Lee et al., 2004).

Les ribonucléases de classe II Drosha présentent une structure similaire à l'enzyme Dicer mais sont localisées majoritairement dans le noyau. Drosha est impliquée dans la maturation d'ARN ribosomiques (12S et 32S) et des pri-miARN en pre-miARN (Lee et al., 2003)(**figure 3**). Des homologues de Drosha sont retrouvés chez plusieurs espèces comme

la souris, l'homme, *C. elegans*, et *D. melanogaster* (Fortin et al., 2002) pas chez les plantes, ni chez les chez les protozoaires ou *S. pombe* (Reinhart et al., 2002) (Carmell and Hannon, 2004).

I.A.5.d Les protéines de la famille Argonaute

Le premier membre de la famille Argonaute a été découvert par un criblage de mutants chez *Arabidopsis thaliana*. La mutation du gène *ago1* affecte l'architecture générale de la plante et particulièrement le développement des feuilles (Bohmert et al., 1998). Les membres de la famille Argonaute sont retrouvés chez la plupart des espèces de la branche eucaryote et ont une structure conservée (**figure 5**): ce sont des protéines basiques d'environ 100kDa, définies par la présence de deux domaines appelés PAZ et PIWI (Carmell et al., 2002; Cerutti et al., 2000). Le domaine PAZ, trouvé également dans la protéine Dicer, fait approximativement 150 aa (Lingel et al., 2003; Song et al., 2003b; Yan et al., 2003), le domaine PIWI, d'environ 330 acides aminés, est localisé du côté carboxy-terminal de la protéine (Tahbaz et al., 2004).

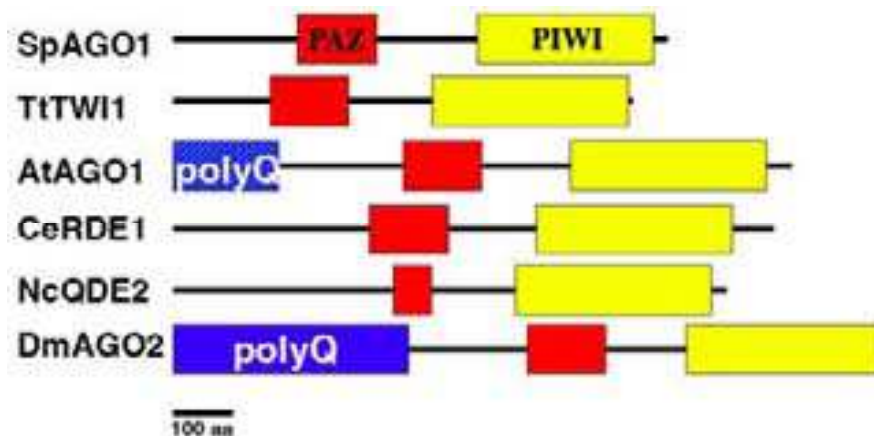


Figure 5

Exemples de protéines de la famille Argonaute impliquées dans l'ARNi

SpAGO1 : *S. pombe* ; *TtTWI1* : *Tetrahymena* ; *AtAGO1* : *A. thaliana* ; *CeRDE1* : *C. elegans* ; *NcQDE2* : *N. crassa* ; *DmAGO2* : *D. melanogaster*. (Durand-Dubief et al., 2003). Le domaine PAZ est en rouge et le domaine PIWI en jaune. La barre de l'échelle représente 100 acides aminés (aa)

Tous les organismes capables d'ARNi possèdent un ou plusieurs membres de la famille Argonaute (Cerutti et al., 2000; Cogoni and Macino, 1997; Fagard et al., 2000; Kennerdell et al., 2002; Mochizuki et al., 2002; Pal-Bhadra et al., 2002; Tabara et al., 1999; Tijsterman et al., 2002b; Williams and Rubin, 2002). Le génome de la drosophile contient cinq protéines argonautes distinctes, celui de l'homme huit et celui de *C. elegans* 27. La remarquable diversité des Argonautes chez certaines espèces comme le nématode suggère une spécialisation de ces protéines. Cependant, d'autres espèces n'effectuant pas l'ARNi comme les archaebactéries, *Leishmania major* ou encore *Trypanosoma cruzi* possèdent des argonautes ayant un domaine PIWI conservé et sans domaine PAZ suggérant leur participation à d'autres mécanismes (Cerutti et al., 2000; Durand-Dubief and Bastin, 2003; Song et al., 2004).

Le premier lien entre l'extinction des gènes et la famille des protéines Argonaute remonte à l'isolation du gène *rde1* à partir d'un criblage de mutants de *C. elegans* déficients pour l'ARNi (Tabara et al., 1999; Tabara et al., 2002). Chez *D. melanogaster*, la protéine Argonaute *DmAGO2*, un homologue de la protéine RDE1 est une composante essentielle du complexe RISC (Hammond et al., 2001). Des protéines de la famille Argonaute sont indispensables à l'ARNi chez le champignon *Neurospora crassa* (QDE2)(Catalanotto et al., 2000), chez *A. thaliana* (AGO1)(Fagard et al., 2000), *S. pombe* (Sigova et al., 2004) et *Trypanosoma brucei* (Durand-Dubief and Bastin, 2003; Shi et al., 2004b).

Toutefois, ces mutants sont toujours capables de fragmenter les grands ARNdb, ce qui signifie que les protéines Argonaute seraient impliquées en aval, dans l'étape effectrice (coupure de l'ARN cible). Le domaine PAZ lie de façon stœchiométrique (1:1) de petites séquences d'ARN simple brin en orientation 5'-3' (Yan et al., 2003) via une poche qui interagirait avec les extrémités sortantes en 3' des siARN (Lingel et al., 2004; Song et al., 2003b). La fonction majeure du domaine PAZ serait d'agir comme module de transfert de l'extrémité du siARN guide pour le déclenchement du mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle par le complexe RISC (Ma et al., 2004). La structure secondaire du domaine PIWI de *DmAGO2* présente une homologie importante avec le site actif de l'endonucléase V de *E. coli*, suggérant une activité de clivage de l'ARN cible par ce domaine (Rand et al., 2004). D'autre part, la cristallisation de la protéine argonaute de l'Archaebactérie *Pyrococcus furiosus* montre que son domaine PIWI est similaire à la ribonucléase H et possède les sites actifs conservés de cette enzyme nécessaire à une activité de clivage de l'ARN (aspartate 635-aspartate 628-glutamate 635). Ces données

suggèrent que la disposition des domaines PAZ et PIWI des protéines Argonautes formerait un sillon qui permettrait l'accès aux substrats ARN puis le clivage de l'ARNm (Song et al., 2004). En extrapolant les données biologiques et structurales des différents modèles, les auteurs suggèrent que certaines protéines Argonautes généreraient l'activité enzymatique dans le RISC (**figure 6**) (Song et al., 2004).

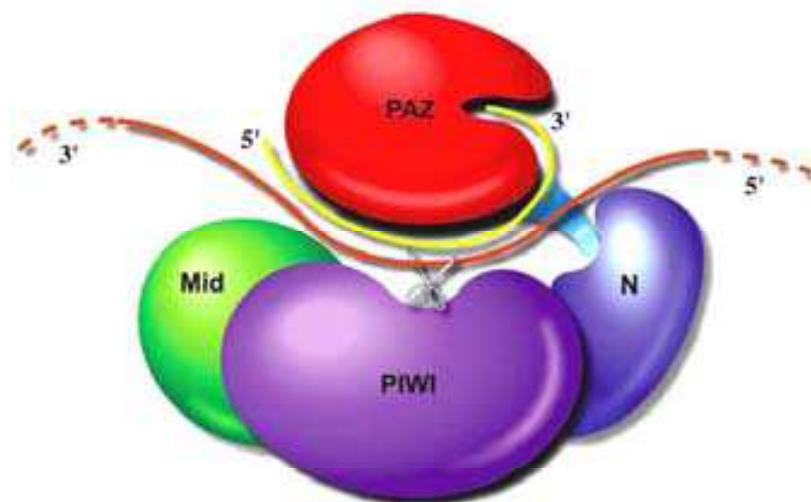


Figure 6

Représentation schématique du modèle de clivage de l'ARNm guidée par le siARN guide

Le siARN guide (en jaune) se fixe par sa partie 3' dans la fente du domaine PAZ. L'ARNm en orange se fixe entre les domaines PAZ et PIWI. Le site actif dans le domaine PIWI clive l'ARNm au niveau du milieu du siARN guide (d'après Song et al., 2004)

L'hypothèse du modèle de clivage des ARN par *DmAGO2* a récemment été étoffée chez la souris. Une protéine Argonaute est biologiquement et biochimiquement distincte des sept autres: AGO2. La protéine AGO2 est nécessaire au clivage de l'ARNm par ARN interférence. Les mutations de la protéine AGO2, dans le domaine homologue à la ribonucléase H, inactivent le complexe RISC indiquant que AGO2 possède l'activité enzymatique du complexe permettant de cliver l'ARNm (Liu et al., 2004a). Chez l'homme, la protéine *HsAGO2* (homologue de AGO2 chez la souris) est impliquée directement dans le clivage de l'ARN cible (Meister et al., 2004).

Par ailleurs, l'absence de *DmAGO2* n'induit plus la réponse ARNi par les siARN chez l'embryon de drosophile, mais permet encore l'extinction post-transcriptionnelle par la voie des miRNA. À l'inverse, l'absence du gène Argonaute *DmAGO1* inhibe la production de miARN matures permettant de cliver les ARNm correspondant, mais permet une réponse de l'ARN interférence par des siARN (Okamura et al., 2004).

En conclusion, il y aurait plusieurs voies de l'extinction post-transcriptionnelle des gènes (par miARN ou siARN) exploitées par différentes protéines Argonaute qui seraient spécialisées pour composer des complexes RISC distincts.

1.A.5.e Les ADN et ARN hélicases

Les ADN hélicases participent à de nombreux processus de la réplication et la réparation de l'ADN alors que les ARN hélicases interagissent avec les ARN lors de la transcription, l'épissage des ARNm pré-messager, la biogenèse des ribosomes et l'export des ARN, l'initiation de la traduction et la dégradation des ARN (Rocak and Linder, 2004).

Plusieurs gènes mutés essentiels à l'ARNi révèlent être des ARN hélicases. La première a été identifiée chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. L'ARN hélicase MUT6 contient une région riche en répétitions RGG, motif généralement connu pour lier les ARN (Wu-Scharf et al., 2000). Le mutant présente une élévation importante de l'activité des transposons. Chez le champignon *Neurospora crassa*, QDE3 est une ADN hélicase de type RecQ, dont la famille inclut les protéines responsables du Syndrome de Bloom et du Syndrome de Werner, et participerait à la formation de l'hétérochromatine (TGS) (Cogoni and Macino, 2000; Yu et al., 1996).

Chez *Caenorhabditis elegans*, deux protéines de la famille des hélicases ont été identifiées chez des mutants résistants à l'ARNi (Ketting et al., 1999). Le gène *mut7* code pour une protéine contenant un domaine 3'-5' exonucléase, similaire à la protéine du Syndrome de Werner et de la RNase D de *E. coli*. Les auteurs suggèrent que le domaine exonucléase participerait à la dégradation des ARNm aberrants comme les transcrits de transposons (Ketting et al., 1999). Le mutant *mut-14* d'une ARN hélicase montre que seuls les oligonucléotides antisens peuvent induire l'ARNi chez *C. elegans* (Tijsterman et al., 2002a). L'activité ARN hélicase de la protéine MUT14 favoriserait la synthèse d'ARNdb par l'hypothèse que le petit ARN antisens s'hybriderait à l'ARNm de séquence correspondante puis formerait de l'ARNdb *via* une activité ARN polymérase dépendant de l'ARN (RdRP, voir plus loin), substrat pour la ribonucléase Dicer. Curieusement, l'effet induit par l'ARN antisens nécessite la présence des ARN hélicases *mut7* et *mut14* mais ne nécessite pas le gène argonaute *rde1* et le cofacteur *rde4* nécessaire à l'ARNi chez *C. elegans* (Tijsterman et al., 2002a).

Chez *A. thaliana*, le gène *sde3* codant pour une protéine ayant un motif ARN hélicase est nécessaire au PTGS et pourrait être impliqué dans la production d'ARNdb (Dalmy et al., 2000). Cependant, la protéine serait surtout impliquée comme cofacteur car la mutation de ce gène n'entraîne qu'une réduction partielle du PTGS (Dalmy et al., 2001).

En conclusion, la compréhension des différentes hélicases impliquées dans la réduction ou l'absence de réponse post-transcriptionnelle est délicate. Paradoxalement, en dépit des signatures ARN hélicases très conservées, une famille d'enzymes spécifiques à l'ARNi n'a pas été identifiée. Une des explications de ce phénomène serait que chaque organisme eucaryote adapte son métabolisme avec les différentes et très nombreuses ADN/ARN hélicases.

I.A.5.f Protéines impliquées dans l'amplification et transmission du phénomène

L'ARN interférence n'est pas un mécanisme stœchiométrique mais plutôt un mécanisme enzymatique se traduisant généralement par une amplification et une transmission du phénomène. Les travaux d'Andrew Fire montrèrent qu'environ deux molécules d'ARNdb dans une cellule sont suffisantes pour induire la dégradation post-transcriptionnelle du gène *unc-22*, abondamment exprimé chez *C. elegans*. L'injection d'ARNdb dans l'intestin du nématode peut induire l'ARNi chez les générations suivantes F1 et F2 (Fire et al., 1998). Chez les plantes, le signal d'extinction peut se diffuser dans la plante *via* le phloème (Fagard et al., 2000). De même, la greffe d'un tissu végétal où a lieu le phénomène de PTGS sur un gène diffuse progressivement le signal à toute la plante (Palauqui et al., 1997). La transmission du signal d'extinction dans d'autres cellules (à l'exception des cellules filles) n'est pas universelle. Aucune transmission de ce signal n'a été trouvée chez les mouches et les mammifères.

L'extinction post-transcriptionnelle suggère l'implication d'ARN polymérase dépendantes de l'ARN ('RNA-dependent RNA polymerases' ou RdRPs). La présence d'une protéine ayant une activité RdRP de ce type chez la tomate (Schiebel et al., 1993; Schiebel et al., 1998) suggère que la plante peut synthétiser de l'ARN complémentaire. Les enzymes RdRP reconnaîtraient les siARN appariés à l'ARN comme amorces et synthétiseraient de l'ARN antisens pour former l'ARNdb ; ce dernier serait ensuite dégradé par la machinerie ARNi (Cogoni and Macino, 1997; Cogoni and Macino, 1999; Depicker and Montagu, 1997; Lindbo et al., 1993).

Ces hypothèses furent confirmées par la découverte des premiers mutants invalidés dans la voie ARNi ; QDE1 chez *N. crassa* (Cogoni and Macino, 1997) et SDE1/SGS2 chez *A. thaliana* (Dalmy et al., 2000; Mourrain et al., 2000). Étrangement, la protéine SDE1/SGS1 n'est pas indispensable au VIGS des virus ARN mais est requise pour l'extinction du transgène, suggérant que SDE1 pourrait être nécessaire pour produire l'ARNdb, l'initiateur du PTGS (Beclin et al., 2002). Dans le cas du VIGS, il est probable que la RdRP virale produite comme intermédiaire de réplication du virus synthétise l'ARNdb induisant le PTGS. La mutation du gène *sde1* n'entraîne pas de problèmes apparents chez les plantes.

Chez *C. elegans*, le gène *ego1* encode une RdRP nécessaire pour l'ARNi dans la lignée germinale et pour le développement (Smardon et al., 2000). La RdRP serait responsable de la maintenance de l'extinction post-transcriptionnelle après la disparition de l'ARNdb ayant initié l'ARNi (Smardon et al., 2000). Chez la levure à fission *S. pombe*, la RdRp est nécessaire aux extinctions transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Sigova et al., 2004).

Toutefois, les homologues de la RdRP n'ont pas été retrouvés chez certaines espèces où le phénomène d'amplification est moins marqué comme l'homme, la drosophile ou encore le trypanosome.

Chez le nématode *C. elegans* et chez les plantes, le signal d'extinction des gènes peut se propager d'un tissu à la totalité de l'organisme. Chez *C. elegans*, les mutants *sid1* des cellules du pharynx et des muscles abdominaux ne propagent plus le signal ARNi vers d'autres tissus, ni à la descendance (Winston et al., 2002). La mutation affecte un gène codant pour une protéine ayant plusieurs domaines transmembranaires, capable de transporter passivement l'ARNdb vers les autres cellules (Feinberg and Hunter, 2003). Cette protéine n'est pas retrouvée chez la drosophile qui ne fait pas de propagation systématique de l'ARNi (Fortier, E., et al. 2000; Piccin, A., et al. NAR 2001), mais est présente chez l'homme, et la souris et laisse envisager une propagation similaire de l'ARNi chez ces espèces.

Chez les plantes, certains ARN messagers sont transportés par la sève *via* le phloème (Ding et al., 2003). Les signaux antiviraux de l'ARNi peuvent se propager sur de longues distances à partir du site de l'infection, suggérant que les siARN bloquant l'expression virale pourraient aussi être transportés sur de longues distances pour agir sur l'expression des gènes (Fagard et al., 2000). L'analyse de la sève du phloème de plusieurs espèces de plantes révèle qu'il existe une population de petits ARN de 18 à 25 nt correspondant à des séquences connues de petits ARN régulateurs. Chez le potiron, la protéine *CmPSRP1* (pour « Phloem Small RNA-binding Protein 1) est impliquée dans le transport de petits ARN. Elle est composée de 213 aa, est très riche en glycine et histidine et fixe sélectivement des ARN simple brin de 25 nucléotides. Des homologues sont trouvés chez d'autres espèces comme le concombre et le lupin (Yoo et al., 2004).

I.A.5.g Autres protéines impliquées dans l'ARNi

Chez *C. elegans*, RDE4 est une protéine capable de lier les ARNdb en s'associant à Dicer (Tabara et al., 2002). R2D2, son homologue chez la drosophile est essentielle pour le transfert des siARN générés par Dicer au complexe RISC (Liu et al., 2002). Elle s'associe à l'extrémité la plus stable du double brin siARN et oriente ainsi le duplex par rapport au complexe RISC, ce qui déterminerait lequel des deux brins doit s'associer préférentiellement avec DmAGO2 (Tomari et al., 2004).

Chez la drosophile, plusieurs protéines connues pour se lier avec l'ARN sont présentes dans le complexe RISC contenant AGO2 et le siARN. C'est le cas de Vasa et dFXR (responsable de l'X fragile chez l'homme), un homologue de l'ARN hélicase humaine (Dmp68) et, deux protéines ribosomales L5 et L11 (Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002).

I.A.6. Fonctions de l'ARN interférence

Nous avons vu au chapitre précédant la diversité et la richesse des complexes ribonucléoprotéiques participant aux mécanismes d'extinction post-transcriptionnelle. Cette diversité se retrouve dans des fonctions multiples au niveau cellulaire.

I.A.6.a Régulation des gènes par les microARN

Les premiers microARN (miARN), *lin-4* et *let-7*, ont été décrits chez le nématode *C. elegans*. Tous deux ciblent la région 3' non codante (3'UTR) de facteurs de transcription impliqués dans le développement et inhibent leur traduction sans toutefois détruire l'ARNm (Lee et al., 1993; Hamilton et al., 2002). Les microARN sont une famille grandissante de petits ARN régulateurs non codants identifiés chez des métazoaires comme *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *C. elegans* et chez les mammifères. Certains de ces microARN sont très conservés au cours de l'évolution (Allen et al., 2004), d'autres sont spécifiques à l'espèce étudiée. Selon les organismes, leur nombre peut atteindre plusieurs centaines de gènes (Bartel, 2004). Actuellement, on estime qu'il existe plus de 250 microARN chez l'homme, soit presque 1% de l'ensemble des gènes connus (Bartel, 2004).

Le développement de logiciels adaptés, a permis de cribler les génomes et de prédire l'existence des miARN et de leurs cibles (Bartel, 2004). Les miARN régulent essentiellement l'expression des gènes par deux mécanismes : clivage de l'ARNm ou répression de la traduction de l'ARNm (Meister et al., 2004). Chez les plantes, la plupart des miARN présente des complémentarités parfaites avec des ARNm cibles (Rhoades et al., 2002) ce qui induit un clivage et une destruction de l'ARN cible (Bartel, 2004). En revanche chez les animaux, à quelques exceptions près, aucun des miARN identifiés ne présente de complémentarité parfaite avec des ARNm cellulaires suggérant que l'inhibition de la traduction par les miARN est prépondérante (Lewis et al., 2003).

La majorité de ces miARN ont une fonction inconnue, mais beaucoup interviendraient dans la régulation du développement et la physiologie des organismes pluricellulaires (Ambros, 2004; He and Hannon, 2004). Ces miARN et leurs cibles sont impliqués dans des processus très nombreux et variés comme le temps de floraison et la forme des feuilles chez *A. thaliana* ; l'asymétrie neuronale chez *C. elegans*; la prolifération des cellules dans le développement chez la drosophile (Ambros, 2004; He and Hannon, 2004). Dans le cas du nématode *C. elegans*, plusieurs microARN sont requis pour les transitions temporelles des stades larvaires au cours du développement du nématode (Banerjee and Slack, 2002). Chez la drosophile, plusieurs miARN (*miR-14*, *bantam*, *miR-2*) contrôlent la prolifération et/ou la différenciation cellulaire en modulant notamment l'expression de gènes proapoptotiques (Brennecke et al., 2003). Chez les mammifères, le microARN *miR-181* dont la cible n'est pas identifiée, interviendrait lors du processus de différenciation hématopoïétique (Chen et al., 2004). Certaines translocations chromosomiques associées à des leucémies affectent des locus géniques comportant les gènes *miR-142*, *miR15*, *miR-16*, *miR-155* (Calin et al., 2004), ce qui suggère qu'un dérèglement de l'expression des miARN ou de la voie ARNi pourrait favoriser l'oncogenèse.

Actuellement, l'identification du répertoire complet des ARNm cibles de miARN représente un défi immense car les appariements imparfaits mis en jeu lors du blocage de la traduction sont difficiles à caractériser, même si certains ARNm cibles ont été prédits (Lewis et al., 2003; Stark et al., 2003). De plus, un même miARN peut intervenir sur des ARNm différents; l'inverse est également vrai, une même région 3'UTR peut lier plusieurs miARN différents. Plus de 30% des gènes humains pourraient potentiellement être ciblés par des miARN (Lim et al., 2005). Appréhender cette combinatoire d'interactions ARN:ARN et les réseaux de régulation représente un défi du décryptage de la fonction biologique de cette nouvelle famille d'ARN non codants (Ambros, 2004; He and Hannon, 2004).

I.A.6.b Régulation transcriptionnelle et interaction avec la chromatine

L'hétérochromatine est une structure condensée de la chromatine contenant peu de gènes exprimés et présentant généralement une forte densité de séquences répétées et de transposons. L'hétérochromatine « constitutive » est majoritairement localisée au niveau des centromères, des répétitions télomériques et de régions réprimées dispersées. Le terme d'hétérochromatine « conditionnelle » est défini pour des régions chromatiniennes très condensées et ayant perdu l'expression des gènes à certains stades du développement (par exemple le chromosome X des mammifères)(Elgin and Workman, 2002). L'hétérochromatine est caractérisée par la présence de protéines spécifiques associées à la modification de la structure de l'ADN conduisant à la répression de l'expression des gènes.

Chez la plupart des eucaryotes, la formation de l'hétérochromatine s'effectue en deux étapes : il y a tout d'abord une nucléation qui se traduit par une modification de l'extrémité amino-terminale des histones. Ces modifications sont caractérisées principalement par une hypoacétylation de l'histone H4 et par la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9. Ensuite, la formation de l'hétérochromatine peut se propager le long du chromosome jusqu'à des séquences « boundary elements » stoppant la propagation du signal (Grewal and Moazed, 2003).

L'ARNi fait partie de ces mécanismes centraux impliqués dans la formation de l'hétérochromatine. Cette facette de l'ARN interférence démontre qu'en présence des siARN, la cellule peut contrôler l'expression des gènes également au niveau transcriptionnel (« Transcriptional Gene Silencing » ou TGS) en induisant des modifications de la chromatine (Lippman and Martienssen, 2004; Matzke et al., 2004)

Nous décrirons ici les principales interactions de l'ARN interférence au niveau de la chromatine : la formation de l'hétérochromatine, la méthylation de l'ADN, l'excision de l'ADN.

I.A.6.b.1 ARN interférence et formation de l'hétérochromatine chez Schyzosaccharomyces pombe

Chez la levure *S. pombe*, l'hétérochromatine est principalement localisée au niveau des centromères, des télomères et des loci sexuels appelés mating-type. L'hétérochromatine péricentromérique est composée de répétitions complexes appelées *dg* et *dh*. On retrouve également une copie de ces répétitions au niveau des loci du mating-type. L'extinction transcriptionnelle est dépendante de plusieurs intervenants : les histones désacétylases Clr3 et Clr6, l'histone méthyltransférase Clr4, responsable de la méthylation de l'histone H3 sur la lysine en position 9 (H3mK9), et la protéine à chromodomaine Swi6, homologue de HP1 chez l'homme (Lippman and Martienssen, 2004).

S. pombe possède un seul exemplaire des gènes *ago* (Argonaute), *dcr* (Dicer), *rdp* (ARN polymérase dépendante de l'ARN) requis pour l'ARN interférence. Une majorité des siARN clonés dérivent de régions centromériques suggérant que les transcrits des deux brins des répétitions centromériques sont ciblés par la machinerie ARNi (Reinhart et al., 2002; Volpe et al., 2002). En effet, les trois mutants incapables d'ARNi (*ago*, *dcr*, *rdp*) ne peuvent éteindre des gènes rapporteurs intégrés dans les répétitions centromériques (Volpe et al., 2002). Les mutants d'histones désacétylases et l'utilisation d'un inhibiteur des désacétylases (la trichostatine A) indiquent que l'ARNi induit la formation de l'hétérochromatine mais ne participe pas à son maintien (Volpe et al., 2003). L'analyse de la chromatine des mutants incapables d'ARNi révèle au niveau des centromères une absence de la protéine à chromodomaine Swi6 et des modifications H3mK9 et démontre que l'ARNi est requis pour la formation de l'hétérochromatine centromérique (Volpe et al., 2002). De plus, une dérégulation de l'expression de transcrits centromériques s'accroît chez les trois mutants (Hansen et al., 2005). Ces données sont expliquées par un modèle où la synthèse de transcrits, des répétitions centromériques de polarité complémentaire produisent de l'ARNdb qui serait traités par ARNi. L'expression d'ARNdb intramoléculaire du gène rapporteur GAL4 entraîne la formation d'hétérochromatine au niveau de ce locus, indiquant le rôle central des ARN double brin dans la formation d'hétérochromatine (Schramke and Allshire, 2003).

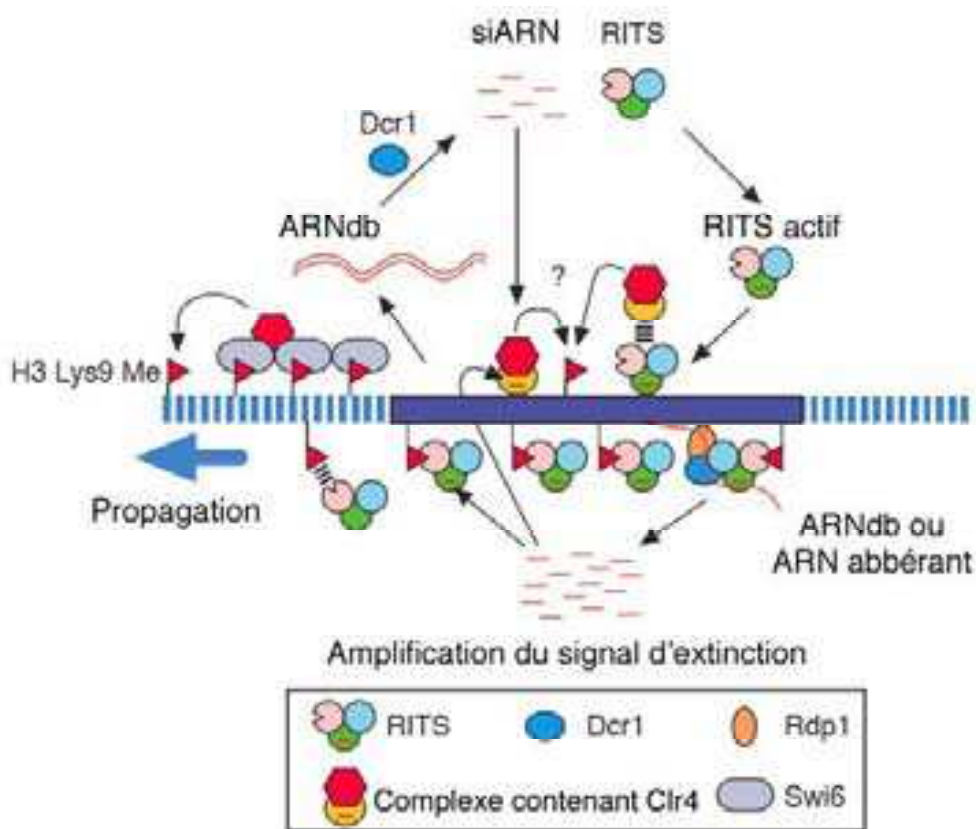


Figure 7

Représentation schématique du modèle de l'implication du RITS dans l'ARNi transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.

La machinerie ARNi est impliquée dans le ciblage initial par la méthyltransférase Clr4 vers le centre de nucléation de l'hétérochromatine (rectangle bleu) produisant de l'ARNdb.

Après la méthylation initiale de l'histone H3 en lysine 9 (H3K9), le complexe RITS serait fixé à la chromatine à l'aide de l'interaction de la protéine à chromodomaine Chp1 et des H3K9. Après l'attachement à la chromatine, le complexe RITS recruterait la Rdp et Dcr1 pour transformer les transcrits naissants en siARN. Les nouveaux siARN produits assurent le recrutement de Clr4 pour maintenir l'hétérochromatine formée. La protéine Swi6 se fixe aux H3K9 et recrute les enzymes responsables de la modification des histones dont Clr4 créant des sites supplémentaires pour Chp1 sur les nucléosomes adjacents qui permet la propagation de l'hétérochromatine avec le complexe RITS. (D'après Verdel et al. 2004).

Chez le mutant *clr4*, la présence d'ARNdb n'induit pas la formation d'hétérochromatine. De même, chez le mutant *swi6*, l'hétérochromatine est formée mais ne s'étend pas (Hall et al., 2002). Ces observations suggèrent qu'un complexe analogue à RISC effectuerait une reconnaissance séquence spécifique par les siARN pour modifier la chromatine en hétérochromatine.

Comment les siARN générés par le clivage de Dicer peuvent générer la formation de l'hétérochromatine ? Chez la levure, un complexe ribonucléoprotéique, appelé RITS (pour RNA-induced initiation of transcriptional silencing)(Verdel et al., 2004), a été purifié et contient la protéine argonaute AGO1, les siARN des séquences péricentromériques *dg* et *dh* générés par Dicer, la protéine Chp1 (protéine à chromodomaine liant les centromères et la méthylation de la lysine de l'histone)(Partridge et al., 2002), et une protéine de fonction inconnue Tas3 (Verdel et al., 2004).

Ce complexe RITS se fixerait aux histones H3 méthylées sur la lysine 9 par Clr4 par l'intermédiaire de la chromodomaine Chp1 (Verdel et al., 2004). La fixation du RITS à l'hétérochromatine dépend également de Swi6, chromodomaine nécessaire à propagation du signal et suggère que Swi6 soit impliquée dans le recrutement de la protéine Clr4 (**figure 7**). Les siARN et *Dcr1* ne sont pas nécessaires à la propagation et la maintenance de l'hétérochromatine. En présence d'histone H3 méthylée sur la lysine 9, le complexe RITS semble devenir réceptif au siARN (Noma et al., 2004). Chez la levure, la modification H3mK9 par Clr4 recrute Swi6 qui recrute à son tour la cohésine, un complexe protéique conservé chez d'autres espèces et nécessaire à la cohésion des chromosomes homologues lors de la mitose (Bernard et al., 2001). Les mutants ARNi montrent une absence de fixation de la cohésine générant des problèmes de ségrégation des chromosomes lors de la mitose et la méiose (Hall et al., 2003a).

I.A.6.b.2 Méthylation de l'ADN induite par l'ARN

Chez les plantes, la dégradation de l'ARNdb provoque la formation d'hétérochromatine par méthylation des cytosines de l'ADN au niveau de séquences correspondantes (Matzke et al., 2004; Wassenegger et al., 1994). La méthylation induite par l'ARNdb peut avoir lieu au niveau du promoteur du gène qui devient transcriptionnellement inactif ou encore au niveau de la région codante (Jones et al., 1999; Vaistij et al., 2002). Toutefois, la méthylation induite au niveau de la région codante n'induit pas une extinction de la transcription (Aufsatz et al., 2002). Ce phénomène d'extinction transcriptionnelle a lieu lors d'infection virale ou lors du mouvement de certains transposons chez les plantes (Matzke et al., 2004; Wassenegger and Pelissier, 1998).

La méthylation de l'ADN est retrouvée chez les mammifères (Kawasaki and Taira, 2004) et les champignons mais est absente chez la plupart des insectes, nématodes et levures suggérant que chaque espèce modifie la chromatine par des mécanismes qui lui sont propres (cf I.F.2 a)(Lippman and Martienssen, 2004; Matzke et al., 2004).

Chez *A. thaliana*, la mutation des gènes *ddm1* et *met1* (codant pour des méthyltransférases de la cytosine impliquées directement dans la méthylation de l'ADN) entraînent une réduction importante aussi bien du TGS que du PTGS (Morel et al., 2000). Chez les plantes, bien que soit démontrée une relation entre le TGS et le PTGS, toutes les mutations du TGS n'affectent pas les voies du mécanisme PTGS et inversement. Les mutants des gènes *ago4* et *sde4* (dont le gène n'a pas encore été identifié) inhibent l'accumulation des siARN et la méthylation de l'ADN (Zilberman et al., 2003). Cependant, les gènes d'autres mutants *sde1/sgs2* (RdRP), *sde3* (ARN hélicase), and *sgs3* sont impliqués dans le PTGS mais n'affectent pas l'accumulation des siARN, ni la méthylation de l'ADN (Hamilton et al., 2002; Matzke et al., 2004; Vaucheret et al., 2001).

I.A.6.b.3 Remaniements chromosomiques et excision d'ADN chez les ciliés

Une des fonctions les plus marquantes de l'ARNi au niveau de la chromatine et des modifications de l'ADN est observée chez les ciliés. Ces protozoaires possèdent deux noyaux ayant des fonctions distinctes, un micronoyau et un macronoyau. Le macronoyau est polyploïde et a pour fonction d'être le centre transcriptionnel de la cellule durant la phase de croissance végétative. Le micronoyau est transcriptionnellement inactif, mais s'avère indispensable à la reproduction sexuée en tant que noyau germinale.

Durant la conjugaison, le micronoyau génère le nouveau macronoyau. Cette phase de transition est accompagnée par deux évènements chez *Tetrahymena* :

- 1- Environ 6000 séquences internes de 0,5 à plus de 20kb ou IES (pour « internal eliminated sequences ») sont excisées des 5 paires de chromosomes micronucléaires (15% du génome). Cette excision est suivie d'une ligation des séquences flanquantes (**figure 8 a**).
- 2- Les chromosomes sont fragmentés au point de délétion de microséquences d'ADN appelées BES (pour « breakage eliminated sequences »), processus accompagné de l'addition des télomères donnant 200 à 300 minichromosomes (**figure 8b**).

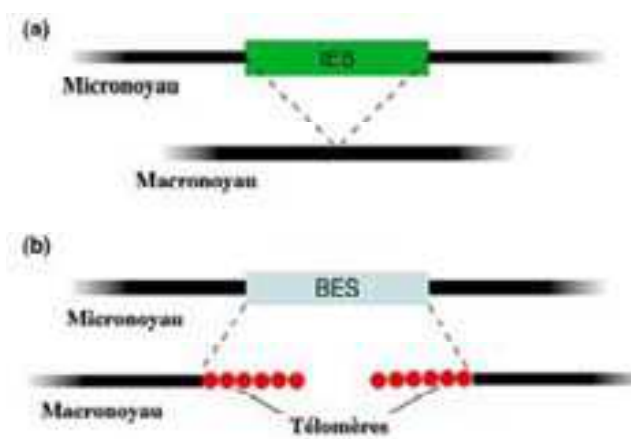


Figure 8

Représentation schématique des deux types

de réarrangement du nouveau macronoyau chez *Tetrahymena*

- a) Élimination des séquences IES puis ligation des séquences flanquantes
 - b) Élimination des séquences BES provoquant la cassure des chromosomes. Après la cassure des séquences télomériques sont ajoutées.
- (d'après Mochizuki et al. 2004)

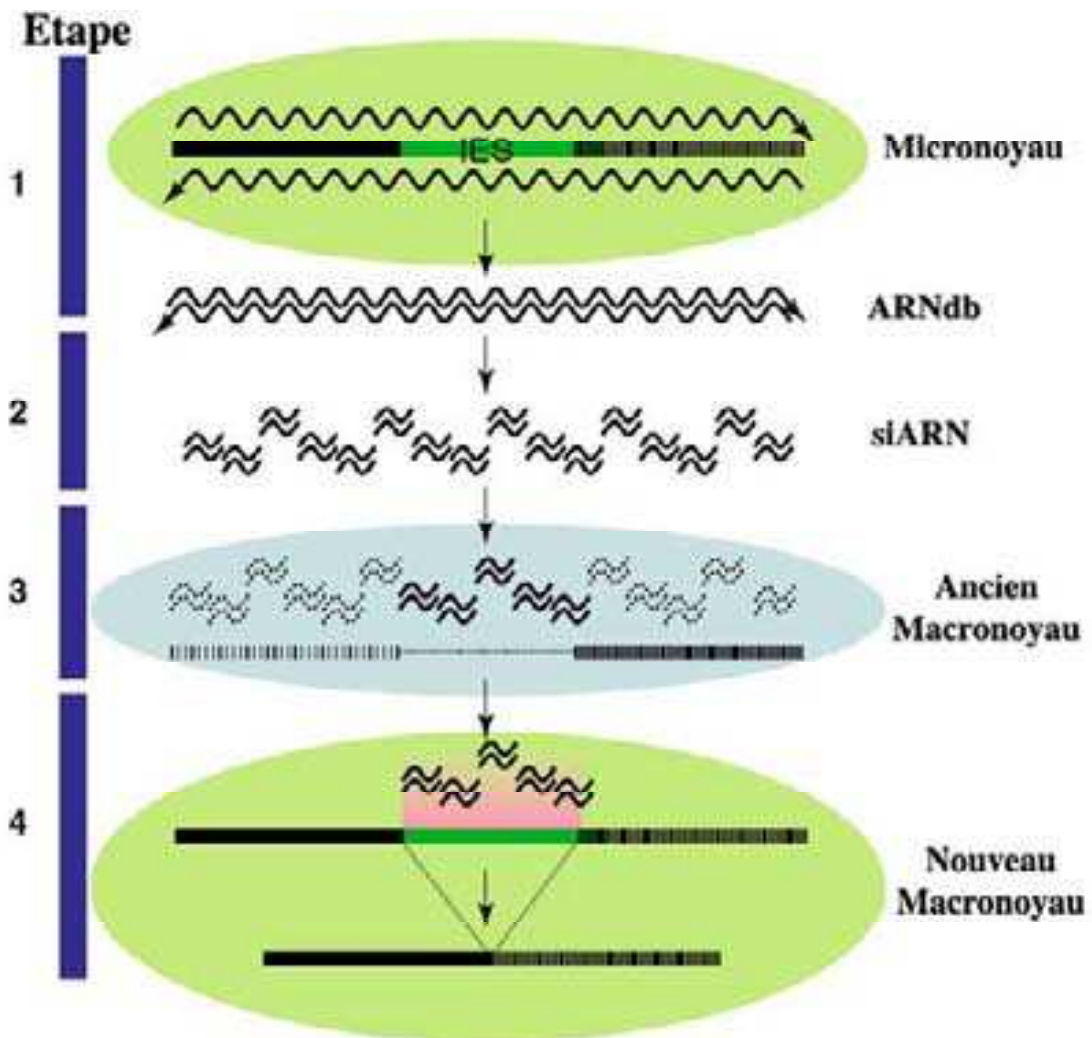


Figure 9

Modèle de l'implication des scanARN dans le cas de l'élimination des séquences IES « internal eliminated sequences ».

Étape 1: Le génome du micronoyau incluant les séquences IES est transcrit dans les deux sens pour former de l'ARNdb . **Étape 2:** L'ARNdb est clivé en petits ARNs (scanARN) par une activité de type Dicer. **Étape 3:** Les scanARN sont transférés dans le vieux macronoyau et les scanARN homologues à l'ADN présents dans le vieux macronoyau sont dégradés. **Étape 4:** Les scanARN non homologues aux séquences de l'ancien macronoyau sont transférés dans le nouveau macronoyau immature et servent de guide pour l'excision des séquences IES (d'après Mochizuki et al. 2004)

Les mécanismes de maturation du macronoyau furent longtemps inexplicables jusqu'à la découverte de l'ARNi. Le rôle de l'ARNi au niveau de l'hétérochromatine ne se limite plus à éteindre l'expression d'un gène ou à donner une structure convenable aux chromosomes, mais va servir à exciser de l'ADN. L'ARNi est fonctionnelle chez les ciliés (Ruiz et al., 1998; Galvani and Sperling, 2001) et plusieurs gènes codant pour des protéines Argonaute et Dicer ont été identifiés (Mochizuki et al., 2004). De plus, l'introduction d'ARNdb dans le vieux macronoyau entraîne la délétion du gène de séquence correspondante lors de la maturation à la génération suivante (Garnier et al., 2004; Yao et al., 2003).

Un des gènes argonautes, *TWI1* est exprimé spécifiquement lors de la formation du macronoyau, où la protéine est d'abord localisée dans le vieux macronoyau, puis dans le nouveau. En l'absence de *TWI1*, l'excision des IES est abolie. Des petits ARN de 26 à 31 nucléotides sont produits exclusivement lors de la phase de conjugaison. L'hypothèse fut suggérée que ces scanARN pourraient être des séquences engendrant un signal spécifique pour le clivage et la fragmentation de l'ADN (Mochizuki and Gorovsky, 2004a; Mochizuki and Gorovsky, 2004b). En l'absence de *TWI1*, ces ARN ne sont pas détectés et l'excision des IES n'a pas lieu.

Ces observations ont conduit à un modèle de maturation du macronoyau par les petits ARN ou scanARN (**figure 9**). Par analogie aux répétitions péri-centromériques de *S. pombe*, la synthèse d'ARNdb s'effectuerait par une transcription bidirectionnelle des répétitions de séquences à éliminer (Mochizuki and Gorovsky, 2004a). L'ARNdb serait ensuite clivé par une activité de type Dicer pour être ensuite pris en charge par *TWI1* et *PDD1* (Mochizuki and Gorovsky, 2004a). Le gène *PDD1* est exprimé spécifiquement durant la conjugaison et code pour une protéine ayant deux chromodomaines et un domaine liant l'ARN. Celle-ci servirait à fixer les scanARN pour guider le clivage spécifique de l'ADN (Taverna et al., 2002). *In vitro*, la protéine *PPD1* lie spécifiquement la modification H3mK9. La mutation de *PDD1* diminue dramatiquement la modification H3mK9 et inhibe l'excision des séquences d'ADN correspondant aux scanARN (Mochizuki et al., 2002; Taverna et al., 2002). L'inhibition de la méthylation sur la lysine 9 n'empêche pas la formation et l'accumulation des scanARN mais bloque l'excision. Par contre, l'inhibition de l'accumulation de ces petits ARN par les mutations de *TWII* ou de *PPDI* empêche la méthylation, suggérant que comme chez la levure, les scanARN sont essentiels à la formation d'hétérochromatine (Liu et al., 2004c).

I.A.6.b.4 Régulation des éléments rétrotransposables

Dans les génomes eucaryotes et procaryotes, certaines séquences d'ADN sont mobiles : les éléments transposables ou transposons. Ces éléments sont généralement considérés comme des moteurs dans l'évolution des génomes. Le premier transposon a été découvert dans le maïs (*Zea mays*) par Barbara McClintock en 1940. Ses travaux pionniers démontrèrent que ces éléments mobiles sont capables de provoquer des insertions, des délétions et des translocations dans le génome. Près de la moitié du génome du maïs est composée de ces éléments mobiles et leur transposition peut conduire par exemple à des changements de couleur dans les grains du maïs, en s'insérant dans le locus *Bronze* codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'un pigment : l'anthocyanine (Dooner and Nelson, 1977).

Les éléments transposables sont divisés en deux grandes classes selon leurs mécanismes de transposition (Finnegan, 1989; Kazazian, 1998) (**figure 10**). Le premier groupe, plus abondant dans les génomes bactériens, les invertébrés et les plantes, est composé d'éléments qui se transposent *via* un intermédiaire d'ADN. Le second groupe, plus abondant chez les vertébrés et les protistes, est composé de rétroéléments qui se déplacent par transcription inverse *via* un intermédiaire ARN.

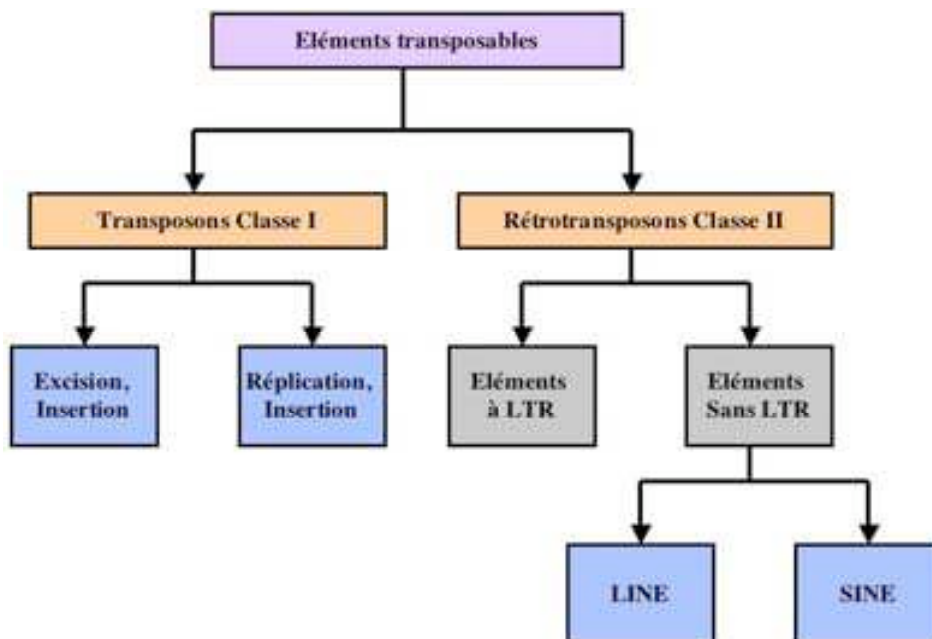


Figure 10 Famille des éléments transposables

Un des premiers rôles biologiques attribué à l'ARN interférence fut la défense du génome de la cellule contre des ARN indésirables comme ceux des virus et des transposons. Chez les animaux, les plantes et *T. brucei*, des siARN de séquence correspondant à des transposons/rétrotransposons ont été isolés (Ambros et al., 2003; Djikeng et al., 2001; Vastenhouw and Plasterk, 2004). Parmi les mutants ARNi décrits au chapitre précédent, nombreux sont ceux qui montrent une dérégulation des éléments transposables (Aravin et al., 2001; Jensen et al., 1999; Ketting et al., 1999; Shi et al., 2004b; Tabara et al., 1999; Tijsterman et al., 2002a; Vastenhouw et al., 2003; Wu-Scharf et al., 2000). Il apparaît que tous les types de transposons (ADN et ARN) sont régulés par l'ARNi au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Lippman and Martienssen, 2004; Shi et al., 2004b; Vastenhouw and Plasterk, 2004).

Chez *S. pombe*, certains gènes uniquement exprimés lors de la méiose sont proches aux rétrotransposons à LTR (distance inférieure à 7kb). Les mutants ARNi ou la délétion de ces rétroéléments affectent l'expression des gènes flanquants en inhibant la formation de l'hétérochromatine (Schramke and Allshire, 2003). L'association des éléments mobiles et de l'ARNi dans ce modèle suggère que la cellule eucaryote pourrait également utiliser les éléments mobiles pour réguler les gènes par formation d'hétérochromatine.

I.A.7. Applications en génomique fonctionnelle

Le séquençage des génomes de nombreux organismes a conduit à l'identification d'une multitude de gènes de fonction inconnue. La découverte de l'ARNi permet d'étudier facilement les fonctions de ces gènes parfois à des vitesses records en comparaison aux méthodes classiques comme la délétion (knockout). Aujourd'hui, l'ARN interférence est utilisée de façon courante en recherche fondamentale, biomédicale et pharmaceutique pour inhiber l'expression d'un gène donné. Il faut préciser que l'extinction des gènes par ARN interférence est rarement complète, on parle donc de "knock down" pour distinguer du "knock out" qui provient de la délétion d'un gène.

Les méthodes les plus efficaces ont permis des criblages à « haut débit » chez de nombreux organismes. Chez le nématode *C. elegans*, une des méthodes les plus simples consiste à nourrir le ver avec des bactéries exprimant l'ARNdb du gène désiré, ce qui permet d'éteindre le gène dans la plupart des tissus (Fire et al., 1998; Timmons et al., 2001; Timmons and Fire, 1998). Cette méthode a permis d'inactiver près de la totalité des gènes du nématode (>17.000) par une équipe de moins de 10 personnes (Kamath et al., 2003). Chez les plantes, la découverte du VIGS a été exploitée pour mettre au point de nombreux vecteurs viraux (Waterhouse and Helliwell, 2003). Des banques d'ADNc ont ainsi été clonées et ont mené à l'obtention de près de 5000 mutants (Lu et al., 2003). Une banque de mutants inductibles pour la génétique directe a également été réalisée chez *Trypanosoma brucei* (Morris et al., 2002). D'autres méthodes courantes d'introduction de l'ARNdb utilisent la micro-injection ou encore l'électroporation.

Chez les mammifères, les chercheurs rencontrent plus de difficultés car la présence d'ARNdb de plus de 30pb induit une réponse non-spécifique de séquence aux interférons générant l'apoptose (Bridge et al., 2003). La plupart des travaux sur le sujet se sont donc concentrés sur l'introduction de siARN synthétisés *in vitro*, puis introduits dans les cellules en culture. Cependant, la plupart des cellules mammifères n'intègrent pas spontanément les acides nucléiques, les ARN doivent d'abord être complexés par divers agents comme les lipides cationiques pour rentrer dans les cellules. Ces siARN synthétiques peuvent générer une inhibition efficace de l'expression du gène homologue pour quelques générations cellulaires.

L'extinction du gène par ARNi est transitoire, l'effet est maintenu généralement pendant 2 à 3 générations cellulaires. De plus, cet effet transitoire présente parfois une efficacité relative. De nombreux vecteurs ont donc été construits pour exprimer de l'ARNdb dans la cellule. Actuellement, il existe deux familles de vecteurs: le premier type produit de l'ARN sens et antisens qui s'apparient dans la cellule pour former de l'ARNdb; l'autre type produit de l'ARNdb en épingle à cheveux (« short hairpin », shARN). Ces shARN sont pris en charge dans la cellule qui enlève la boucle pour produire les siARN. Les shARN peuvent être exprimés par des vecteurs de type rétroviral, adénoviral et lentiviral et ont l'avantage de générer une inhibition durable de l'expression du gène ciblé (An et al., 2003). Cette approche a aussi permis des cribles haut débit chez l'homme (>9000 gènes) et la souris (>5000 gènes) (Paddison et al., 2004).

Cependant, ces méthodes ont des limites, seulement un tiers des shARN produit un effet sur l'ARN cible. De plus, des études chez les mammifères montrent que l'ARNi n'est pas toujours spécifique et peuvent activer la voie des interférons (Sledz et al., 2003; Sledz and Williams, 2004).

I.A.8. Applications thérapeutiques

Les technologies de puces à ADN sont capables de détecter le niveau d'expression de beaucoup de gènes dans les génomes. Malgré les artefacts possibles, il est possible d'étudier par criblage à grande échelle les conséquences de l'inactivation de gènes. Ces études ouvrent de nombreuses portes à la recherche publique et privée pour l'étude de maladies connues pour réprimer ou surexprimer l'expression de gènes. Cette approche a déjà été utilisée avec succès sur l'étude, le traitement ou encore le dépistage de certains cancers (Aza-Blanc et al., 2003; Brummelkamp et al., 2003; Tewari and Vidal, 2003). Une autre méthode consiste à utiliser des pressions sélectives à l'aide de vecteurs viraux générant l'ARNi (Berns et al., 2004).

Ces approches permettent d'identifier la fonction de nouveaux gènes pouvant servir pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Le potentiel de l'utilisation de l'ARN interférence dans le domaine clinique est important. L'ARNi pourrait être utilisé comme traitement pour cibler des gènes clefs impliqués dans des maladies d'origine virale, cancéreuse ou encore inflammatoire. La difficulté majeure de ce traitement, déjà rencontré auparavant avec la stratégie antisens, sera de pouvoir délivrer de l'ARNdb aux tissus appropriés.

Des résultats encourageants montrent chez la souris qu'on peut administrer par simple injection ou encore *via* un vecteur d'origine virale. L'injection d'ARNdb ou d'ADN codant pour du shARN dans la veine porte de la souris adulte bloque efficacement l'expression d'une protéine du virus de l'hépatite C (McCaffrey and Kay, 2002) ou du virus de l'hépatite B (McCaffrey et al., 2003) ou de la protéine Fas (importante pour l'induction de la mort cellulaire programmée)(Song et al., 2003a).

Récemment, l'injection intraveineuse chez la souris de siARN, modifiés chimiquement et ciblant le gène pour l'apolipoprotéine B (apoB), réduit significativement l'ARNm correspondant dans certains organes. L'effet s'ensuit d'une réduction de la protéine apoB dans le plasma et une réduction du taux de cholestérol (Soutschek et al., 2004). Toujours chez la souris, l'introduction dans la cavité nasale de siARN suffit à inhiber les infections par le virus du parainfluenza (« parainfluenza virus » ou PIV) ou du virus respiratoire syncytial (« Respiratory syncytial virus » ou RSV). Ce virus est connu pour induire des problèmes respiratoires chez les nourrissons (Bitko et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Ces résultats *in vivo* démontrent un potentiel thérapeutique bien réel pour le traitement de maladies dans le futur...

Introduction

2^{ème} partie

Le trypanosome africain

I.B Modèle d'étude : *Le trypanosome africain*

I.B.1. L'ordre des Kinétoplastidés

Les Kinétoplastidés sont un groupe de protozoaires flagellés défini par la présence d'une mitochondrie unique de grande taille, contenant une quantité considérable d'ADN. Très tôt, des chercheurs observèrent au microscope à contraste de phase des éléments ressemblant à des granules de basophiles localisés près du corps basal, du flagelle. Alexeieff donna un nom à cette structure : le kinétoplaste (Alexeieff, 1917).

L'analyse par microscopie électronique démontre l'association de la mitochondrie avec une très importante quantité d'ADN mitochondrial (Vickerman, 1969). La présence du kinétoplaste est facile à détecter en fluorescence avec des colorants de l'ADN comme le DAPI ou le Giemsa. Les organismes appartenant à ce groupe furent classés dans l'ordre des kinétoplastidés. Cet ordre appartient au phylum des Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1993). Ce classement fut confirmé par de nombreux travaux phylogénétiques sur l'ARN ribosomique montrant ainsi que la branche des Euglenozoa est un groupe monophylétique à part qui a divergé très tôt de la branche principale des eucaryotes (Maslov et al., 1999). La taxonomie des Kinétoplastidés est basée sur leur morphologie et leur cycle de vie. Le groupe est subdivisé en deux sous-ordres: Bodonidés et Trypanosomatidés.

Les Trypanosomatidés comprennent des organismes exclusivement parasites dotés d'un seul flagelle. Ils parasitent toutes les classes de vertébrés, certains insectes et certaines plantes (Maslov et al., 2001). Les parasites les plus connus sont ceux responsables de maladies chez l'homme : *Leishmania* (leishmanioses), *Trypanosoma cruzi* (maladie de Chagas) et *Trypanosoma brucei* (maladie du sommeil).

I.B.2. Le trypanosome africain

I.B.2.a L'agent responsable de la maladie du sommeil

Les premières traces parlantes de la maladie du sommeil viennent du Niger au XIV^{ème} siècle dans les écritures de l'Histoire de l'Afrique du Nord de l'historien Ibn Khaldoun (connu sous le nom d'Avicen Averoes). La première description des symptômes de la trypanosomiase africaine en Guinée fut effectuée par Atkins en 1734. L'association avec l'agent responsable, le trypanosome, a été documentée en 1902 par Forde. Le médecin y décrit le cas d'un homme européen de 42 ans dans une colonie Gambienne (Forde, 1902). Le patient subit de fortes fièvres et des malaises conduisant Forde à faire un premier diagnostic de la malaria. Plus tard, Dutton identifia le parasite dans le sang d'un patient ayant séjourné en Gambie et le nomma *Trypanosoma brucei gambiense*. En 1910, une autre espèce responsable de la maladie du sommeil en Rhodésie (aujourd'hui le Zimbabwe) fut nommée *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Stephens, 1910). Des expériences décrites en 1912 montrèrent que la souche *T.b. rhodesiense* est transmise de l'homme à l'animal par la mouche tsé-tsé (Kinghorn, 1912).

Le siècle dernier a connu trois épidémies sévères sur le continent africain: la première a eu lieu de 1896 à 1906, principalement en Ouganda et au Congo, la deuxième entre 1920 et 1960 dans plusieurs pays d'Afrique et la troisième a commencé en 1970 et continue jusqu'à nos jours. Les campagnes de dépistage systématique de la maladie ont eu raison de l'épidémie de 1920 à 1960. Après ce succès, le dépistage et la surveillance se sont relâchés, avec pour conséquence une résurgence importante de la maladie (Source OMS site web : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/fr/>).

La trypanosomiase humaine africaine sévit exclusivement en Afrique subsaharienne. Cette maladie n'existe que dans les régions de répartition de son vecteur, la mouche tsé-tsé (ou glossine). Les populations rurales qui vivent dans cet environnement et dont elles dépendent pour l'agriculture, la pêche, l'élevage ou la chasse, sont les plus exposées aux piqûres de la mouche tsé-tsé. La trypanosomiase humaine africaine frappe les zones rurales et reculées là où les systèmes de santé sont les plus déficients ou inexistantes. Des facteurs socio-économiques comme l'instabilité politique, les déplacements de populations, la guerre et la pauvreté favorisent son expansion. La trypanosomiase évolue au sein de foyers dont la taille peut varier de celle d'un village à celle d'une région entière.

I.B.2.b Répartition géographique de la maladie.

La maladie du sommeil menace plus de 60 millions de personnes dans 36 pays d'Afrique subsaharienne mais seulement 3 à 4 millions de personnes à risque sont sous surveillance. En 1999, près de 45 000 cas ont été déclarés mais l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que le nombre des personnes atteintes est dix fois plus important. Le nombre réel de cas existants devrait être compris entre 300 000 et 500 000 personnes. Dans de nombreuses provinces de l'Angola, de la République Démocratique du Congo, et du Sud Soudan, la prévalence de la maladie se situe entre 20% et 50% dans certains villages et provinces. La maladie du sommeil est devenue la première ou la deuxième cause de mortalité devant l'épidémie du SIDA dans deux provinces de la République Démocratique du Congo (Source OMS).

La trypanosomiase humaine africaine se présente sous deux formes causées par deux sous-espèces de parasites :

- Une forme chronique provoquée par *T. b. gambiense*, on la retrouve dans les pays d'Afrique centrale et de l'Ouest. La durée d'évolution est variable pouvant aller de quelques mois à quelques années. Une personne peut être infectée pendant une longue période sans que n'apparaissent chez elle les symptômes de la maladie. Quand ces derniers surviennent, la maladie est déjà à un stade avancé.

- Une forme aiguë provoquée par *T.b. rhodesiense* se retrouve dans les pays d'Afrique australe et orientale. Elle provoque une infection qui se déclare au bout de quelques semaines. Plus virulente que la première, son évolution est plus rapide et par conséquent, sa détection sur le plan clinique doit se faire plus précocement pour éviter une issue fatale.

I.B.2.c Symptômes de la maladie

Après la piqûre d'une glossine infectée (**figure 11**), les trypanosomes se multiplient dans le système sanguin lymphatique. Le premier stade de la maladie est caractérisé par des poussées de fièvre, des malaises accompagnés de maux de tête, de douleurs articulaires et l'apparition de ganglions cervicaux qui sont les signes les plus évocateurs de la maladie. Les traitements existent, dont le mélarsoprol, mais leur toxicité entraîne le décès du malade dans 10% des cas. Toutefois, si le patient n'est pas traité, l'issue est toujours fatale. Cependant, même après un traitement réussi, les patients gardent des séquelles neurologiques invalidantes.



Figure 11
Glossine (Mouche tsé-tsé)
Taille de 3 à 5 mm.



Figure 12
Animal atteint de trypanosomiase
africaine

I.B.2.d Trypanosomiase animale et réservoir animal

La trypanosomiase a également une forme animale causée par d'autres sous-espèces de parasites, pathogènes pour l'animal et en général différents de ceux qui sont à l'origine de la trypanosomiase humaine africaine. La trypanosomiase bovine africaine est causée principalement par *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax* et dans une moindre mesure par *Trypanosoma brucei brucei* qui est un trypanosome africain polymorphe et non-infectieux pour l'homme. L'absence de pathogénicité pour l'homme de cette sous-espèce est seulement due à la mutation d'un gène codant pour une protéine conférant la résistance au sérum humain: la SRA pour "Serum Resistance Associated" (Van Hamme, 2003). Les animaux peuvent être donc des réservoirs de la maladie humaine en abritant les parasites, en particulier *T. b. rhodesiense*.

Chez le bétail, la trypanosomiase bovine africaine porte aussi le nom de nagana (nommée aussi surra, dourine ou mal de caderas) et représente probablement l'entrave majeure à l'amélioration de la productivité du bétail. L'aspect général de la maladie chez l'animal est similaire à l'infection chez l'homme, elle est souvent fatale si l'animal est laissé sans traitement (**figure 12**). Les animaux atteints d'infections chroniques présentent une faible productivité incluant une croissance limitée, une fertilité réduite, une diminution de la production laitière et une faible aptitude aux travaux agricoles. Environ 50 millions d'animaux sont vulnérables à la nagana et trois millions de têtes de bétail périssent chaque année (Sources Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et OMS). En outre, les formes humaine et animale de la maladie restent un obstacle majeur au développement des régions rurales de l'Afrique subsaharienne dans des pays déjà extrêmement pauvres.

I.B.2.e Cycle du parasite

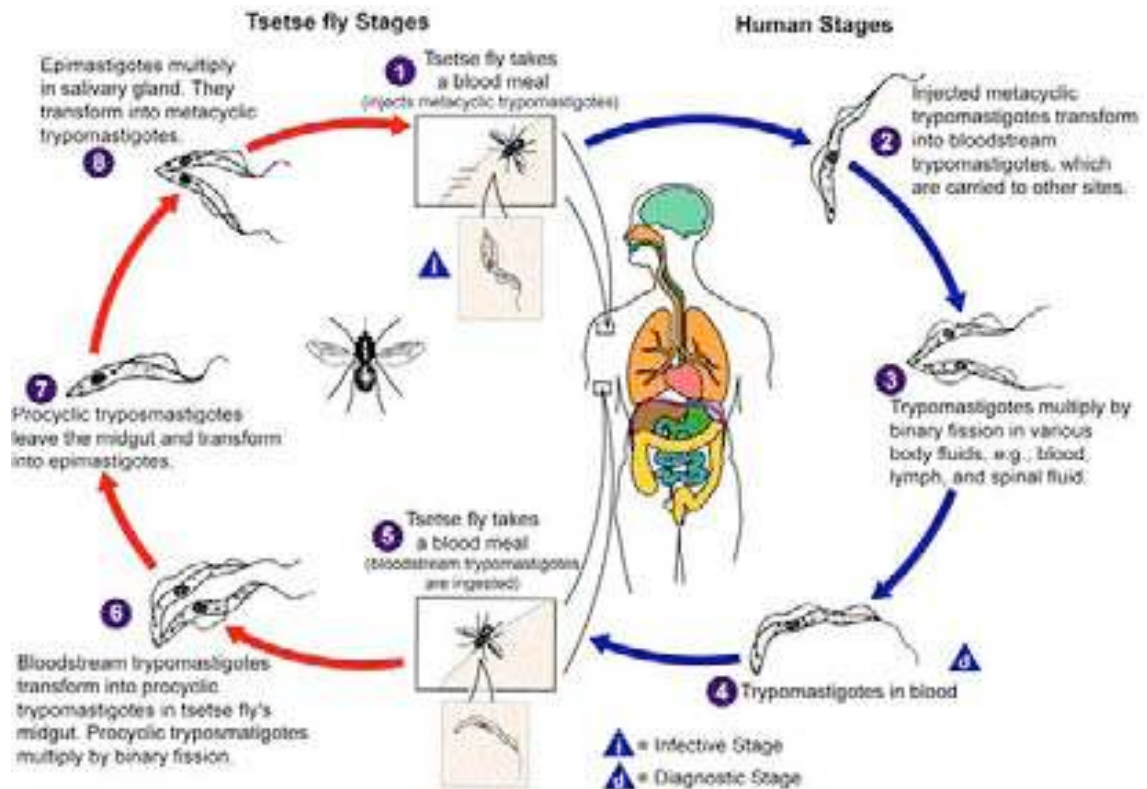


Figure 13

Cycle du trypanosome africain

- 1) L'hôte humain est infecté après piqûre par la mouche tsé-tsé qui transmet le trypanosome au stade métacyclique (stade infectieux).
- 2) Le stade métacyclique, infectieux mais non répliatif, donne rapidement naissance à la forme sanguine ou « Long Slender » qui prolifère au niveau du site d'inoculation. Ce processus conduit à la formation d'un chancre primaire.
- 3) Les trypanosomes finissent par entrer dans le sang *via* le système lymphatique et continuent à se multiplier. Par ce biais, ils peuvent également rentrer dans le système nerveux central.
- 4) Durant les pics de parasitémie des « Long Slender », une partie se différencie en forme non répliatif appelée « Short Stumpy ».
- 5) Cette forme non répliatif, pré-adaptée à la survie dans l'insecte, peut infecter la mouche tsé-tsé lors d'un repas sanguin.
- 6) Les trypanosomes se différencient alors en forme procyclique et prolifèrent dans l'espace péritrophique de l'intestin de la mouche (Vickerman et al., 1985) (Van Den Abbeele et al., 1999).
- 7-8) Le parasite adopte une forme non répliatif et progresse après plusieurs stades de différenciation et de migration vers les glandes salivaires. Le trypanosome se différencie en forme épimastigote, capable de prolifération après attachement à l'épithélium des glandes salivaires et se transforme en forme métacyclique capable d'infecter un nouvel hôte.

I.B.3. Caractéristiques cellulaires et moléculaires des trypanosomes

En dehors de l'intérêt évident en tant que pathogène, *T. brucei* représente aussi un modèle de choix pour étudier différents mécanismes biologiques. Une des contributions les plus remarquables du trypanosome à la communauté scientifique reste la découverte et l'étude de la structure, de la biosynthèse et de la fonction des attaches membranaires glycosylphosphatidylinositol (ancres GPI). Plusieurs équipes y développèrent le concept de l'ancrage des protéines aux membranes par des liens covalents à des phospholipides vers la fin des années 70. Ces observations ont permis de faire avancer considérablement la recherche et de généraliser ce phénomène aux autres eucaryotes (Ferguson, 1999).

D'autres découvertes comprennent l'édition des ARN de la mitochondrie, le *trans* épissage ou l'expression mono-allélique. Plus récemment, l'analyse du flagelle et l'application de l'ARNi a renforcé l'intérêt d'étudier cette cellule sophistiquée.

I.B.3.a Une cellule eucaryote sophistiquée

Le trypanosome est un parasite digénétique, c'est-à-dire qu'il alterne entre deux hôtes où il adopte des formes différentes: la forme sanguine dans le sang d'un mammifère (milieu riche en nutriments mais doté d'un système immunitaire sophistiqué) et la forme procyclique dans le tube digestif de la mouche tsé-tsé (milieu hostile). Les changements abrupts d'environnements conditionnent une différenciation indispensable du parasite pour survivre (Matthews, 1999; Matthews 2005). Ces changements impliquent des modifications de protéines de surface du manteau, la procycline chez l'insecte et la VSG (pour «Variant Surface Glycoprotein») chez le mammifère. Le remplacement régulier des protéines VSG, ou variation antigénique, permet d'échapper au système immunitaire du mammifère (Vanhamme and Pays, 2004).

Le trypanosome a été choisi comme modèle cellulaire d'étude de l'ARN interférence pour plusieurs raisons. En premier lieu, l'ARNi y est très efficace, le trypanosome fut l'une des premières espèces où l'ARNi a été démontré (Bastin et al., 2000; Bastin et al., 1998; Ngo et al., 1998), et depuis de nombreux gènes ont été ciblés par ARNi (Durand-Dubief et al., 2003; Kohl et al., 2003a; Motyka and Englund, 2004).

Cet organisme eucaryote unicellulaire est un modèle de choix pour l'étude des régulations génétiques post-transcriptionnelles, puisque le contrôle de l'expression génétique s'effectue majoritairement à ce niveau (Clayton, 2002). De plus, l'organisme est aisé à manipuler et à maintenir en culture, et son génome est de taille modeste (35 mégabases et entièrement séquencé, cf geneDB : <http://www.genedb.org/genedb/tryp/>). La génomique fonctionnelle y est remarquablement bien développée, il ne possède pas d'intron, ce qui facilite l'identification et le clonage des gènes. Dans les pages suivantes, nous développerons les caractéristiques moléculaires et cellulaires du trypanosome.

I.B.3.b Structure générale

T. brucei possède un noyau diploïde avec une membrane nucléaire et des organites: un *reticulum* endoplasmique, un appareil de Golgi, un réseau endo- et exo-cytaire, une mitochondrie unique et un flagelle.

Le schéma de la **figure 14** représente une cellule au stade procyclique, qui mesure approximativement 20 μm de long et 5 μm de large. Les trypanosomes possèdent un seul flagelle responsable de la mobilité et contenant un axonème classique avec 9 doublets et une paire centrale de microtubules. Ce flagelle émerge de la poche flagellaire et est attaché le long du corps cellulaire à l'exception de l'extrémité distale (Kohl and Bastin, 2005).

À la base du flagelle se trouve le corps basal (équivalent du centriole) et le kinétoplaste. La mitochondrie est volumineuse et change de morphologie en fonction des stades de différenciation du trypanosome. Elle contient de l'ADN très condensé et dont la réplication est étroitement couplée au cycle cellulaire. Cet ADN mitochondrial est attaché au corps basal dont la ségrégation assure également celle du génome mitochondrial (Robinson and Gull, 1991). Sous la membrane plasmique, se trouve un corset de microtubules très organisé conférant à la cellule sa forme originale (Gull, 1999).

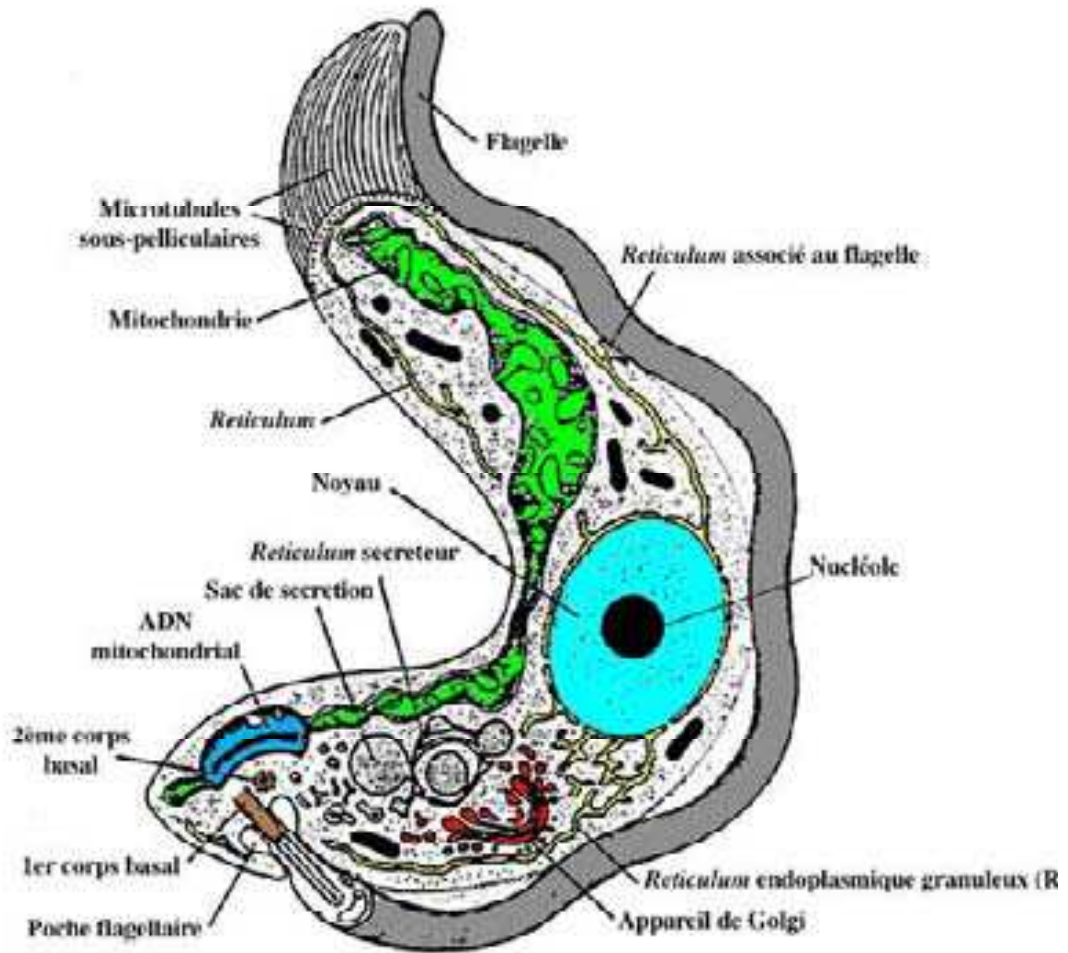


Figure 14

Organisation de la cellule procyclique chez *Trypanosoma brucei*

(adaptée d'après Vickerman 1969)

1.B.3.c Cycle cellulaire

La description classique du cycle cellulaire des eucaryotes comporte quatre périodes principales relatives à l'activité nucléaire (**figure 15 et 16**): Une phase G1, une phase S de synthèse d'ADN et une phase G2 suivie de la mitose (phase M).

- 1- Chez les trypanosomes, au cours de la phase G1, le premier signe morphologique est l'élongation du pro-corps basal à partir duquel est initiée la formation du second flagelle (Sherwin et al., 1989).
- 2- La phase S existe à la fois pour le noyau (Sn) et pour le kinétoplaste (Sk). L'initiation des phases S de synthèse de l'ADN nucléaire (Sn) et du kinétoplaste (Sk) coïncide approximativement avec la réplication des corps basaux. Les deux pro-corps basaux sont formés simultanément et demeurent étroitement liés à leur corps basal mature respectif.
- 3- Lors de la phase G2 nucléaire s'effectue en parallèle la division du kinétoplaste. Cette division se fait par expansion latérale sans perte apparente de l'intégrité de la structure du kinétoplaste.
- 4- La cellule entre alors en mitose (M) qui est suivie d'une phase post-mitotique étendue.

Durant la mitose nucléaire du trypanosome, la membrane nucléaire et le nucléole ne sont pas désassemblés, comme c'est le cas chez beaucoup d'autres protozoaires (Ogbadoyi et al., 2000).

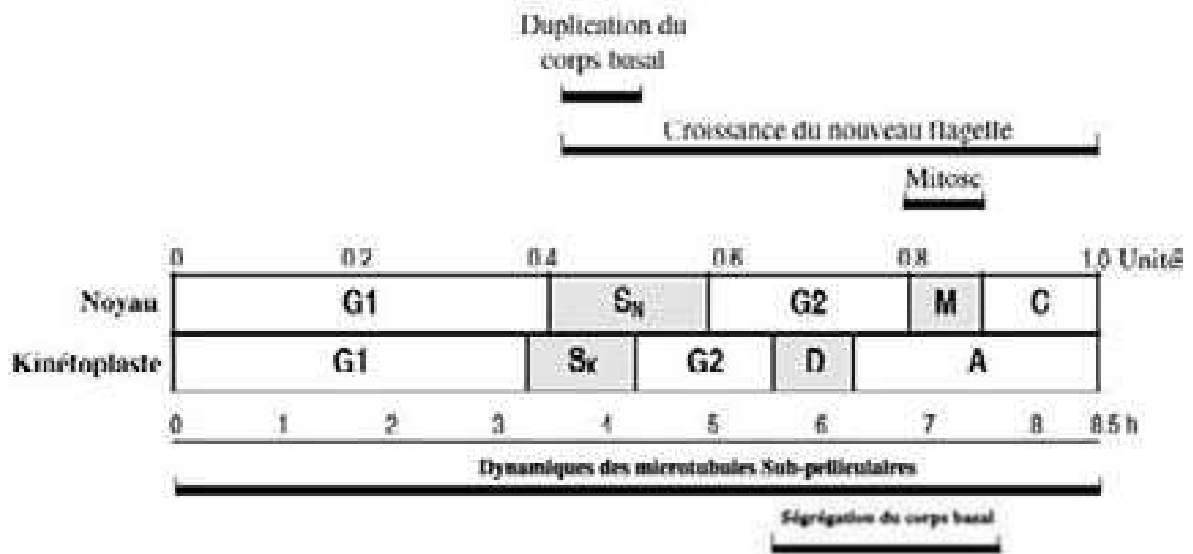


Figure 15

Description des différentes phases du cycle cellulaire en relation avec l'activité du noyau et du kinétoplaste chez la forme procyclique de *T. brucei* en culture.

C: cytotidièrese; D: division du kinétoplaste; M: mitose; A: phase d'arrêt du cycle du kinétoplaste. Le cycle cellulaire de la forme procyclique de *T. brucei* en phase exponentielle de croissance est d'environ 8,5 heures (d'après Ploubidou et al., 1999)

La durée inhabituelle de la cytotidièrese, en comparaison avec d'autres espèces eucaryotes, est due à la forme longue et étroite de *T. brucei* avec une morphologie strictement contrôlée par le corset de microtubules sous-pelliculaires qui demeure intact pendant tout le cycle cellulaire (Ploubidou et al., 1999).

Chez le trypanosome, la cytokinèse est liée à la duplication et la ségrégation du kinétoplaste et non pas du noyau (Ploubidou et al., 1999). Ainsi, des cellules qui ont dupliqué et ségrégé leurs kinétoplastes mais ayant une mitose nucléaire retardée, peuvent effectuer la cytokinèse. Ce phénomène va alors générer une cellule fille sans noyau mais avec un kinétoplaste (zoïde) et une autre cellule fille avec un kinétoplaste et un ou deux noyaux si la mitose a pu être complétée (Ploubidou et al., 1999).

L'élongation du flagelle est également un événement crucial pour le bon déroulement du cycle cellulaire car il intervient dans l'initiation du clivage des cellules filles. Le cas d'un flagelle trop court génère une cellule fille plus courte. D'autre part, lorsqu'un des flagelles est absent, on observe une coupure lente et difficile ; mais si les deux flagelles sont absents, il n'y a pas de coupures entre les cellules filles (Kohl et al., 2003b; Kohl and Bastin, 2005).

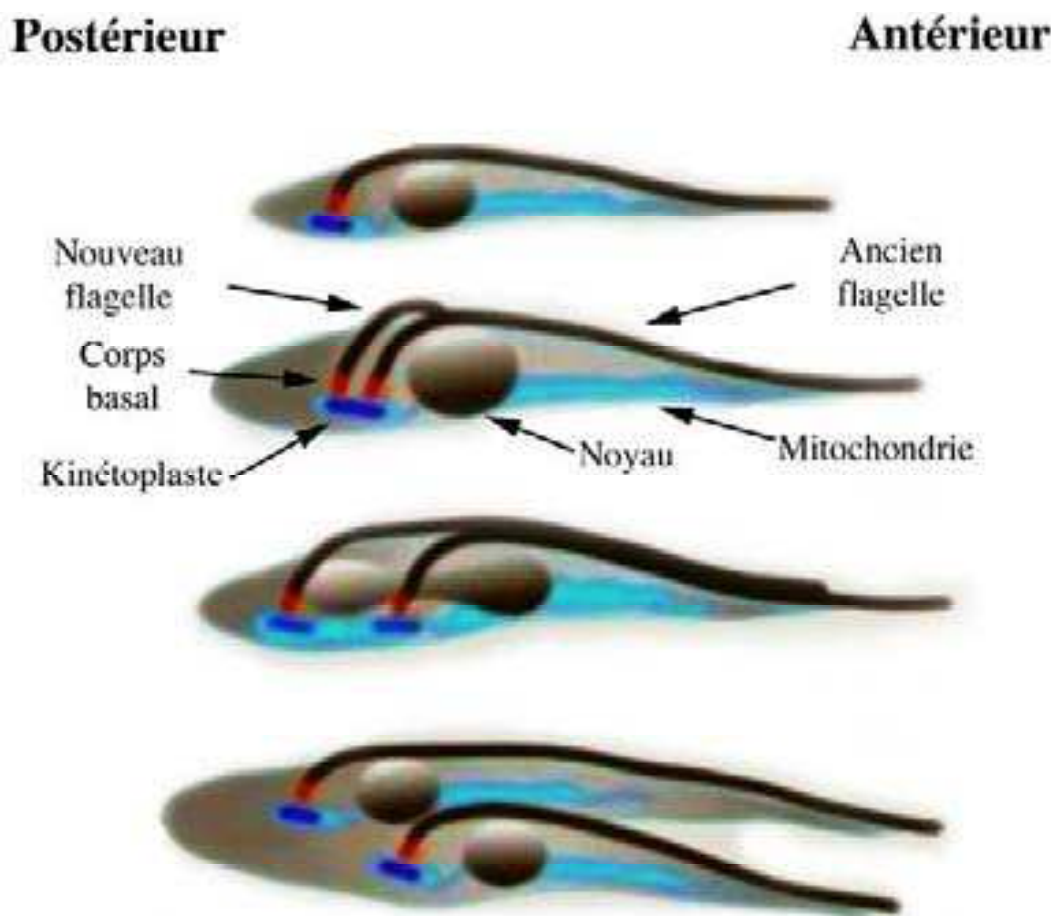


Figure 16

**Représentation schématique du cycle cellulaire d'une cellule de
Trypanosoma brucei procyclique**

(adaptée du site internet de Keith Gull ; <http://users.path.ox.ac.uk/~kgull/>)

I.B.3.d Génomes

Nous détaillerons ici les caractéristiques des deux génomes du trypanosome: celui du kinétoplaste de la mitochondrie et le génome nucléaire.

Le noyau en interphase de *T. brucei* a un diamètre avoisinant 3 μm .

I.B.3.d.1 Génome mitochondrial

Le réseau atypique d'ADN de la mitochondrie est composé de maxicercles et minicercles entrelacés constituant 10 à 20% de l'ADN total de l'organisme. Il contient 25 à 50 maxicercles (de 20 à 38 kb) et de 5000 à 10000 minicercles (0,7 à 2,4 kb) (**figure 17**)(El-Sayed et al., 2000; Englund et al., 1982; Ferguson et al., 1994).

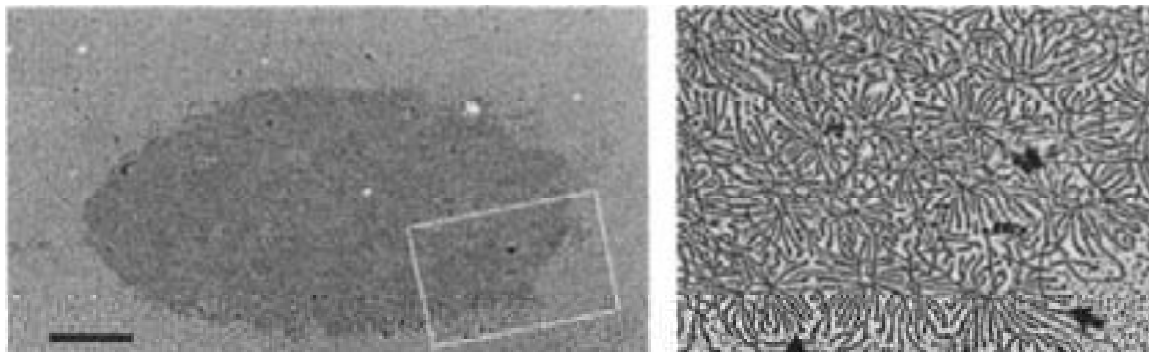


Figure 17

Réseau de minicercles et de maxicercles de l'ADN mitochondrial de *T. brucei*

Phase de pré-réplication de l'ADN du kinétoplaste de *Trypanosoma brucei*. Barre, 1 μm . A gauche vue globale, à droite agrandissement (Ferguson JCB 1994)

Les maxicercles du kinétoplaste contiennent les gènes codant pour les protéines mitochondriales et sont équivalents à l'ADN mitochondrial des autres eucaryotes. Cependant, la fonction des minicercles, éléments très hétérogènes et non codants, est longtemps restée un mystère jusqu'à la découverte de l'édition des ARN messagers codés par l'ADN mitochondrial (Borst, 1991). La fonction des minicercles est de transcrire des ARN guides qui serviront de matrice pour l'insertion et la délétion d'uridines sur certains transcrits des maxicercles. Ce processus a été appelé « RNA editing » ou édition des ARN (Stuart et al., 1997).

***I.B.3.d.2* Génome nucléaire**

La membrane possède de nombreux complexes de pore nucléaire, mais l'équivalent d'une structure en lamine n'a pas été identifié. Le noyau contient un seul large nucléole de 0,5 à 1 μm de diamètre (Ersfeld et al., 1999). Le génome haploïde de *T. brucei* est composé d'environ 35Mb avec une variation de 25% selon les souches (Gibson et al., 1992; Hope et al., 1999; Kanmogne et al., 1997; Van der Ploeg et al., 1989)

Le génome nucléaire de la souche de TREU927/4 de *T. brucei* (proche de la souche 427 procyclique cultivée au laboratoire) séquencé par le consortium posséderait environ 10.000 gènes (Source GeneDB Juillet 2004)(El-Sayed et al., 2003; Hall et al., 2003b). À l'exception d'un seul gène codant pour une ARN polyA polymérase (Mair et al. RNA 2000), aucun des gènes codant pour des protéines ne possède d'introns (Schneider et al., 1994). Près de 50% du génome sont codants et les gènes de ménages de fonctions diverses sont souvent regroupés (el-Sayed and Donelson, 1997). Les copies silencieuses de VSG sont localisées dans la plupart des chromosomes et représentent environ 5% du génome nucléaire (Donelson, 1996).

Chez *T. brucei*, les chromosomes nucléaires ne condensent pas durant la mitose, ce qui ne permet pas d'utiliser les méthodes classiques de cytologie pour compter leur nombre. Pour résoudre ce problème, l'ADN génomique nucléaire a été séparé sur gel d'électrophorèse en champ pulsé (« Pulsed Field Gel Electrophoresis » ou PFGE)(Van der Ploeg et al., 1984), la technique permettant de séparer des molécules de 100 kb à plusieurs Mb.

Le génome nucléaire de *T. b. brucei* contient environ 120 chromosomes (Ersfeld et al., 1999; Van der Ploeg et al., 1984) classés en 3 tailles selon leur migration en PFGE : les grands chromosomes (1 à 6Mb), les chromosomes intermédiaires (200 à 900 kb) et les minichromosomes (50 à 150 kb). Les grands chromosomes sont diploïdes (Hope et al., 1999; Melville et al., 1998; Tait et al., 1989) alors que les chromosomes intermédiaires et les minichromosomes ont une ploïdie incertaine.

I.B.3.d.2.1 Les grands chromosomes

Au moins 11 paires de grands chromosomes numérotées du plus petit I (~1 Mb) au plus grand XI (~6 Mb), sont recensées (Melville et al., 1998; Turner et al., 1997). Les chromosomes homologues n'ont pas toujours la même taille, le dimorphisme entre homologues pouvant aller jusqu'à 1Mb (Melville et al., 1999). Les causes de ce polymorphisme seraient dues en partie aux réarrangements des VSG et des ES (sites d'expression) et à la présence de rétrotransposons sans LTR (*ingi*/RIME), ou de séquences répétées (El-Sayed et al., 2000; Wickstead et al., 2003b). Dans le cas du chromosome I de la souche TREU927/4, le polymorphisme entre les deux chromosomes hétérologues Ia et Ib est principalement dû aux rétrotransposons *ingi*/ RIME (Melville et al., 1999).

Chez *T. brucei*, les grands chromosomes sont organisés de la même manière : les sites B-ES (sites d'expression de VSG et gènes associés de la forme sanguine) et M-ES (sites d'expression de la forme métacyclique) sont localisés de part et d'autre aux extrémités des chromosomes (**figure 18**). Au niveau des télomères, les paires de grands chromosomes posséderaient des séquences uniques pour les ES (El-Sayed et al., 2000).

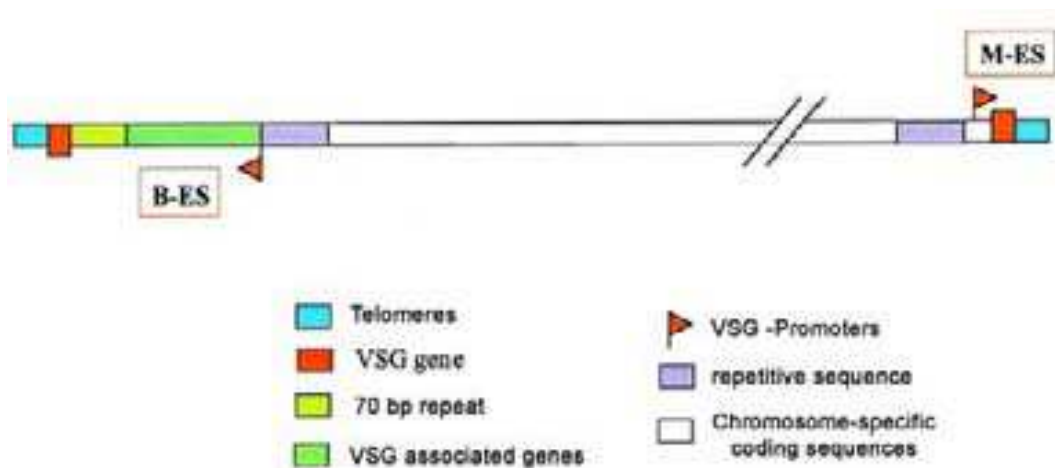


Figure 18

Organisation générale d'un grand chromosome chez *T. brucei*

(Adaptée de El-Sayed et al., 2001 ; Gull, 2001)

I.B.3.d.2.2 Les minichromosomes

Selon les sous-espèces de *T. brucei*, le nombre de minichromosomes peut atteindre la centaine, représentant jusqu'à 10% de l'ADN nucléaire. Ces minichromosomes ont une taille comprise entre 50 à 150 kb, sont linéaires et possèdent à leurs extrémités les répétitions télomériques (TTAGGG)_n. Cependant, ces répétitions télomériques sont plus nombreuses que dans les autres types de chromosomes. Les minichromosomes sont essentiellement composés d'une séquence interne répétée palindromique de 177pb qui constitue parfois plus de 90% de leur ADN. D'autres répétitions riches en bases GC ou en AT sont présentes entre les répétitions télomériques et les répétitions internes de 177pb (figure 19)(Weiden et al., 1991; Wickstead et al., 2004).

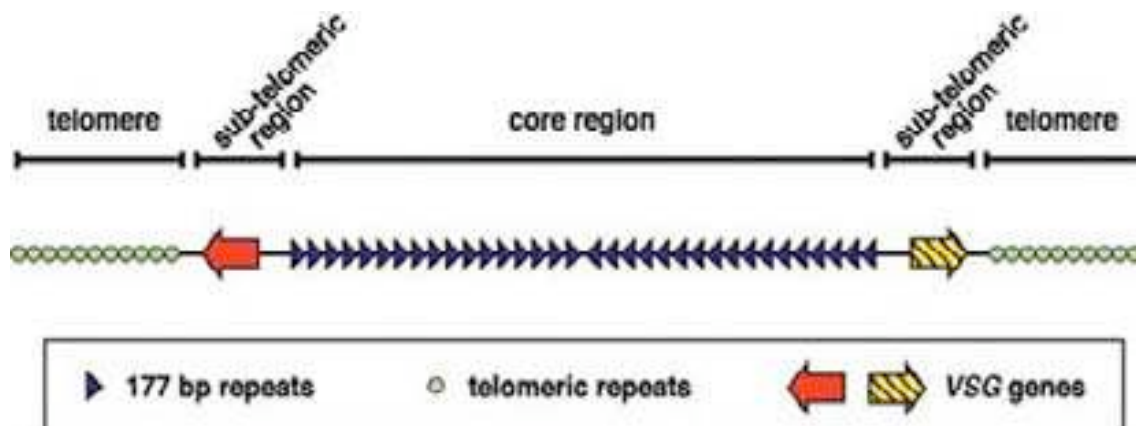


Figure 19

Structure canonique d'un minichromosome de *T. brucei*

(d'après Wickstead et al., 2004)

La plupart des minichromosomes contiennent de part et d'autre de la répétition palindromique, une copie du gène codant pour une protéine VSG fonctionnelle mais qui n'est pas exprimée (Wickstead et al., 2004). Pour être exprimé, un gène silencieux de VSG est transféré sur un chromosome transcriptionnellement actif par duplication ou par un échange de bras télomériques. En effet, des traces de ces recombinaisons ont été trouvées dans deux minichromosomes de 55 et de 60 kb possédant des promoteurs d'ARN ribosomiques localisés près des télomères et provenant d'un locus répété d'un grand chromosome (Zomerdijk et al., 1992). Bien que la ploïdie des minichromosomes ne soit pas bien établie due aux nombreuses répétitions des 177bp, ces éléments sont hérités de façon stable durant la mitose (Ersfeld and Gull, 1997; Wickstead et al., 2003a). Ces chromosomes semblent servir de réservoir de gènes VSG pour la variation antigénique.

1.B.3.d.2.3 Les chromosomes intermédiaires

Cette classe de chromosomes d'une taille comprise entre 200 à 900 kb est mal caractérisée. Leur ploïdie est incertaine et leur nombre et leur taille varient entre les souches. Ils peuvent contenir des gènes codant pour des VSG fonctionnelles, mais qui ne sont pas exprimées (Lips et al., 1993; Rudenko et al., 1998).

I.B.3.e Régulations génétiques

I.B.3.e.1 Régulations transcriptionnelles

I.B.3.e.1.1 ARN polymérase, promoteurs et terminateurs

En règle générale, l'ARN polymérase I est spécifique de la transcription des ARN ribosomiques (ARNr), l'ARN polymérase II transcrit les ARNm et l'ARN polymérase III produit les ARN de transfert (ARNt) et les petits ARN non codants.

On retrouve une situation similaire chez *T. brucei* avec l'exception majeure de l'ARN polymérase I qui peut transcrire les ARNm des VSG et de la procycline. Trois promoteurs recrutent l'ARN polymérase I pour la transcription de gènes codant ces protéines (Vanhamme and Pays, 1995): le promoteur du site d'expression VSG, le promoteur VSG des formes métacycliques, et le promoteur de la procycline EP/GPEET. Bien qu'ayant une activité transcriptionnelle similaire, ces promoteurs ont une faible homologie de séquence mais semblent posséder une structure commune (Horn, 2001; Vanhamme and Pays, 1995).

Sur les 1000 gènes VSG présents dans le génome, seulement 20 peuvent être potentiellement exprimés et sont localisés aux extrémités des télomères sur les grands chromosomes dans des unités de transcription polycistronique (**figure 20**)(Pays and Nolan, 1998).



Figure 20

Organisation d'un gène VSG fonctionnel dans une région télomérique

Ronds bleus : répétitions télomériques. Les répétitions subtélomériques de 50bp et 70bp sont représentées par des triangles. Les ESAG sont des gènes exprimés avec le VSG (d'après Wickstead et al., 2003)

L'organisation du site d'expression permet de transcrire l'ARNm codant pour la protéine la plus abondante de la cellule (10% des protéines chez la forme sanguine) ainsi qu'une dizaine de gènes associés ESAG (Expression Site Associated Genes)(Pays et al., 1989). Pour échapper à la défense immunitaire, les gènes VSG sont exprimés tour à tour de manière exclusive par des changements de site d'expression ou par l'insertion d'une copie d'un autre gène de VSG dans le site actif (réarrangements et/ou « switching »)(Rudenko et al., 1998). La compréhension de ces mécanismes de régulation de l'expression des VSG reste un des buts principaux dans l'étude biologique du trypanosome africain.

Dans le cas de l'ARN polymérase II, il n'y a pas de promoteur connu pour l'expression des ARNm et la transcription des ARNm est effectuée de manière polycistronique (Downey and Donelson, 1999; Gilinger and Bellofatto, 2001; Hartmann et al., 1998). Les transcrits polycistroniques produits par cette polymérase contiennent des gènes qui n'ont généralement pas de lien au niveau fonctionnel. Il semble que l'initiation de la transcription soit effectuée de façon aléatoire mais généralement à prédominance unidirectionnelle, surtout chez *Leishmania* (Myler et al., 1999). Certains travaux indiquent que l'orientation pourrait être guidée par des promoteurs ou par une terminaison de la transcription (Clayton, 2002). Cependant, le seul terminateur identifié à ce jour est celui de la procycline, transcrit par l'ARN polymérase I (Berberof et al., 1996). Le seul promoteur connu pour l'ARN polymérase II est celui d'un ARN non codant mais essentiel à la maturation de tous les ARNm : l'ARN splice-leader (ou mini-exon)(Gunzl et al., 1997). Ce promoteur permet la transcription de ces gènes disposés en long tandem sur le chromosome IX. L'ARN polymérase II transcrit également beaucoup de petits ARN nucléaires (« small nucleolar RNA » ou snRNA)(Dunbar et al., 2000; Xu et al., 2001).

L'ARN polymérase III transcrit les ARN de transfert (ARNt) et quelques snRNA (U2, U3 and U6 snRNA and the 7SL ARN). Similaires aux autres eucaryotes, les promoteurs ont en commun deux blocs de séquence en amont de la région transcrite (Fantoni et al., 1994; Xu et al., 2001).

I.B.3.e.1.2 Caractéristiques des histones

Chez le trypanosome, les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4 sont présentes, mais des différences significatives sont observées au niveau de leur taille et de leur structure primaire par rapport aux autres eucaryotes (Soto et al., 1994; Toro and Galanti, 1990; Toro et al., 1992).

L'histone H1 est d'une taille inhabituelle car son domaine N-terminal est plus court (Aslund et al., 1994; Burri et al., 1993; Burri et al., 1995; Toro and Galanti, 1990). De même, les séquences des parties N-terminale des histones H3 et H4 sont relativement divergentes. L'analyse par hybridation *in situ* d'ARN (« Fluorescence *in situ* Hybridisation » ou FISH) montre que les ARNm des histones H2A, H2B et H4 ne sont exprimés que durant la phase S du cycle cellulaire (Ersfeld et al., 1996).

Normalement extrêmement conservée chez les autres organismes, la disposition de certaines lysines est différente chez le parasite. Ceci est intrigant car les profils d'acétylation sont reconnus comme un des facteurs importants dans le contrôle épigénétique de l'expression des gènes en modulant l'accessibilité à la chromatine (Grunstein, 1997). L'absence de la partie N-terminal de l'histone H1 pourrait expliquer l'absence de condensation de la chromatine lors de la mitose. Ces différences pourraient jouer un rôle très important dans l'extinction ou l'activation des gènes dans le cycle de vie du parasite et particulièrement dans la variation antigénique VSG (Horn and Cross, 1995; Rudenko et al., 1995)

I.B.3.e.2 Régulations post-transcriptionnelles

Chez le trypanosome, la plupart des gènes sont transcrits de façon constitutive par l'ARN polymérase II indiquant que la majorité des régulations est effectuée au niveau post-transcriptionnel (Clayton, 2002; Horn, 2001).

I.B.3.e.2.1 Trans épissage des ARNm

Le *trans* épissage est un mécanisme qui a été décrit pour la première fois chez les trypanosomes (Agabian, 1990). Ce phénomène est connu chez d'autres espèces comme les euglènes, les vers ronds (nématodes) et les vers plats. Ces espèces font cohabiter dans la même cellule les deux types d'épissage (*cis* et *trans*) et peuvent également l'effectuer au niveau d'un même ARN. Dans le cas du nématode *C. elegans*, plus de 15 % des gènes sont exprimés à partir de pré-ARNm polycistronique (Blumenthal and Gleason, 2003).

Chez les trypanosomatidés, tous les ARNm matures possèdent une séquence d'environ 35 nucléotides, le « splice leader » ou « mini-exon » (SL) ajoutée en 5'. Les longs ARN polycistroniques immatures sont transcrits puis *trans* épissés par addition d'une séquence en 5' sur tous les ARNm. Cette maturation rapide de *trans* épissage est couplée à l'addition d'une queue polyA en 3', ce qui génère des ARN monocistroniques matures (**figure 21**)(Clayton, 2002).

Le *trans* épissage fait intervenir également un mécanisme de coiffe (« capping ») pour la maturation des ARNm chez le trypanosome. La coiffe est formée par la méthylation de nucléotides attachés en 5' de l'ARN SL (Ullu and Tschudi, 1991). Par un mécanisme processif, une 7-méthyl guanine est ajoutée en 5' de l'ARN SL par un pont triphosphate, 5'-5' ensuite quatre nucléotides sont ajoutés pour former la coiffe ayant une structure appelée cap4 (Liang et al., 2003a). Ce processus d'addition de l'ARN SL est essentiel à la cellule car la structure de la coiffe permet à l'ARNm d'être dirigé dans les processus de transport vers le cytoplasme pour être traduit. La coiffe peut également réguler l'initiation de la traduction et permettre d'effectuer le *trans* épissage des ARN (Liang et al., 2003a). L'ARN SL dérive de la partie 5' d'un petit ARN nucléaire ("small nuclear RNA" ou snARN) qui est présent au nombre d'environ 300 copies dans le génome (Aksoy et al., 1990)

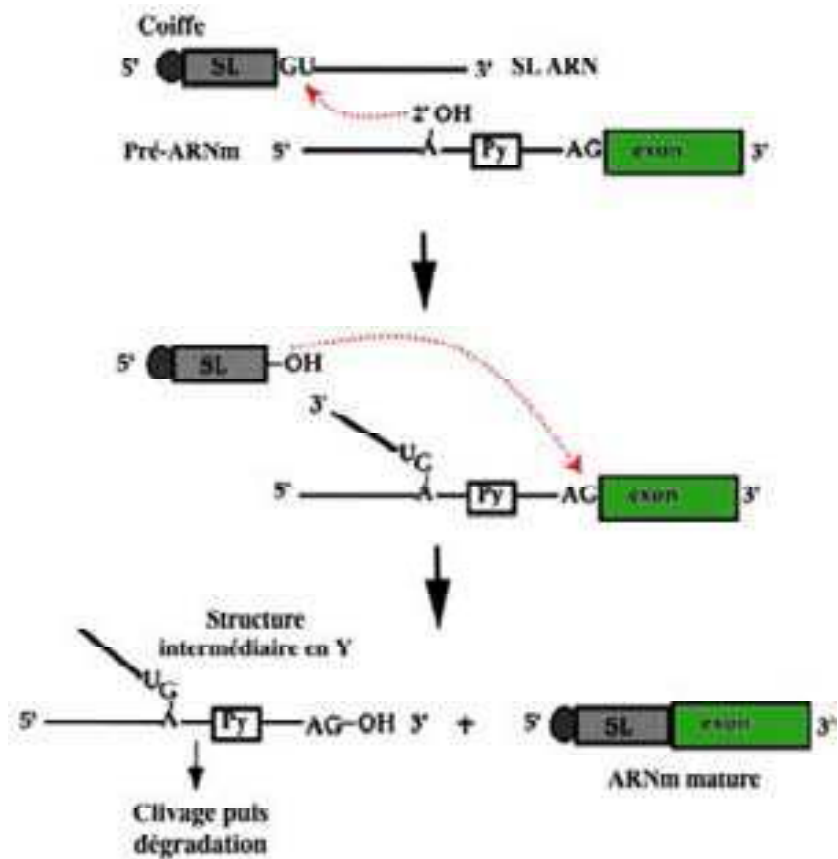


Figure 21

Représentation schématique du mécanisme de *trans* épissage

Le mécanisme de *trans* épissage utilise une adénosine dans l'«intron» du préARNm qui s'attache à l'intersection du spliced leader et de son « intron ». L'« intron » de l'ARN SL se dissocie de l'ARN SL et va s'attacher à l'« intron » de l'ARNm. La partie 3' de l'ARN SL tronquée attaque alors l'intersection de l'ARNm et de son « intron » et les deux « introns » combinés sont alors remplacés par l'ARN SL (Py : suite de polypyrimidine ; SL : spliced leader/mini-exon). (Adaptée de Liang et al., 2003)

L'inhibition de la méthylation de la coiffe par des analogues de la S-adénosyl-méthionine (dont la sinéfungine) entraîne le blocage du *trans* épissage et l'accumulation de grands transcrits non-épissés (**figure 22**)(McNally and Agabian, 1992). Ces processus de maturation ont lieu dans le noyau et s'effectuent sur tous les ARNm polycistroniques.

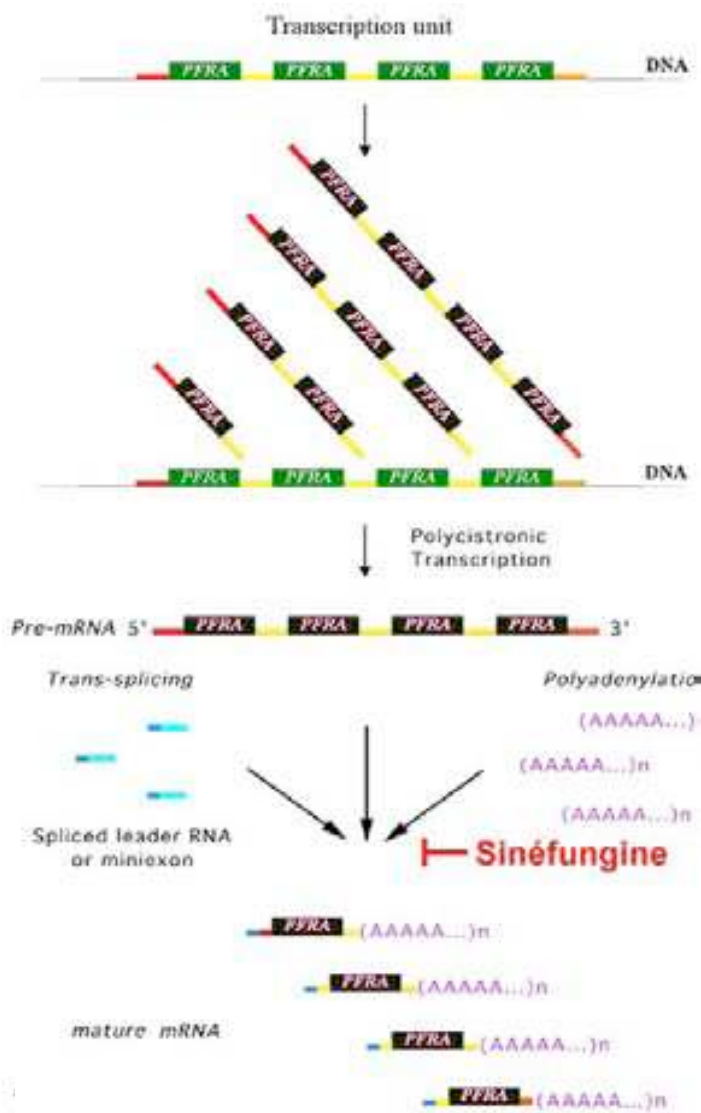


Figure 22

Représentation schématique de la transcription polycistronique et action de la sinéfungine.

Le locus du gène *PFRA* (« Paraflagellar Rod A »), codant pour une abondante protéine de la fibre paraflagellaire, est transcrit par l'ARN polymérase II en une unité polycistronique (Deflorin et al., 1994).

Après maturation (*trans* épissage et polyadénylation) dans le noyau, les ARNm matures sont ensuite exportés dans le cytoplasme pour être traduits.

L'action de la sinéfungine, inhibiteur du *trans* épissage, provoque l'accumulation des transcrits polycistroniques dans le noyau.

I.B.3.e.2.2 Les rétrotransposons sans LTR chez T. brucei

Chez les mammifères, les rétroposons comprennent deux types d'éléments : le type LINE (« long interspersed element ») et le type SINE (« short interspersed element »). La mobilité de ces rétroéléments dans le génome est rare car elle peut induire des mutations parfois létales pour la cellule. Chez l'homme, des insertions de rétrotransposons LINE sont associées avec 35 cas de maladies génétiques (Aksoy et al., 1990). Les éléments mobiles LINE codent pour leur propre transposition et contribueraient à la transposition des éléments SINE. L'abondance de ces rétroéléments peut aller jusqu'à 14 % du génome chez certains organismes et leurs rôles dans la cellule sont encore très mal compris (Kazazian, 2000). Chez *T. brucei*, trois rétroposons sont rencontrés, *Ingi*, RIME et SLACS.

I.B.3.e.2.2.1 Les rétroposons ingi et RIME

Chez *T. brucei*, près de 6% du génome nucléaire est constitué des rétroposons apparentés aux éléments LINE et SINE: *ingi* et RIME (« ribosomal mobile element »). Dans le génome haploïde de *T. brucei*, on dénombre environ 140 copies *ingi* et près de 380 copies de RIME (Bringaud et al., 2002; Murphy et al., 1987; Wickstead et al., 2003b). Le rétroposon *ingi* est d'une taille de 5,2 kb et est constitué d'une partie centrale de 4,7 kb flanquée aux extrémités par deux séquences de 250 bp qui correspondent aux deux moitiés du rétroposon RIME faisant 0,5 kb, (**figure 23 A**)(Hasan et al., 1984; Kimmel et al., 1987). Bien qu'à ce jour, aucun produit de la traduction n'ait été détecté (Garcia-Salcedo et al., 2003), l'élément *ingi* coderait pour une protéine multidomaine de 1646 aa qui serait nécessaire à sa rétrotransposition. Différents domaines identifiés par homologie composent cette protéine : un domaine endonucléase, un domaine de la transcriptase inverse, un domaine ribonucléase H et un domaine à doigt de zinc. Le rétroposon RIME ne coderait pour aucune protéine (Bhattacharya et al., 2002). Ces deux rétroéléments sont dotés d'une queue polyA en 3' et d'un site relativement conservé correspondant au site de duplication (ISD pour « insertion site duplication ») aux extrémités (Murphy et al., 1987).

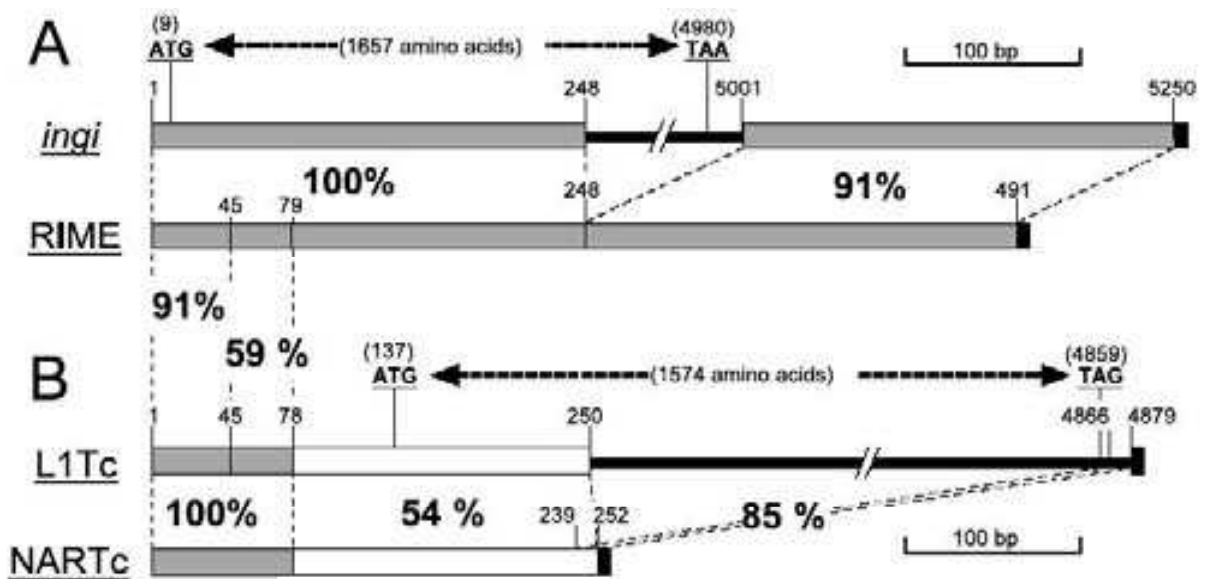


Figure 23

A/ Représentation schématique et alignements des rétroposons intacts *ingi* et RIME chez *T. brucei*. B/ Représentation schématique et alignements des rétroposons intacts L1Tc et NARTc chez *T. cruzi*

La boîte noire aux extrémités représente une séquence polydA (d'après Bringaud *et al.* MBP 2002).

La plupart des *ingi* sont localisés dans les grands chromosomes (Murphy *et al.*, 1987). Ils ont accumulé des mutations étalées dans la séquence codante et ne sont pas potentiellement fonctionnels (Bringaud *et al.*, 2002; Bringaud *et al.*, 2004). Il n'y a pas encore eu de démonstration formelle de la transposition des *ingi* et RIME mais leur présence importante suggère qu'ils pourraient participer au remaniement du génome (El-Sayed *et al.*, 2000).

Les *ingi*/RIME sont fréquemment associés à des familles de gènes répétés incluant les gènes pour les ARN ribosomiques, les répétitions des gènes de l'alpha et la beta-tubuline et la famille de gènes *RHS* (« retrotransposon hot spot »). Les *RHS* sont une grande famille de gènes (128 copies par génome haploïde) qui sont groupées en six sous-familles (*RHS1* à *RHS6*). Ils encodent des protéines de fonction inconnue et majoritairement nucléaire (excepté *RHS2*), avec des motifs liant ATP/ GTP (Bringaud et al., 2002). Environ un tiers des gènes *RHS* contient des éléments RIME et/ou *ingi* insérés au niveau d'une séquence de 12 nucléotides (Bringaud et al., 2002). Ce phénomène crée des sites de recombinaisons à haute fréquence ou « hot spots » et provoque de nouvelles insertions de tandems *ingi*/RIME. À l'exception de *T. cruzi*, qui possèdent les rétroposons L1Tc/NARTc respectivement similaires à *ingi*/RIME (**figure 23 B**), aucun autre organisme connu ne montre ce type d'organisation (Bringaud et al., 2002).

Chez *T. brucei*, les *ingi*/RIME et les gènes/pseudogènes *RHS* sont localisés préférentiellement aux extrémités des sites d'expression potentiels B-ES (exprimant les VSG) (**figure 24**)(Bringaud et al., 2002).

(GeneBD :[http:// www.genedb.org/genedb/trypan/index.jsp](http://www.genedb.org/genedb/trypan/index.jsp)).

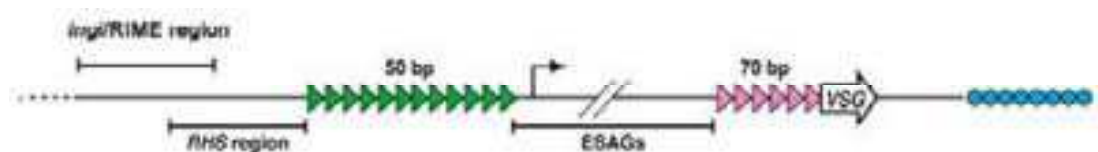


Figure 24

Arrangement fréquent des *ingi*/RIME et gènes *RHS* au site d'expression B-ES

(adapté de Wickstead et al., 2003 ; Bringaud et al., Euk 2002 et GeneDB)

Au point de vue transcriptionnel, les ARN *ingi* et RIME sont beaucoup plus abondants dans la forme sanguine que dans la forme procyclique (Murphy et al., 1987). L'analyse des transcrits *ingi* par northern blot montre une population hétérogène de transcrits de taille comprise entre 2,5 et 9 kb (Vassella et al., 1996). Dans le cas des rétroposons RIME, des transcrits majoritairement sens, d'une taille variant de 0,8kb à 8kb, sont détectés (Hasan et al., 1984). L'analyse des transcrits *ingi* et RIME ne montre pas de couplage au mini-exon indiquant l'absence de *trans* épissage (Vassella et al., 1996).

Des rétroposons de la famille LINE, comme l'élément *Jockey* chez la *Drosophile* possèdent un promoteur interne en 5' assurant leur propre transcription par l'ARN polymérase II (Mizrokhi et al., 1988). Des analyses similaires ont été effectuées sur *ingi*, mais aucune séquence promotrice du rétroélément n'a été détectée (Garcia-Salcedo et al., 2003). La transcription de ces éléments est sensible à l'alpha-amanitine, suggérant une transcription de type ARN polymérase II ou ARN polymérase III (Murphy et al., 1987; Pedram and Donelson, 1999).

I.B.3.e.2.2.2 Le rétroposon SLACS

L'élément *SLACS* (pour « spliced leader-associated conserved sequence ») est un autre rétrotransposon sans LTR relativement différent des rétroéléments présentés ci-dessus. Une dizaine de copies de *SLACS* sont exclusivement insérées entre les nucléotides 11 et 12 du côté 5' des tandems SL-ARN, comprenant 200 à 600 copies sur le chromosome IX de *T. brucei* (**figure 25**)(Aksoy et al., 1990) Il semble que ce rétroposon appartienne à une famille bien distincte de rétroposons site spécifique. À l'exception de *Leishmania*, les homologues de ce rétroposon se retrouvent dans les tandems de SL-ARN chez deux autres espèces de trypanosomatidés examinés : *Crithidia fasciculata* et *T. cruzi* (Aksoy et al., 1990; Bhattacharya et al., 2002) indiquant que ce type de rétroposon pourrait avoir des interactions avec les arrangements des SL-ARN.

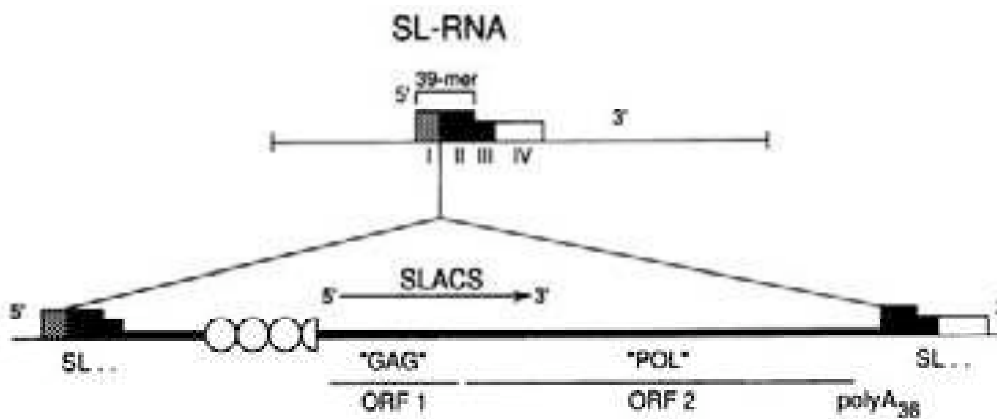


Figure 25

Organisation de SLACS inséré dans une unité de 1,4kb de l'ARN-SL

L'unité ARN SL est divisée en 4 régions. *SLACS* est inséré au milieu des boîtes I (11nt) et II (27 nt). *SLACS* possède en 3' une queue polydA. Les trois cercles et demi représentent les répétitions de 185bp qui peuvent varier en nombre chez les différents *SLACS* (d'après Askoy et al. 1990).

Le rétroélément SLACS est d'une longueur de 6,6 kb et est doté d'une longue queue polyA en 3'. Deux cadres de lecture composent 75% de la séquence (**figure 25**). Le premier (nucléotides 1512 à 2726) coderait pour une protéine de 384 acides aminés similaire au polypeptide gag des rétrovirus et pourrait lier les acides nucléiques. Le second (nucléotides 2802 à 6530) coderait pour une protéine de 1182 aa possédant un domaine transcriptase réverse (RT)(Xiong and Eickbush, 1988).

En amont de SLACS, on trouve des répétitions en tandem de 185 pb dont le nombre peut aller de 3 à 6 copies (**figure 25**). À l'inverse des éléments *ingi*/RIME, SLACS ne semble pas posséder sous formes tronquées. Entre les éléments SLACS, seules diffèrent les séquences de 185bp disposées en tandem du côté 5' et le nombre de résidus polydA en 3' (Aksoy et al., 1990). Ces répétitions de 185 pb en 5' de *SLACS* pourraient servir de promoteur interne comme dans le cas du rétroposon L1 de la souris présentant des répétitions de 200pb localisées à l'extrémité 5' de l'ORF1 (Bhattacharya et al., 2002). Le mode de transcription de SLACS n'a pas été étudié mais sa disposition dans le tandem SL-ARN suggère que les ARN seraient transcrits par l'ARN polymérase II.

I.C *Présentation générale de la thèse*

I.C.1. *L'ARNi dans son contexte en 2001*

En 1996, deux équipes découvrent de façon fortuite chez le trypanosome que la présence de certains vecteurs plasmidiques peut générer des phénotypes spectaculaires d'extinction d'ARN. Le mutant *snl-1* n'exprime plus la protéine PFRA nécessaire à la mobilité du flagelle (Bastin et al. Molecular Parasitology Meeting 1997) et le mutant FAT n'exprime plus la tubuline, ce qui génère de grosses cellules plurinucléées incapables de se diviser (Ngô et al. Molecular Parasitology Meeting 1997). Dans le cas de PFRA, l'analyse du site d'intégration révèle que le plasmide s'est inséré dans le site endogène de *PFRA* et transcrit par le promoteur intégré l'ARN dans le sens inverse de la transcription. Dans le cas de la tubuline, le vecteur conduit à l'expression d'ARN double brin de l'UTR de l'alpha-tubuline séparé par une large boucle (Bastin et al., 2001). Le point commun de ces expériences était la production d'ARNdb. Ce phénomène fut alors éclairci par Andrew Fire et ses collaborateurs qui démontrèrent chez *C. elegans* que la présence d'ARNdb déclenchait la dégradation spécifique de l'ARN cible (Fire et al., 1998). Dès lors, l'équipe d'Elisabetta Ullu démontra que l'ARNi est un mécanisme post-transcriptionnel dégradant les ARNm matures (séquence codante et UTR) chez *T. brucei* (Ngo et al., 1998) et génère en présence d'ARNdb des siARN par une activité de type Dicer (Djikeng et al., 2001).

L'existence de ce mécanisme chez le trypanosome africain représenta un intérêt énorme pour la génomique fonctionnelle. L'extinction d'un gène par ARNi peut être induit par introduction de longs ARNdb (>59 bp) ou par des plasmides inductibles à la tétracycline exprimant de l'ARNdb (Bastin et al., 2000; Bringaud et al., 2000; LaCount et al., 2000; Ngo et al., 1998; Wang et al., 2000). Au niveau de la biologie du parasite, un tiers des siARN isolés correspondent aux rétroposons SLACS et *ingi* suggérant un rôle biologique de l'ARNi dans la régulation de ces rétroéléments (Djikeng et al., 2001).

Au début de cette thèse (2001), les connaissances et les fonctions sur le mécanisme de l'ARNi en général et chez *T. brucei* en particulier étaient rudimentaires. Comme cet organisme a divergé très tôt de la branche de l'évolution, nous avons choisi d'y étudier en détail les fonctions de l'ARNi.

I.C.2. Objectif de la thèse

Depuis sa découverte, l'ARNi est devenu un formidable outil en génomique fonctionnelle. Toutefois, l'utilisation de cette technique laisse des inconnues notamment au niveau de la spécificité de l'ARNi déclenché par de long ARNdb. Comme l'ARNi est maintenant utilisé abondamment, ce paramètre doit être évalué. Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à l'étude de la spécificité et l'efficacité des principaux systèmes ARNi utilisés chez *T. brucei*. Par la suite, nous avons développé deux méthodes de complémentation fonctionnelle par ARNi, étendant ainsi les perspectives pour des études fonctionnelles.

De plus, l'ARN interférence est un mécanisme cellulaire doté de fonctions biologiques dans la cellule. Son étude représente également un intérêt essentiel dans la compréhension des mécanismes de régulation génétique. Il faut ajouter que les trypanosomes africains *T. brucei* et *T. congolense* sont les seuls représentants de la branche des kinétoplastidés à effectuer l'ARNi, au contraire de *T. cruzi* (DaRocha et al., 2004), et *Leishmania* (Robinson and Beverley, 2003) soulevant ainsi, son rôle biologique et les raisons de la conservation ou non de ce mécanisme. La comparaison des génomes de cette branche montre que seul le gène *TbAGO1* appartenant à la famille argonaute est conservé chez *T. brucei*. Afin de pour pouvoir étudier la fonction de l'ARNi dans notre modèle, nous avons généré un mutant *TbAGO1*^{-/-} délété du gène argonaute. Celui-ci n'effectue plus l'ARNi, ce qui nous a permis d'analyser les fonctions de ce mécanisme pour la biologie du trypanosome.

§

Résultats

1^{ère} partie

**L'ARNi et la génomique
fonctionnelle**

II.A L'ARNi et la génomique fonctionnelle

II.A.1. Etude de la spécificité et de l'efficacité de l'ARNi chez le trypanosome

II.A.1.a Résumé de l'article

À l'ère de la post-génomique, l'ARNi s'est imposé comme un instrument exceptionnel de génomique fonctionnelle. Ainsi, chez *Caenorhabditis elegans*, près de 17000 gènes (86% des gènes prédits) ont déjà été inactivés par ARNi (Fraser et al., 2000; Kamath et al., 2003). Une interprétation correcte des phénotypes obtenus après ARNi exige que seul le gène ciblé soit inactivé. Curieusement, le risque d'ARNi croisée (inactivation d'un gène proche mais pas totalement homologue) n'a été évalué que très superficiellement, et généralement sur des gènes exogènes (GFP, luciférase).

Lors de cette étude, nous avons utilisé *T. brucei* comme modèle pour évaluer l'efficacité et la spécificité de l'ARNi générée par l'expression de long ARNdb des gènes *PFRA* et *PFRC* (63% d'identité globale au niveau nucléotidique) codant pour des protéines flagellaires et requises pour la mobilité cellulaire. Les conséquences de l'ARNi sont étudiées sur trois niveaux : l'expression de l'ARN ciblé, l'expression protéique et l'observation du phénotype, en analysant la population ou les cellules individuelles. L'expression d'ARNdb en épingle à cheveux de *PFRA* est particulièrement efficace et inhibe l'expression de l'ARN et de la protéine *PFRA* en générant un sévère phénotype de paralysie (cf annexe). L'extinction par l'expression de l'ARNdb de *PFRA*, généré par un système de deux promoteurs opposés, est également très efficace et produit un phénotype clair cependant, de faibles quantités d'ARN de *PFRA* et de la protéine correspondante sont encore détectées. L'expression *via* deux promoteurs opposés d'ARNdb de *PAR2* (83 % d'identité globale avec *PFRA*, incluant 9 blocs de plus de 20 nucléotides totalement homologues) ne produit pas de réduction globale significative de l'ARN de *PFRA* ou de la protéine *PFRA*. Cependant, l'analyse de cellules individuelles par immunofluorescence révèle que 10 à 60 % des cellules (selon les sous-clones) exhibent une diminution de la protéine *PFRA* dans le flagelle, générant une réduction de la mobilité cellulaire.

Par ailleurs, l'expression d'ARNdb de *PFRC* (63 % d'homologie avec *PFRA*) entraîne la réduction de l'ARNm de *PFRC* et produit également des défauts d'assemblage et un phénotype de paralysie cellulaire.

En conclusion, ces travaux démontrent que le risque d'ARNi croisée est bien réel et à prendre en compte. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois la fonction de *PFRC*, et avons mis l'accent sur de possibles nouvelles régulations biologiques de l'expression et la stabilité des ARN chez le trypanosome. Ces travaux soulignent également l'efficacité de différents systèmes d'expression d'ARN double brin ainsi que leurs limites au niveau de la spécificité. Nos travaux mettent également en évidence l'importance d'une étude détaillée des multiples paramètres (ARN, protéine, phénotype) impliqués dans ce genre d'expériences, ainsi qu'une combinaison d'approche au niveau de la population (western blot) ou de cellules individuelles (immunofluorescence).

II.A.1.b Article

Efficiency and specificity of RNA interference generated by intra- and intermolecular double stranded RNA in *Trypanosoma brucei*[☆]

Mickaël Durand-Dubief, Linda Kohl, Philippe Bastin*

Unité INSERM U565 & CNRS UMR8646, Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle,
43 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

Received 3 February 2003; received in revised form 3 March 2003; accepted 5 March 2003

Abstract

In many eukaryotes, double-stranded (ds) RNA leads to specific degradation of RNA of cognate sequence, a process termed RNA interference (RNAi). Here we used the protozoan *Trypanosoma brucei* as a model to investigate efficiency and specificity of RNAi generated by expression of long dsRNA of *PFRA* and *PFRC* genes, which code for flagellar proteins required for cell motility. Consequences of RNAi were monitored at all three levels: target RNA expression, protein expression and phenotype observation, using population or individual cell analysis. Expression of *PFRA* dsRNA from an inverted repeat was extremely efficient, knocking down *PFRA* RNA and PFRA protein, and producing a severe paralysis phenotype. Silencing by expression of *PFRA* dsRNA using a dual facing promoter system was also very efficient, producing a clear phenotype, although low amounts of *PFRA* RNA and PFRA protein were detected. Expression via the dual facing promoters of *PAR2* dsRNA (83% overall identity with *PFRA*, including nine blocks of >20 nt total identity) did not produce significant reduction of total amounts of *PFRA* RNA or PFRA protein. However, individual cell analysis by immunofluorescence revealed that 10–60% cells (depending on subclones) exhibited lower PFRA amounts in their flagellum, producing a reduced-motility phenotype. © 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Trypanosoma*; RNA interference; Flagellum; Phenotype

1. Introduction

In 1998, Fire and co-workers demonstrated that the introduction of double-stranded (ds) RNA in *Caenorhabditis elegans* worms leads to rapid and potent degradation of RNA of cognate sequence, a process defined as RNA interference (RNAi) [1]. This phenomenon shares striking similarities with post-transcriptional gene silencing (PTGS) in plants [2], fungi [3] and ciliates [4]. RNAi has since been observed in numerous eukaryotes including protists [5–7], insects [8], plants [9] and mammals [10,11].

The introduction of long dsRNA triggers an enzymatic machinery that eventually degrades RNA of cognate sequence (reviews in [12–15]). First, dsRNA molecules are recognised by a ribonucleoprotein complex and cleaved in small fragments called short interfering RNA (siRNA) by the action of Dicer, a ribonuclease III enzyme [16]. These siRNA (21–25 base pairs long [17–20]) are the likely mediators of RNAi since they can reproduce the RNAi effect

when introduced in *Drosophila*, *C. elegans* or mammalian cells [11,21]. The antisense strand of the siRNA would anneal to its complementary sequence on the RNA target, guiding cleavage by a nuclease yet to be identified. Other potential partners of the RNAi machinery include RNA-dependent RNA polymerases [22–26] (maybe to amplify the initial trigger), RNA helicases [27–29] (probably involved in unwinding RNA duplexes), and proteins of the Argonaute/PIWI/eIF2C family [30–33] (containing motifs putatively involved in protein–protein interaction).

PTGS and RNAi are sophisticated and efficient mechanisms for specific RNA degradation, remarkably conserved from protists to plants and mammals. The biological importance of these RNA silencing mechanisms starts to be unveiled. In plants, PTGS plays an essential role against infection by some RNA viruses [24,25,34] and in animals, RNAi is involved in control of transposable elements [30,35]. This led to the interpretation that these RNA silencing processes could act as a selective defence against undesirable nucleic acid elements, some sort of “genetic immunity” [36]. Moreover, proteins involved in RNAi could also play a key role in the control of gene expression. For example, the enzyme Dicer is also responsible for maturation of the small temporal RNA *let-7* in *C. elegans* [37], in

[☆] Supplementary data associated with this article can be found at doi:10.1016/S0166-6851(03)00071-9.

* Corresponding author. Tel.: +33-140-793801; fax: +33-140-793705.
E-mail address: pbastin@mnhn.fr (P. Bastin).

Drosophila and in HeLa cells [38]. Finally, some (but not all) RNAi-deficient mutants show defects in development [23,31,37,39,40].

In addition to these fascinating fundamental findings, the discovery of RNAi is perfectly timed with the post-genomic era. Indeed, RNAi offers a rapid, flexible and potent opportunity to inactivate selectively gene expression [1,41,42]. dsRNA can be synthesised in vitro and directly administered to the cell/organism [1,5,8,10,11]. RNAi can be efficiently triggered by dsRNA expressed from bacteria fed to nematodes or ciliates [6,43]. Alternatively, the organism can be transformed with a plasmid allowing expression of dsRNA from an inverted repeat of the gene of interest (intramolecular dsRNA) or from a gene sandwiched between two facing promoters (intermolecular dsRNA) [44–51]. When the promoter driving dsRNA expression is inducible (e.g. by addition of tetracycline), transformed cell lines can be used as conditional mutants.

A crucial feature for the success of the RNAi process is its specificity. It is vital for the cell to inactivate exclusively the target RNA, but also for the scientist who wishes to knock down a particular gene. In *C. elegans* worms expressing GFP, injection of dsRNA (717 bp long) with 72 or 78% identity with the GFP target failed to reduce GFP fluorescence. In contrast, presence of dsRNA with 88% identity provoked reduction in GFP fluorescence, although not as effective as that obtained when using dsRNA virtually identical to the sequence of the GFP target [52]. In *Drosophila* embryos, injection of dsRNA (152 bp long) with 91% identity to a luciferase target was four to eight times less efficient in reducing luciferase activity compared with dsRNA of identical sequence [53]. However, these results were obtained by monitoring RNAi targeting an exogenous transcript at a single level (protein expression) and complete investigation checking every step from RNA expression to phenotype observation is lacking.

In this report, we have used the protist *Trypanosoma brucei* as a convenient model to evaluate thoroughly the efficiency and the specificity of RNAi silencing on RNA expression, on protein expression and their phenotypic consequences. Both population and individual cell analyses were performed. In trypanosomes, RNAi can be triggered by direct electroporation of dsRNA [5] or after transformation with a plasmid expressing dsRNA either from an inverted repeat of the gene of interest [45,46,54,55] or from a gene sandwiched between two facing promoters [50,51]. The endogenous paraflagellar rod (PFR) genes were selected for this work. The *PFRA* and *PFRC* genes code for two abundant proteins composing the filaments of the PFR, a large cytoskeletal structure found in the trypanosome flagellum [56]. *PFRA* and *PFRC* share 65% overall identity over 1800 nucleotides, without insertion [57,58]. RNAi silencing of *PFRA* in *T. brucei* and knock-out of the *PFRA/PFRC* homologues in the related species *Leishmania mexicana* cause defects in assembly of the PFR structure and severe reduction in cell motility [59–62]. This phenotype is viable, obvious

and easy to monitor, in addition, good monoclonal antibodies are available, permitting direct identification of *PFRA* and *PFRC* by Western blotting and immunofluorescence [63].

Here we show that RNAi silencing is extremely efficient when generated by expression of dsRNA from an inverted repeat. However, expression of *PFRA* dsRNA in these conditions also reduced *PFRC* RNA expression by ~50%. Very efficient silencing was also achieved by expression of *PFRA* dsRNA from the dual promoter construct where such cross-RNAi with *PFRC* RNA was not observed. Expression from the dual promoter construct of *PAR2* dsRNA, sharing 83% overall identity with *PFRA*, did not reduce significantly total *PFRA* RNA or *PFRA* protein amount, but individual cell analysis by immunofluorescence revealed that a variable number of cells in the population exhibited lower *PFRA* quantities in their flagellum. This was correlated with a clear reduction in trypanosome motility observed by videomicroscopy. Finally, we demonstrate for the first time the function of *PFRC* in cell motility in trypanosomes.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid construction

Plasmid p α PFRA430, containing back-to-back inverted copies of a 1722 bp fragment of the coding sequence of the *PFRA* gene (nt 78–1800) has been described previously [45]. A similar *PFRA* fragment (nt 78–1779) was amplified by PCR from plasmid pKMPFRATAG1 [64] using primers 5'-CGCCGCAAGCTTCACGCTGGAGGCCCGCCGCAAG-3' (*Hind*III site underlined) and 5'-CGCCGCCTCGAGTCGGCCGCGGTACTGCTGGCTC-3' (*Xho*I site underlined) and digested by *Hind*III and *Xho*I for ligation in the corresponding sites of the pZJM vector [50], creating plasmid pZJMPFRA. The *PAR2* [65] fragment (nt 78–1776) was amplified by PCR from *T. cruzi* genomic DNA (kindly provided by C. Gallet and P. Grellier, MNHN) using primers 5'-CCGCGAAGCTTCACGCTGGAGGCTGCGCGCAAG-3' (*Hind*III site underlined) and 5'-GCGGGTCTGACTGCGCGGTACTGCTGGCTC-3' (*Sal*I site underlined), digested with *Hind*III and *Sal*I and ligated in the compatible sites of the pZJM vector, creating plasmid pZJMPAR2. Finally, a *PFRC* fragment (nt 259–1003) was extracted from the pPFRCGFP430 plasmid (P.B., unpublished data) after digestion with *Hind*III and *Xho*I and ligated in corresponding sites of the pZJM vector, generating plasmid pZJMPFRC. Plasmids were purified on Qiagen resins.

2.2. Trypanosomes and transfection

Procyclic *T. brucei* (all derived from strain 427) were grown at 27 °C in semi-defined medium 79 containing 10% foetal calf serum. The *snl-2* cell line [45] expressing *PFRA* dsRNA from an inverted repeat on plasmid p α PFRA430 under the control of a tetracycline-inducible procyclin

promoter and the 29–13 cell line [66] expressing the T7 RNA polymerase and tet-repressor for inducible T7-driven expression have been described previously. Twenty microgram of plasmids pZJMPFRA, pZJMPAR2 and pZJMPFRC were linearised by digestion with *Not* I and electroporated separately in 29–13 trypanosomes as described [67]. Cells were grown overnight and then distributed in 24-well plates in the presence of G418 (15 µg/ml), hygromycin (20 µg/ml) and phleomycin (2 µg/ml) for selection. Resistant cells were induced by the addition of tetracycline (1 µg/ml) for 48 h, screened by immunofluorescence using the anti-PFRA monoclonal antibody L8C4 and cloned by limiting dilution.

2.3. RNA analyses

Total RNA was extracted from 5 to 50 × 10⁷ cells (cultures non-induced or induced for 48 h) using the Trizol (Life Technologies) method according to manufacturers' instructions. RNA concentration was determined by UV spectrophotometry at 260 nm and RNA quality was confirmed by gel analysis. For semi-quantitative RT-PCR, residual DNA was destroyed by DNase I (RNase free) treatment, followed by a second Trizol extraction. Absence of DNA was confirmed by conventional PCR. Optimal conditions were determined for each set of primers (available on request). In general, 50–100 ng template total RNA were incubated with 0.8 µM primers and amplified by the mean of the RT-Taq Platinum (Invitrogen) enzyme mix. Primers used were, for *PFRA*, 5'-ATGAGCGGAAAGGAAGTT-3' and 5'-GGTTCTCGTGGATGAACC-3' (amplification product, 1000 bp), for *PFRC*, 5'-ATGGCCGCAGTTGACGAT-3' and 5'-CTTCATCTGACTCGTTTC-3' (amplification product, 800 bp) and for *Pf16*, 5'-ATGCCAACAGGCAGATC-3' and 5'-GTTCCGGTAAATGTTTCG-3' (amplification product, 600 bp). For every RNA samples, three reactions were performed separately using the three sets of above primers. Reaction products were mixed and ran on a single agarose gel. Quantification was performed from ethidium bromide gels using the software Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics). This procedure allowed direct comparison of *PFRA* and *PFRC* RNA and normalisation via the amount of *Pf16* (an RNA from a control gene, L.K. and P.B., unpublished data) on the same gel.

For Northern blot, 5 µg total RNA were run on formaldehyde-agarose gels (1%) and transferred by capillarity on N⁺-Hybond nylon membranes (Amersham). After cross-linking, membranes were blocked in PreHyb buffer (Amersham) for 30 min at 65 °C and hybridised with radioactive probes for 2–24 h at 65 °C. DNA probes (800–1000 bp) were synthesised by PCR in the presence of ³²P-dCTP. Membranes were washed once for 30 min in 2 × SSC containing 0.1% SDS and once for 15 min in 1 × SSC containing 0.1% SDS. Radioactive signals were visualised by Phosphorimager analysis and quantified using Image Quant 5.2 software (Molecular Dynamics). Results were normalised using an α-tubulin DNA probe.

2.4. Protein analyses

Cells from 10 to 50 ml cultures at 0.6–1.0 × 10⁷ cells (non-induced or induced for 48 h) were collected by centrifugation and washed in PBS. Pellets were resuspended and boiled immediately in pre-heated Laemmli solution with 20% β-mercaptoethanol. For Western blotting, 20 µg total protein extracts were run on 8% SDS-PAGE gels (22 cm) and electro-transferred on nitrocellulose membrane in the presence of 20% methanol at 4 °C. Membranes were stained with India ink, rinsed, and blocked overnight in PBS containing 5% non-fat milk and 0.05% Nonidet P-40 at 4 °C. Blots were probed with anti-PFRA or anti-PFRA and PFRC monoclonal antibodies L8C4 or L13D6 [63], or with an anti-aldolase rabbit antiserum (a kind gift from Dr. Paul Michels, ICP, Brussels) as loading control.

For immunofluorescence, cells were washed in PBS and fixed in methanol at –20 °C and processed as described [68] using the anti-PFRA monoclonal antibody. Slides were viewed using a DMR Leica microscope and images were captured with a Cool Snap HQ camera (Roper Scientific).

2.5. Phenotype analyses

Cell motility was evaluated via a sedimentation assay as described [62]. Briefly, normal trypanosomes swim and turn the medium cloudy. In contrast, paralysed cells do not swim and progressively sediment at the bottom of the flask, leaving the medium clear. Cells (density of 5 × 10⁶/ml) were grown in sterile plastic cuvettes at 27 °C. Optical density (600 nm) was measured every 2 h and compared to controls which had been resuspended. For movies, cells from induced (48 h) cultures were visualised at 20 times magnification under a DMR Leica microscope and images were captured every 50 ms with a Cool Snap HQ camera (Roper Scientific) using the IPLab Spectrum 3.5 software (Scanalytics). Movies were exported in QuickTime format.

3. Results

3.1. Efficiency of dsRNA silencing of RNA expression

To evaluate the silencing effects of intramolecular dsRNA produced from an inverted repeat, we used the existing *snl-2* cell line. This cell line has been obtained by transformation of trypanosomes with a plasmid (Fig. 1) containing back-to-back identical copies of the *PFRA* gene (1722 bp), cloned downstream of a tetracycline-inducible procyclin promoter [45]. This inverted repeat is flanked by typical trypanosome processing signals on its 5' and 3' ends [69]. For expression of intermolecular *PFRA*, *PAR2* and *PFRC* dsRNA, a single copy of each gene was cloned in between facing tetracycline-inducible T7 promoters [50] (Fig. 1). This should produce similar amounts of sense and anti-sense RNA that upon annealing would form intermolecular

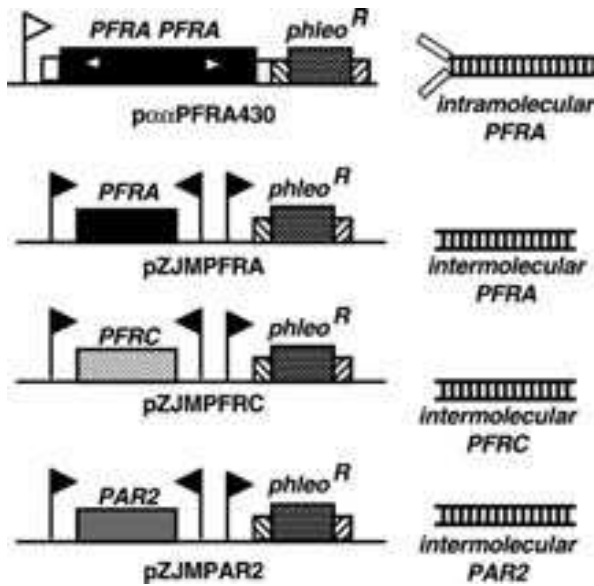


Fig. 1. Plasmids (left) expressing dsRNA (right) used in this study. Large and small boxes represent open reading frames and splicing signals respectively. A flag indicates the presence of a promoter. White arrows in p α PFRA430 indicates the orientation of the *PFRA* coding sequence.

dsRNA. In this system, processing sequences are not associated to dsRNA. Although the promoters are different, they lead to relatively close expression levels in procyclic trypanosomes [66]. In fact, the T7 promoter appears to be slightly more efficient than the procyclin promoter, suggesting that, on the basis of promoter strength only, one could expect that more intermolecular dsRNA would be produced from the dual promoter system than the hairpin RNA. These plasmids were transformed separately in the 29–13 cell line [66], producing cell lines called *PFRAi*, *PAR2i-a*, *PAR2i-b* and *PFRCi* respectively. As control, the 29–13 cell line was transformed with a pZJM plasmid without insert.

We first compared the efficiency of silencing generated by *PFRA* dsRNA expressed from an inverted repeat or from the dual facing promoter system. After sub-cloning, *snl-2*, *PFRAi* and *PFRCi* cell lines were induced to express *PFRA* or *PFRC* dsRNA by addition of tetracycline. After 48 h of induction, total RNA was extracted and amounts of *PFRA* and *PFRC* RNA were estimated by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 2A and B). As control, we used the *Pf16* RNA, coding for an axonemal protein (L.K. and P.B., unpublished data) whose expression is not affected by RNAi targeting the *PFRC* genes. Expression of intramolecular *PFRA* dsRNA led to total ablation of *PFRA* RNA that dropped below detection level. Moreover, *PFRC* RNA was also affected, showing a ~50% reduction (Fig. 2A and B, lane 2). This significant decrease could be due to biological regulation of the *PFRC* RNA associated to the failure in PFR assembly typical of induced *snl-2* trypanosomes [45,70] or to cross-RNAi generated by the *PFRA* dsRNA. Expression of *PFRA* dsRNA from the facing T7 promoters also produced very efficient degradation of *PFRA* RNA, leaving only 5–10% residual

amount (Fig. 2A and B, lane 3). In contrast, expression of *PFRC* RNA was not modified at all. Similarly, expression of *PFRC* dsRNA led to very efficient, although not complete silencing of *PFRC* RNA, without affecting *PFRA* RNA (Fig. 2A and B, lane 4).

Northern blotting was then performed using DNA probes specific for *PFRA* and *PFRC* or tubulin as a loading control (Fig. 2C and D). These data confirmed the efficiency of silencing by intramolecular *PFRA* dsRNA on the *PFRA* target observed by RT-PCR, although residual *PFRA* mRNA could here be detected (Fig. 2C and D, lane 2). As above, reduction of *PFRC* RNA amounts (by about 35%) after expression of *PFRA* dsRNA from the inverted repeat was also observed. *PFRA* mRNA reduction by expression of *PFRA* dsRNA from the dual promoter construct looked here almost as efficient (Fig. 2C and D, lane 3). As observed by RT-PCR, *PFRC* mRNA amounts were not affected in these conditions. Conversely, expression of *PFRC* dsRNA from the dual promoter construct brought down *PFRC* mRNA amounts without affecting *PFRA* significantly.

These and other Northern blot analyses failed to identify any RNA band corresponding to the expressed *PFRA* dsRNA hairpin (Fig. 2C and D, lane 2), to annealed *PFRA* (lane 3) or *PFRC* (lane 4) intermolecular dsRNA. In the latter two cases, we could not detect any *PFRA* or *PFRC* single stranded RNA produced from the dual promoter construct. The only RNA other than the endogenous mRNA, was an aberrant RNA species, detected by the *PFRA* probe only in the *snl-2* cell line. Such molecules were not visible in the *PFRAi*- or *PFRCi*-induced samples (Fig. 2C and D, lane 2, arrow).

3.2. Consequences of RNA silencing on protein expression

PFRA and *PFRC* protein expression was investigated in the various cell lines after 48 h in the presence of tetracycline. First, analysis was performed at the population level by Western blotting with a monoclonal antibody recognising an epitope shared by *PFRA* and *PFRC* [63] (Fig. 3A). On control trypanosome samples, this antibody stains a doublet of closely migrating proteins of $M_r \sim 73,000$ (*PFRC*) and $M_r \sim 69,000$ (*PFRA*) (Fig. 3A, lane 1). Expression of intramolecular *PFRA* dsRNA in the *snl-2* cell line led to complete absence of *PFRA* protein, as expected from the severe depletion of *PFRA* RNA (Fig. 3A, lane 2). Such a complete disappearance of the *PFRA* protein had been noticed previously using a specific anti-*PFRA* antibody [45]. In addition, the *PFRC* band was barely visible. This is probably due to the reduction of *PFRC* RNA described above, but also to a likely decrease of *PFRC* protein stability due to failure of assembling the PFR structure [62]. Only very low amounts of *PFRA* protein were detected in samples from the *PFRAi* cell line expressing intermolecular *PFRA* dsRNA. Here, *PFRC* protein showed also a decrease in concentration compared to controls but this was less pronounced than in the induced *snl-2* samples (Fig. 3A, lane 3). Conversely,

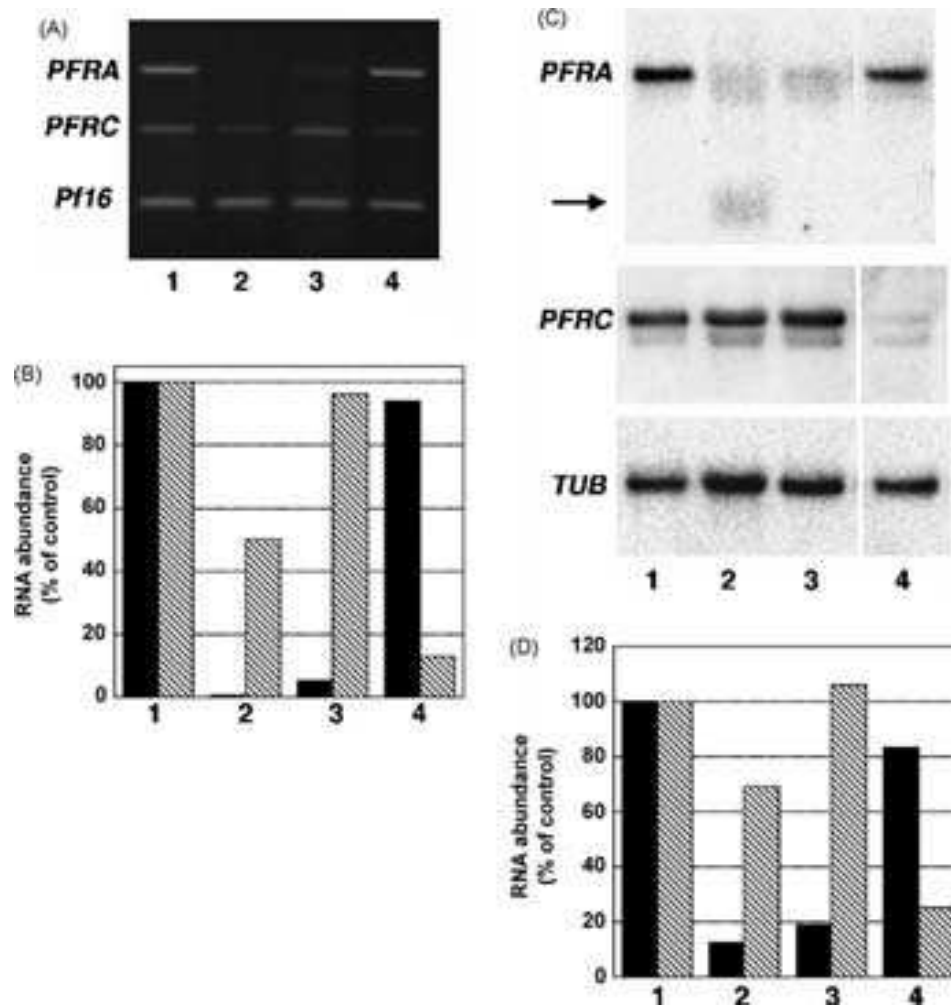


Fig. 2. Efficiency and specificity of various *PFR* dsRNA on RNA expression. All cell lines were grown for 48 h in the presence of tetracycline. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *PFRA*, *PFRC* and control *Pf16* RNA amounts from induced cell lines: lane 1, control cell line expressing no dsRNA; lane 2, induced *snl-2* expressing *PFRA* dsRNA from an inverted repeat; lane 3, induced *PFRAi* expressing *PFRA* dsRNA from the dual promoter system; and lane 4, induced *PFRCi* expressing *PFRC* dsRNA from the dual promoter system. Three separate reactions were performed and ran on the same agarose gel as indicated (see Experimental Procedures). (B) Quantification of the results shown in A. Black bars, *PFRA*; grey bars, *PFRC*. *PFRA* and *PFRC* amounts have been normalised using the non-affected *Pf16* RNA and results are presented as percentage of control cell line. (C) Northern blot analysis of total RNA from induced samples (lanes 1–4 as above). The membrane was first incubated with the *PFRA* probe, then stripped and probed for *PFRC*, and stripped again for hybridisation with an α -tubulin probe as indicated. (D) Quantification of the results shown in C. Black bars, *PFRA*; grey bars, *PFRC* and *PFRC* amounts have been normalised using the non-related tubulin (*TUB*) RNA and results are presented as percentage of control cell line.

expression of intermolecular *PFRC* dsRNA in the *PFRCi* cell line severely reduced *PFRC* protein abundance and partially affected *PFRA* abundance (Fig. 3A, lane 4).

Individual cell analysis was then performed by immunofluorescence using a monoclonal antibody recognising exclusively *PFRA* [63] (Fig. 3B). Control cell lines display the typical bright homogenous flagellum signal in every cell, the expected localisation of *PFR* proteins. In stark contrast, no signal is visible at all in most cells from induced *snl-2* trypanosomes expressing *PFRA* dsRNA from the inverted repeat. RNAi does not affect existing protein (i.e. protein synthesised before dsRNA was present), hence a few cells with *PFRA* protein present in their old flagella remain present (trypanosomes do not disassemble their flag-

ellum during cell replication) are still expected after 48 h of induction [45], as shown on Fig. 3B. A very similar picture was obtained when analysing *PFRAi* cells expressing *PFRA* dsRNA from the dual facing promoter system, although a significant number of cells showed low amounts of *PFRA* remaining in their flagellum. Similar analysis of the *PFRCi* cell line after expression of intermolecular *PFRC* dsRNA could not be performed because of the lack of a specific anti-*PFRC* antibody. However, analysis by immunofluorescence with the anti-*PFRA* antibody allows identification of the remaining *PFRA* protein (Fig. 3B). This shows a mixture of cells with weak homogenous flagellar signal and of others with a bright dot at the distal tip of their flagella. This result corresponds to the situation observed in the

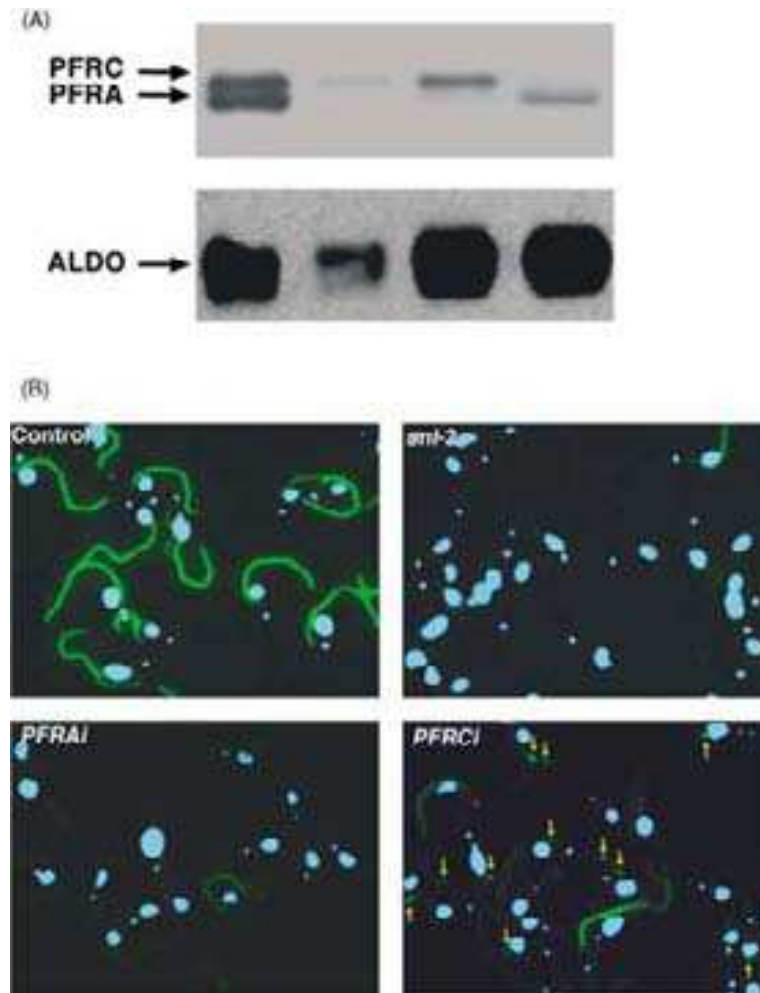


Fig. 3. Effects of RNA silencing on protein expression. (A) Western blot of total protein samples of: lane 1, control cell line expressing no dsRNA; lane 2, induced *snl-2* expressing *PFRA* dsRNA from an inverted repeat; lane 3, induced *PFRAi* expressing *PFRA* dsRNA from the dual promoter system and lane 4, induced *PFRCi* expressing *PFRC* dsRNA from the dual promoter system. Cell lines were grown for 48 h in the presence of tetracycline. Membranes were probed with a monoclonal antibody recognising both *PFRA* and *PFRC* as indicated. Blots were stripped and reprobbed with an anti-aldolase as a loading control. (B) Immunofluorescence analysis of cells induced in the same conditions as in A, incubated with an anti-*PFRA* specific monoclonal antibody. The immunofluorescence signal image (green) was merged with the DAPI image (blue), revealing the nucleus (big dot) and the mitochondrial genome (small dot), indicating presence of trypanosomes. Yellow arrows indicate the presence of unassembled *PFRA* material at the tip of the flagellum in induced *PFRCi* trypanosomes.

initial *snl-1* mutant lacking *PFRA* [60,62]; even in the absence of *PFRA*, *PFRC* was still present and transported at the distal tip of the new flagellum, which is the site of PFR assembly [71,72]. Here, a normal PFR cannot be assembled and excessive *PFRA* material accumulates, creating a dilation of the flagellum distal tip. This lack of association to a cytoskeletal structure could be responsible for reduced PFR protein stability and increased turn-over, probably contributing to reduction of total PFR protein observed by Western blotting.

3.3. Phenotype analysis

Normal trypanosomes actively swim in vitro and in vivo, with vigorous flagellum beating twisting and moving the cell forward. Microscopy observation of cell lines express-

ing various *PFR* dsRNA revealed severe reduction of cell motility. This was quantified by two methodologies. First, we used a sedimentation assay that allowed quantification at the population level. Cells were grown in cuvettes and optical density of the medium was measured regularly over 7 h (Fig. 4). Control trypanosomes swim actively, turning the medium cloudy and show little or no sedimentation. In contrast, *snl-2* cells expressing intramolecular *PFRA* dsRNA show a dramatic drop at the bottom of the cuvette. After 7 h, the supernatant contained very few cells. Although cells expressing intermolecular *PFRA* or *PFRC* dsRNA clearly sedimented, the phenotype was less pronounced than that observed for *snl-2*.

Second, to figure out whether this difference was due to a less severe degree of cell paralysis or to a mixture of paralysed and normal cells, videomicroscopy analysis of

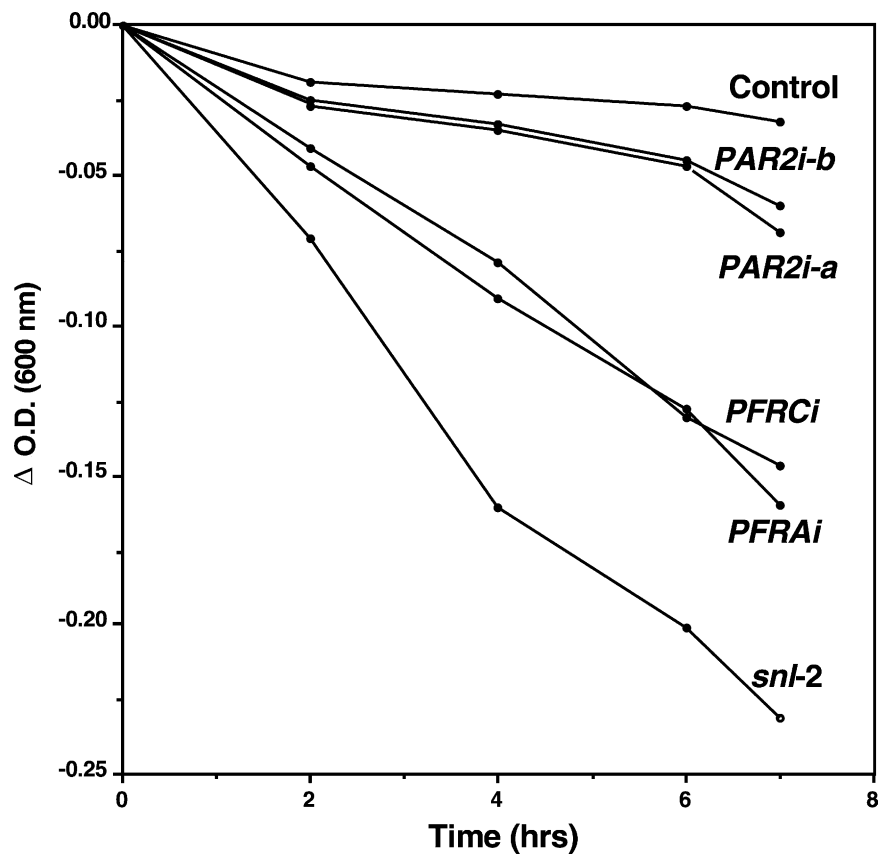


Fig. 4. Phenotype analysis by sedimentation assay. Trypanosomes from the indicated cell lines were induced for 48 h and grown in cuvettes. Non-motile cells do not swim and sediment at the bottom of the cuvette, leading to a reduction in optical density that can be monitored over time.

individual cells was performed (Table 1 and Supplementary Material). Control cells display the typical trypanosome motility, with cells swimming in any direction [62]. Induced *snl-2* trypanosomes hardly moved at all, only drifting slightly with medium flow. Induced *PFRAi* and *PFRCi* cells also showed severe reduction of their motility, however these trypanosomes were still “vibrating”, an activity insufficient to generate directional movement but that could explain the slower sedimentation compared with induced *snl-2* (Fig. 4).

Therefore, inhibition of *PFRA* or *PFRC* expression by the presence of *PFRA* or *PFRC* dsRNA expressed from the dual facing promoters produces the same phenotype as ob-

served when expressing *PFRA* dsRNA from the inverted repeat; failure to assemble the PFR structure and cell paralysis. However, no reduction in the amount of *PFRC* RNA in *PFRAi* cell line, nor of *PFRA* RNA in the *PFRCi* cell line could be observed. This strongly suggests that the observed *PFRC* RNA reduction reported above when expressing intramolecular *PFRA* dsRNA (Fig. 2) is not due to biological regulation consecutive of failure in PFR assembly but rather to cross-RNAi affecting *PFRC* RNA directly. This could also explain the more pronounced paralysis phenotype observed with induced *snl-2* since *PFRA* is absent and *PFRC* is also affected.

Table 1
Motility of individual cells analysed by videomicroscopy

Cell line name	dsRNA expressed	Motility ($\mu\text{m/s}$) ^a
Mock	None	30.4 ± 13.0
<i>snl-2</i>	<i>PFRA</i> intra	1.3 ± 1.0 ^b
<i>PFRAi</i>	<i>PFRA</i> inter	3.1 ± 1.3 ^b
<i>PFRCi</i>	<i>PFRC</i> inter	3.9 ± 1.2 ^b
<i>PAR2i-a</i>	<i>PAR2</i> inter	16.7 ± 10.8
<i>PAR2i-b</i>	<i>PAR2</i> inter	15.9 ± 9.6

^a For each experiment, the motility of 20 randomly selected cells was measured and expressed in micrometer per second.

^b These cells do not swim but drift slowly with the medium flow.

3.4. Cross-RNAi generated by the closely related *PAR2* dsRNA

Despite sharing 65% overall identity at the nucleic acid level, *PFRA* and *PFRC* intermolecular dsRNA expressed from the dual promoter system did not produce cross-RNAi on the other RNA. We explored further the specificity of RNAi under these conditions by expressing a dsRNA sharing even more overall identity with its target. We selected the *PFRA* gene homologue in *Trypanosoma cruzi*, termed *PAR2*, that shares 83% overall nucleotide identity with *PFRA* and 70% with *PFRC* [65]. No other *T. brucei*

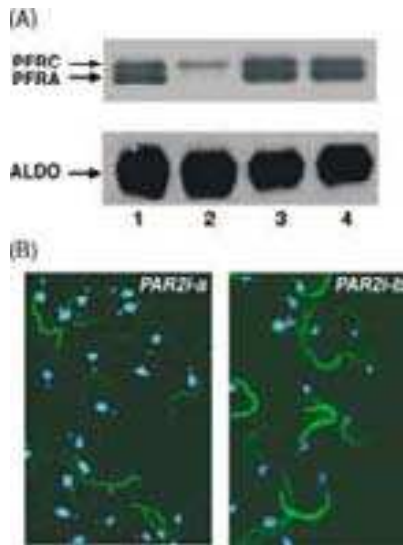


Fig. 5. Effects of expression of related but non-identical dsRNA on protein level. (A) Western blot of total protein samples of: lane 1, control cell line expressing no dsRNA; lane 2, induced *snl-2* expressing *PFRA* dsRNA from an inverted repeat; lane 3, induced *PAR2i-a* and lane 4, induced *PAR2i-b*, expressing *PAR2* dsRNA (83% nucleotide identity with *PFRA*) from the dual promoter system. Cell lines were grown for 48 h in the presence of tetracycline. Membranes were probed with a monoclonal antibody recognising both *PFRA* and *PFRC* as indicated. Blots were stripped and re-probed with an anti-aldolase as a loading control. (B) Immunofluorescence analysis of cells induced in the same conditions as in A, incubated with an anti-*PFRA* specific monoclonal antibody. The immunofluorescence signal image (green) was merged with the DAPI image (blue), revealing the nucleus (big dot) and the mitochondrial genome (small dot), indicating presence of trypanosomes. Reduction of intensity in *PFRA* signal is visible in some, but not all trypanosomes of the population.

gene with significant identity with *PAR2* were found in the trypanosome genome data bases. The plasmid pZJM-*PAR2* was transformed in 29–13 trypanosomes and two sub-clones were selected for further analysis, *PAR2i-a* and *PAR2i-b*. Neither semi-quantitative RT-PCR nor Northern blotting did reveal significant modification of the total amount of *PFRA* or *PFRC* RNA (data not shown). Similarly, Western blotting analysis failed to detect a significant reduction in the amount of *PFRA*/*PFRC* proteins (Fig. 5A, lanes 3 and 4). However, individual cell analysis showed heterogeneity in the concentration of *PFRA* protein in the flagella of trypanosomes expressing intermolecular *PAR2* dsRNA (Fig. 5B). Although most cells exhibited the typical bright flagellum staining in immunofluorescence with the anti-*PFRA* antibody, 10–60% of them showed intermediate to low abundance of *PFRA* in their flagella. This proportion was variable from one sub-clone to the other and could not be associated to a particular stage of the cell cycle. Overall, such a reduction might not be sufficient to produce a clear reduction in signal by Western blotting analysis.

Induced trypanosomes from cell lines *PAR2i-a* and *PAR2i-b* exhibited increased sedimentation compared to control trypanosomes, although this did not reach the same

level as observed in *PFRAi* or *PFRCi* (Fig. 4). This was confirmed by videomicroscopy analysis, showing a heterogeneous mixture of cells, some with apparently normal motility and others with intermediate to low motility (Table 1 and Supplementary Material). A significant number of these cells tumbled and showed poor directional motility. Such phenotypic heterogeneity fits well with the immunofluorescence data and suggest that reduced amounts of *PFRA* in the flagellum may be accompanied with some *PFRC* structural defects affecting flagellum and cell motility.

4. Discussion

We have used the African trypanosome *T. brucei* as a model to investigate the effects of expression of long dsRNA, from an inverted repeat or from a dual facing promoter system, on RNA and protein expression, and on phenotypic consequences, both at the population level and at the individual cell level.

4.1. Efficiency of RNA silencing

In the conditions tested, both expression of dsRNA from an inverted repeat or from a dual promoter system generated potent RNA silencing, leading to clear phenotypes. The first system appeared slightly more efficient, a result that could be explained by the fact that dsRNA expressed from an inverted repeat is self-folding and possesses normal 5' and 3' processing signals (Fig. 1). These should stabilise the RNA and facilitate its export from the nucleus to the cytoplasm which is the presumed site of action of RNAi. In these conditions, one might expect higher actual cytosolic concentration of such dsRNA compared to dsRNA expressed from the dual facing promoter, that needs to anneal two physically different molecules and that lacks processing signals. Direct correlation with the actual amount of expressed dsRNA in each system could not be performed since dsRNA could not be detected reliably, probably because dsRNA is very rapidly degraded in short fragments (siRNAs). This has been observed in trypanosomes [20] and is extensively described for other model organisms [18,19,52,53]. Expression of dsRNA from an inverted repeat has also been shown to be highly efficient in plants [73,74].

Northern blot analysis of RNA from *snl-2* trypanosomes induced to express *PFRA* dsRNA from the inverted repeat also revealed the presence of unexpected RNA hybridising with the *PFRA* probe (Fig. 2C and D). Such molecules could originate from partial degradation of the *PFRA* mRNA or the *PFRA* dsRNA. This aberrant RNA was absent from non-induced *snl-2* samples and was not detected either in *PFRAi* or in *PFRCi* cells expressing intermolecular *PFRA* or *PFRC* dsRNA where efficient RNA silencing nevertheless occurs. This suggests that the aberrant RNA may rather derive from the intramolecular *PFRA* dsRNA expressed from the inverted repeat. In *Drosophila*, presence of aberrant RNA

was correlated with the expression of dsRNA from an inverted repeat of the *Pgm* gene [47]. Aberrant RNAs have been proposed to play an important role in RNA silencing in several species [60,73,75].

Expression of dsRNA from the dual facing promoter system also resulted in potent silencing and generated clear phenotypes for a large number of genes [50] (our unpublished results). In technical terms, control of induction is better when expressing intramolecular dsRNA from an inverted repeat of the gene of interest since only one promoter needs to be regulated. The level of ‘leakiness’ in non-induced *snl-2* (RNAi in the absence of induction) was only 1–2% compared to 20–25% in non-induced *PFRAi* or *PFRCi* (our unpublished observations) [50,51].

4.2. Specificity of RNA silencing

We have detected cross-RNAi in two different situations. First, expression of intramolecular *PFRA* dsRNA reduced *PFRC* RNA (65% overall identity with *PFRA*) level by about 50%. This reduction was further amplified at the protein level and was associated with the most severe paralysis phenotype. Expression of intermolecular *PFRA* dsRNA of similar size did not produce such cross-interference despite seriously knocking-down *PFRA* expression. This difference could be due to higher actual amounts of *PFRA* dsRNA delivered in the cytoplasm as discussed above and linked to different thresholds required for silencing of an RNA of identical sequence and of an RNA with related but non-identical sequence. Similarly, in *C. elegans*, cross-RNAi generated by injection of in vitro synthesised dsRNA sharing 80% identity with the target could be avoided by reducing the amount of micro-injected dsRNA [76].

Second, despite no obvious effect on *PFRA* nor *PFRC* expression from Northern or Western blot analysis, presence of intermolecular *PAR2* dsRNA (sharing 83% overall identity with *PFRA*) resulted in a reduced motility phenotype. Individual cell analysis by immunofluorescence with an anti-*PFRA* specific antibody revealed significant reduction in *PFRA* concentration in the flagellum of 10–60% cells according to the sub-clone analysed. This was observed in all cloned cell lines analysed. The relatively long half-life of PFR proteins [77] prevented us from identifying a possible relation with a particular stage of the cell cycle. In any case, cross-RNAi was never as spectacular as when RNAi was generated by dsRNA of identical sequence to the target, and would probably have been unnoticed without the immunofluorescence analysis. In addition, it confirms the requirement for high specificity for efficient silencing.

How could non-identical dsRNA trigger degradation of RNA? In trypanosomes as in other species, long dsRNA are fragmented in 21–25mer siRNA that act as a guide for specific degradation [20]. We therefore aligned the nucleotide sequences of *PFRA*, *PFRC* and *PAR2* and looked for blocks of perfect identity that were longer than 20 base pairs. Two such blocks were identified between *PFRA* and *PFRC* (26

and 28 bp respectively) and nine between *PFRA* and *PAR2* (six between 20 and 23 bp, one with 26 bp and two with 32 bp each, see Supplementary Material). Fragmentation of *PFRA* dsRNA in *snl-2* and of *PAR2* dsRNA in *PAR2i* produces a mixture of a large number of siRNA with imperfect identity with the *PFRA* or *PFRC* target, and of a limited number of siRNA with perfect identity with their target (providing the nuclease activity cuts at the edges of the short regions with 100% identity). In an in vitro assay on *Drosophila* extracts, only siRNAs with perfect identity with the target were efficient in reducing luciferase activity [78]. In our situation, the observed cross-RNAi could be the result of the action of a small number of siRNA sharing 100% identity with the target. However, this process would not be efficient, either because of a too low concentration, or because of competition by a large excess of ineffective siRNA [53]. Alternatively, in vivo experiments on *Drosophila* embryos showed that siRNA with a point mutation could still generate a phenotype, although of reduced intensity [79]. In our experiments, the production of a large number of poorly efficient siRNA could also explain the cross-RNAi observed. A combination of both explanations is of course possible.

Overall, our results mean that great care is required when selecting dsRNA sequences for RNAi in functional genomics, especially since phenotypes can be produced even in the absence of detected reduction of total RNA or protein levels on Northern or Western blots. Use of individual cell analyses, for example, by immunofluorescence or by in situ hybridisation is probably essential.

4.3. Function of *PFRC*

Finally, we show for the first time the role of *PFRC* in *T. brucei*. As *PFRA*, *PFRC* is required for PFR assembly and for cell motility. In the absence of *PFRC*, *PFRA* protein is still transported to the flagellum tip (as expected from the presence of a putative flagellum targeting signal [71]), the site of assembly of flagellar precursors. However, in the absence of *PFRC*, *PFRA* alone cannot constitute the PFR cytoskeletal structure and accumulates as non-assembled material. This demonstrates that *PFRA* and *PFRC* proteins are not redundant, but would rather function together presumably to constitute the PFR filaments, in a manner similar to α - and β -tubulin in microtubule formation.

Acknowledgements

We wish to thank K. Gull for helpful suggestions and providing anti-PFR monoclonal antibodies, P. Michels for providing anti-aldolase antibodies, C. Gallet and P. Grellier for providing *T. cruzi* genomic DNA, C. Clayton and P. Englund for providing respectively pHD430 and pZJM vectors, G. Cross for the 29–13 cell line, C. Giovannangeli for critical reading of the manuscript and E. Charlier for technical assistance. M.D.-D. is supported by a ‘Bourse de Formation

Recherche du Gouvernement Luxembourgeois". This work was funded by an ATIPE grant from the CNRS and by an "Aide à l'Implantation de Nouvelles Equipes" awarded by the Fondation pour la Recherche Médicale.

References

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806–11.
- [2] van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 1990;2:291–9.
- [3] Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA–DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J* 1996;15:3153–63.
- [4] Ruiz F, Vayssie L, Klotz C, Sperling L, Madeddu L. Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell* 1998;9:931–43.
- [5] Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14687–92.
- [6] Galvani A, Sperling L. RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet* 2002;18:11–2.
- [7] Martens H, Novotny J, Oberstrass J, Steck TL, Postlethwait P, Nellen W. RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol Biol Cell* 2002;13:445–53.
- [8] Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* 1998;95:1017–26.
- [9] Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13959–64.
- [10] Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2000;2:70–5.
- [11] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494–8.
- [12] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21–23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101:25–33.
- [13] Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem Eur J Chem Biol* 2001;2:239–45.
- [14] Cogoni C. Homology-dependent gene silencing mechanisms in fungi. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:381–406.
- [15] Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002;296:1263–5.
- [16] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363–6.
- [17] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999;286:950–2.
- [18] Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:225–32.
- [19] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188–200.
- [20] Djikeng A, Shi H, Tschudi C, Ullu E. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24–26-nucleotide RNAs. *RNA* 2001;7:1522–30.
- [21] Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9742–7.
- [22] Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 1999;399:166–9.
- [23] Smardon A, Spoerke JM, Stacey SC, Klein ME, Mackin N, Maine EM. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 2000;10:169–78.
- [24] Mourrain P, Beclin C, Elmayer T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, et al. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 2000;101:533–42.
- [25] Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000;101:543–53.
- [26] Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 2001;107:465–76.
- [27] Wu-Scharf D, Jeong B, Zhang C, Cerutti H. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-Box RNA helicase. *Science* 2000;290:1159–63.
- [28] Dalmay T, Horsefield R, Braunstein TH, Baulcombe DC. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J* 2001;20:2069–78.
- [29] Tijsterman M, Ketting RF, Okihara KL, Sijen T, Plasterk RH. RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science* 2002;295:694–7.
- [30] Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, et al. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999;99:123–32.
- [31] Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11650–4.
- [32] Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 2000;404:245.
- [33] Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2001;2:110–9.
- [34] Kasschau KD, Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 1998;95:461–70.
- [35] Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 1999;99:133–41.
- [36] Bass BL. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 2000;101:235–8.
- [37] Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001;106:23–234.
- [38] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293:834–8.
- [39] Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;293:2269–71.
- [40] Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001;15:2654–9.
- [41] Gonczy P, Echeverri G, Oegema K, Coulson A, Jones SJ, Copley RR, et al. Functional genomic analysis of cell division in

- C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. Nature 2000;408:331–6.
- [42] Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. Nature 2000;408:325–30.
- [43] Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. Nature 1998;395:854.
- [44] Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. Nat Genet 2000;24:180–3.
- [45] Bastin P, Ellis K, Kohl L, Gull K. Flagellum ontogeny studied via an inherited and regulated RNA interference system. J Cell Sci 2000;113:3321–8.
- [46] Shi H, Djikeng A, Mark T, Wirtz E, Tschudi C, Ullu E. Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. RNA 2000;6:1069–76.
- [47] Allikian MJ, Deckert-Cruz D, Rose MR, Landis GN, Tower J. Doxycycline-induced expression of sense and inverted-repeat constructs modulates phosphogluconate mutase (Pgm) gene expression in adult *Drosophila melanogaster*. Genome Biol 2002;3:RESEARCH0021.
- [48] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes Dev 2002;16:948–58.
- [49] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science 2002;296:550–3.
- [50] Wang Z, Morris JC, Drew ME, Englund PT. Interference of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA Interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. J Biol Chem 2000;275:40174–9.
- [51] LaCount DJ, Bruse S, Hill KL, Donelson JE. Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. Mol Biochem Parasitol 2000;111:67–76.
- [52] Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A. Functional anatomy of a dsRNA trigger. Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. Mol Cell 2000;6:1077–87.
- [53] Yang D, Lu H, Erickson JW. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. Curr Biol 2000;10:1191–200.
- [54] Bringaud F, Robinson DR, Barradeau S, Biteau N, Baltz D, Baltz T. Characterization and disruption of a new *Trypanosoma brucei* repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition. Mol Biochem Parasitol 2000;111:283–97.
- [55] Wang Z, Englund PT. RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. EMBO J 2001;20:4674–83.
- [56] Bastin P, Matthews KR, Gull K. The paraflagellar rod of Kinetoplastida: solved and unsolved questions. Parasitol Today 1996;12:302–7.
- [57] Schlaeppi K, Deflorin J, Seebeck T. The major component of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* is a helical protein that is encoded by two identical, tandemly linked genes. J Cell Biol 1989;109:1695–709.
- [58] Deflorin J, Rudolf M, Seebeck T. The major components of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* are two similar, but distinct proteins which are encoded by two different gene loci. J Biol Chem 1994;269:28745–51.
- [59] Santrich C, Moore L, Sherwin T, Bastin P, Brokaw C, Gull K, et al. A motility function for the paraflagellar rod of Leishmania parasites revealed by *PFR-2* gene knockouts. Mol Biochem Parasitol 1997;90:95–109.
- [60] Bastin P, Sherwin T, Gull K. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. Nature 1998;391:548.
- [61] Maga JA, Sherwin T, Francis S, Gull K, LeBowitz JH. Genetic dissection of the Leishmania paraflagellar rod, a unique flagellar cytoskeleton structure. J Cell Sci 1999;112:2753–63.
- [62] Bastin P, Pullen TJ, Sherwin T, Gull K. Protein transport and flagellum assembly dynamics revealed by analysis of the paralysed trypanosome mutant *snl-1*. J Cell Sci 1999;112:3769–77.
- [63] 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;46:105–9.
- [64] Bastin P, Bagherzadeh Z, Matthews KR, Gull K. A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 1996;77:235–9.
- [65] Beard CA, Saborio JL, Tewari D, Krieglstein KG, Henschen AH, Manning JE. Evidence for two distinct major protein components, PAR 1 and PAR 2, in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. Complete nucleotide sequence of PAR. J Biol Chem 1992;267:21656–62.
- [66] Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 1999;99:89–101.
- [67] Beverley SM, Clayton CE. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. Methods Mol Biol 1993;21:333–48.
- [68] Sherwin T, Schneider A, Sasse R, Seebeck T, Gull K. Distinct localization and cell cycle dependence of COOH terminally tyrosinolated alpha-tubulin in the microtubules of *Trypanosoma brucei brucei*. J Cell Biol 1987;104:439–46.
- [69] Wirtz E, Clayton C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. Science 1995;268:1179–83.
- [70] Bastin P, Pullen TJ, Moreira-Leite FF, Gull K. Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. Microbes Infect 2000;2:1865–74.
- [71] Bastin P, MacRae TH, Francis SB, Matthews KR, Gull K. Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. Mol Cell Biol 1999;19:8191–200.
- [72] Bastin P, Gull K. Assembly and function of complex flagellar structures illustrated by the paraflagellar rod of trypanosomes. Protist 1999;150:113–23.
- [73] Vaucheret H, Beclin C, Fagard M. Post-transcriptional gene silencing in plants. J Cell Sci 2001;114:3083–91.
- [74] Beclin C, Boutet S, Waterhouse P, Vaucheret H. A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. Curr Biol 2002;12:684–8.
- [75] Galvani A, Sperling L. Transgene-mediated post-transcriptional gene silencing is inhibited by 3' non-coding sequences in *Paramecium*. Nucleic Acids Res 2001;29:4387–94.
- [76] Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. Science 1998;282:430–1.
- [77] Ismach R, Cianci CM, Caulfield JP, Langer PJ, Hein A, McMahon-Pratt D. Flagellar membrane and paraxial rod proteins of *Leishmania*: characterization employing monoclonal antibodies. J Protozool 1989;36:617–24.
- [78] Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. EMBO J 2001;20:6877–88.
- [79] Boutla A, Delidakis C, Livadaras I, Tsagris M, Tabler M. Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in *Drosophila*. Curr Biol 2001;11:1776–80.

II.A.2. Complémentation fonctionnelle de mutants ARNi

Dans cet article, nous avons développé une nouvelle application de l'ARN interférence chez le trypanosome et dans le contexte général de l'ARNi chez les eucaryotes (Rusconi F., Durand-Dubief M. and Bastin P., Functional complementation of RNA interference mutants in trypanosomes, *BMC Biotechnology* 2005).

II.A.2.a Résumé de l'article

Nous avons développé deux systèmes de complémentation fonctionnelle de mutants ARNi afin de nous assurer que les phénotypes observés sont bien dus à l'extinction spécifique du gène ciblé. Pour cette étude, nous avons utilisé le gène *PFRA* codant pour une protéine de la fibre paraflagellaire essentielle à la motilité du flagelle. En ciblant par ARNi exclusivement les régions non traduites (UTR) du gène *PFRA* endogène, et en exprimant un gène *PFRA* exogène avec un autre UTR (celui de l'aldolase), nous avons pu éteindre spécifiquement le gène *PFRA* endogène sans affecter l'expression du gène *PFRA* exogène, ce qui complémente donc le phénotype de paralysie. L'expression d'un gène *PFRA* délété de son signal d'adressage flagellaire ne permet pas de complémenter le phénotype de mobilité.

Ces résultats démontrent qu'en ciblant les UTR d'un gène par ARNi, il est possible d'effectuer une complémentation fonctionnelle avec le même gène mais avec un UTR différent sans générer de propagation de l'ARNi sur la séquence codante.

Pour étoffer cette technique, nous avons également effectué une complémentation fonctionnelle inter-espèce à l'aide de gène hétérologue *PAR2* de *Trypanosoma cruzi*. Nos résultats démontrent une localisation de la protéine *PAR2* dans le flagelle et une restauration de la mobilité du flagelle malgré l'inhibition de *PFRA* indiquant que la protéine hétérologue *PAR2* est fonctionnelle.

II.A.2.b Article

Methodology article

Open Access

Functional complementation of RNA interference mutants in trypanosomes

Filippo Rusconi, Mickaël Durand-Dubief and Philippe Bastin*

Address: UMR5153 CNRS, USM0503 MNHN, U565 INSERM – 57, rue Cuvier – B.P. 26 – F-75231 – Paris Cedex 05 – France

Email: Filippo Rusconi - rusconi@mnhn.fr; Mickaël Durand-Dubief - duranddu@mnhn.fr; Philippe Bastin* - pbastin@mnhn.fr

* Corresponding author

Published: 09 February 2005

Received: 10 November 2004

BMC Biotechnology 2005, 5:6 doi:10.1186/1472-6750-5-6

Accepted: 09 February 2005

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/5/6>

© 2005 Rusconi et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: In many eukaryotic cells, double-stranded RNA (dsRNA) triggers RNA interference (RNAi), the specific degradation of RNA of homologous sequence. RNAi is now a major tool for reverse-genetics projects, including large-scale high-throughput screens. Recent reports have questioned the specificity of RNAi, raising problems in interpretation of RNAi-based experiments.

Results: Using the protozoan *Trypanosoma brucei* as a model, we designed a functional complementation assay to ascertain that phenotypic effect(s) observed upon RNAi were due to specific silencing of the targeted gene. This was applied to a cytoskeletal gene encoding the paraflagellar rod protein 2 (*TbPFR2*), whose product is essential for flagellar motility. We demonstrate the complementation of *TbPFR2*, silenced *via* dsRNA targeting its UTRs, through the expression of a tagged RNAi-resistant *TbPFR2* encoding a protein that could be immunolocalized in the flagellum. Next, we performed a functional complementation of *TbPFR2*, silenced *via* dsRNA targeting its coding sequence, through heterologous expression of the *TbPFR2* orthologue gene from *Trypanosoma cruzi*: the flagellum regained its motility.

Conclusions: This work shows that functional complementation experiments can be readily performed in order to ascertain that phenotypic effects observed upon RNAi experiments are indeed due to the specific silencing of the targeted gene. Further, the results described here are of particular interest when reverse genetics studies cannot be easily achieved in organisms not amenable to RNAi. In addition, our strategy should constitute a firm basis to elaborate functional-dissection studies of genes from other organisms.

Background

RNA interference (RNAi) can be triggered by introduction of long double-stranded RNA molecules (dsRNAs) in cells [1], and proceeds in a number of sequential steps, starting with the cleavage of long dsRNAs into shorter ≈ 21 – 23 nucleotide-long dsRNAs called short interfering RNAs (siRNAs; these were initially discovered in plants [2]). The enzyme responsible for this chopping (DICER; [3,4]) displays RNase III activity, producing characteristic siRNAs

with a phosphorylated 5' end and a two nucleotide-overhanging 3'OH end. These siRNAs enter an RNA-induced silencing complex, or RISC [5,6]. A helicase activity unwinds the two strands of the siRNA, and RISC scans the mRNAs in the cytoplasm and cleaves the molecules that are found complementary to the RISC-contained siRNA [5].

RNA-silencing processes have been described in a variety of organisms: post-transcriptional gene silencing in plants [7,8], quelling in fungi [9], homology-dependent gene silencing in ciliates [10], or RNA interference in worms [1], flies [11,12], trypanosomes [13,14] and mammals [15,16]. It is thought that this machinery has evolved to protect cells against undesirable RNAs, like RNA viruses in plants [17,18], or to limit the mobility of transposable elements in animals [19-21].

While RNAi and associated phenomena constitute exceptional recent basic science findings, they also provided a basis for the elaboration of powerful research tools. RNAi methodologies have been set up to perform reverse-genetics studies in a number of organisms. RNAi potency and flexibility have allowed to perform high-throughput genetic screens in several organisms [22-26]. In mammalian cells, the presence of long dsRNA (>50 base pairs) triggers the activation of sequence-unspecific interferon-related pathways [27-29]. To circumvent this difficulty, researchers resorted to the transfection of small interfering RNAs [16] or *in vivo* synthesis of small hairpin RNAs, which were demonstrated to produce gene-specific silencing [27,30,31]; reviewed in [32,33].

However, an siRNA might trigger a number of potential unspecific events such as the degradation of partially complementary mRNA due to cross-hybridization, leading to unspecific RNAi, or the translational arrest due to a micro RNA-like effect where an siRNA hybridizes to a mRNA with one or few mismatches. It is thus of paramount importance to ensure that the phenotypic effects observed as a result of siRNA presence in cells are due to silencing of the target gene only. Two large-scale studies show that siRNA-induced gene silencing of transiently- or stably-expressed mRNA is highly gene-specific and does not produce secondary effects detectable by genome-wide expression profiling [34,35]. In contrast, other works provided evidence that siRNAs can be target-unspecific, with the observation of silencing of genes that had limited sequence homology with the siRNA [36,37]. These reports should prompt scientists to assess the specificity of RNAi-silencing in any experiment. A solution to that problem, that we devised in trypanosomes and which is described in this report, is based on the rescuing of the RNAi-mediated loss-of-function phenotype by expressing an RNAi-resistant version of the target gene.

Trypanosomes are protozoan parasites belonging to the Kinetoplastida order. These unicellular flagellated organisms diverged very early in eukaryotic evolution, and exhibit a number of original features [38-40]. Trypanosomes were amongst the first organisms where RNAi was discovered [13,14], and a number of strategies have been devised to either transiently or permanently induce gene-

specific RNAi-silencing in these cells [14,41-43]. Examples of successful RNAi in trypanosomes used flagellar genes as targets which yielded easily monitored phenotypes [44]. From a structural point of view, the most conserved morphological feature of eukaryotic flagella is the axoneme, which is made of nine doublets of outer microtubules plus 2 central microtubules (so-called 9+2 axonemal structure). In trypanosomes, the flagellum not only has that axonemal structure, but it also has a lattice-like structure called the paraflagellar rod (PFR) that is positioned along the axoneme. The two main components of the PFR are TbPFR2 and TbPFR1, that share 60% primary sequence identity [45,46]. *TbPFR2* silencing leads to flagellar paralysis and trypanosomes do not swim anymore [13,47]. During the cell cycle, the cell first replicates its mitochondrial DNA (kinetoplast) and starts to grow a new flagellum whilst maintaining the old flagellum in place. Hence, a trypanosome which has two kinetoplasts and two nuclei will be close to completion of its cell cycle and will possess an old and a new flagellum [48]. This aspect is an interesting feature for RNAi-based studies of flagellar morphogenesis, because bi-flagellated cells have an "internal control" flagellum (the old one), while the new one has a phenotype corresponding to the RNAi-based gene knock-down. The presence of both the old and the new flagella in the same cell gives an indication of the time course of events when RNAi is induced in trypanosomes, leading to the appearance of a visible phenotype in the new flagellum while the older one is unchanged because it is not affected by gene silencing.

We previously established the degree of identity between the gene sequences capable of leading to cross-RNAi [47,49]. However, as mentioned earlier, each time a phenotype is observed in RNAi experiments, it is necessary to ensure that it is indeed due to the specific silencing of the targeted gene(s). Inspired by the procedure with which gene knock-out is usually performed (the control experiment is done by re-introducing the knocked-out gene to ensure that the lost function gets complemented), we devised a functional complementation strategy aimed at assessing that RNAi indeed targets the intended gene. This strategy, elaborated using the *TbPFR2* gene as a model system, involved the silencing of the *TbPFR2* target *via* its UTRs and the expression of a RNAi-resistant copy of the targeted gene. The RNAi-resistant gene was either a copy of *TbPFR2* with different UTRs or its *Trypanosoma cruzi* orthologue: *TcPFR2*. We found that inter-species complementation experiments were straight forward. This strategy opens a venue for functional gene dissection experiments where modified gene sequences can be tested for their ability to encode functional protein that can complement the RNAi-based loss-of-function phenotype.

Table 1: Silencing efficiencies after transfection of various dsRNAs. WT trypanosomes were transfected with *TbPFR2*, *FLA1* or *GFP* dsRNA.

dsRNA	Phenotype (%)	Time (hours)		
		0 h	15 h	22 h
<i>TbPFR2</i>	<i>TbPFR2</i> silencing	0	61.2 (n = 1069)	74.2 (n = 1069)
<i>FLA1</i>	<i>FLA1</i> silencing	0	56 (n = 586)	54 (n = 472)
<i>TbPFR2</i> + <i>GFP</i>	<i>TbPFR2</i> silencing	0	56.2 (n = 301)	70.9 (n = 243)
<i>TbPFR2</i> + <i>FLA1</i>	<i>TbPFR2</i> silencing	0	53.6 (n = 349)	69.7 (n = 210)
	<i>FLA1</i> silencing	0	59 (n = 349)	53 (n = 210)

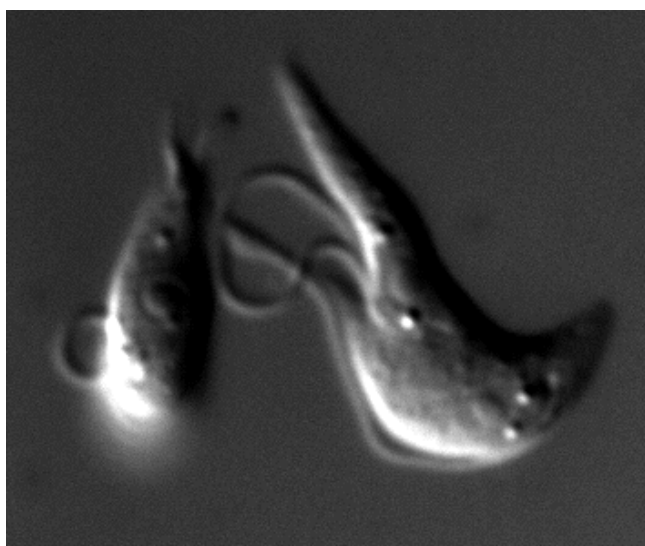


Figure 2
Silencing of *FLA1* and *TbPFR2* in *Trypanosoma brucei*. Wild type cells were simultaneously transfected with *FLA1* and *TbPFR2* dsRNA. At 22 h post-transfection, live cells were observed by differential interference contrast microscopy. Note the detached old flagellum and the dilation at the tip of the new flagellum (shorter one) of the rightmost cell.

Results and discussion
Multiple RNAi on trypanosomes

We wanted to establish if the co-transfection of two distinct dsRNAs, targeting two different genes, could trigger their simultaneous silencing. The genes selected were *TbPFR2* and *FLA1*; *TbPFR2* encodes one of the two major components of the paraflagellar rod and is necessary for flagellum motility [13]; *FLA1* encodes a protein required for flagellum attachment to the cell body [50]. These dsRNAs were transfected simultaneously in wild-type

trypanosomes. As a control experiment, we used *GFP* dsRNA.

Cells were monitored for their acquired phenotype 15 h and 22 h after transfection (Table 1). The extinction of *TbPFR2* was followed by immunofluorescence microscopy using the L8C4 anti-*TbPFR2* monoclonal antibody. *FLA1* gene silencing was analyzed by differential interference contrast microscopy, as it results in the visible detachment of the flagellum from the cell body (Figure 2).

The transfection of *TbPFR2* dsRNA yielded potent silencing, as more than 60 % of the cells showed no staining for L8C4 15 h later. Since old flagella pre-exist in cells which were affected by RNAi at the beginning of cell replication, the real percentage of silenced cells is probably higher than 60 %, which is confirmed by the fact that it built up to more than 74 % at time point 22 h. The transfection of *FLA1* dsRNA produced a phenotype in which the flagellum was detached from the cell body in more than 50 % of the cells. When both dsRNAs were co-transfected, both phenotypes were indeed observed, with similar frequencies to experiments where only one dsRNA was transfected. All the transfected cell populations did show a comparable growth rate (data not shown). The trypanosomes shown in Figure 2 had been transfected with both dsRNAs and the cell on the right is starting cytokinesis. The old flagellum of that cell is detached, while the new flagellum is attached along the cell body. The new flagellum exhibits a dilation of its distal tip, probably corresponding to the accumulation of *TbPFR1*, that is not assembled but still transported to the distal tip of the flagellum in the absence of *TbPFR2* [13]. This observation demonstrates the usefulness of double-transfection experiments also for kinetics analysis. In our case, 22 h after dsRNAs transient transfection, the phenotype due to the *FLA1* silencing is no longer visible in the new flagellum while that same flagellum still exhibits the phenotype due to the *TbPFR2* silencing, clearly indicating different turnover for *TbPFR2* and *FLA1* proteins.

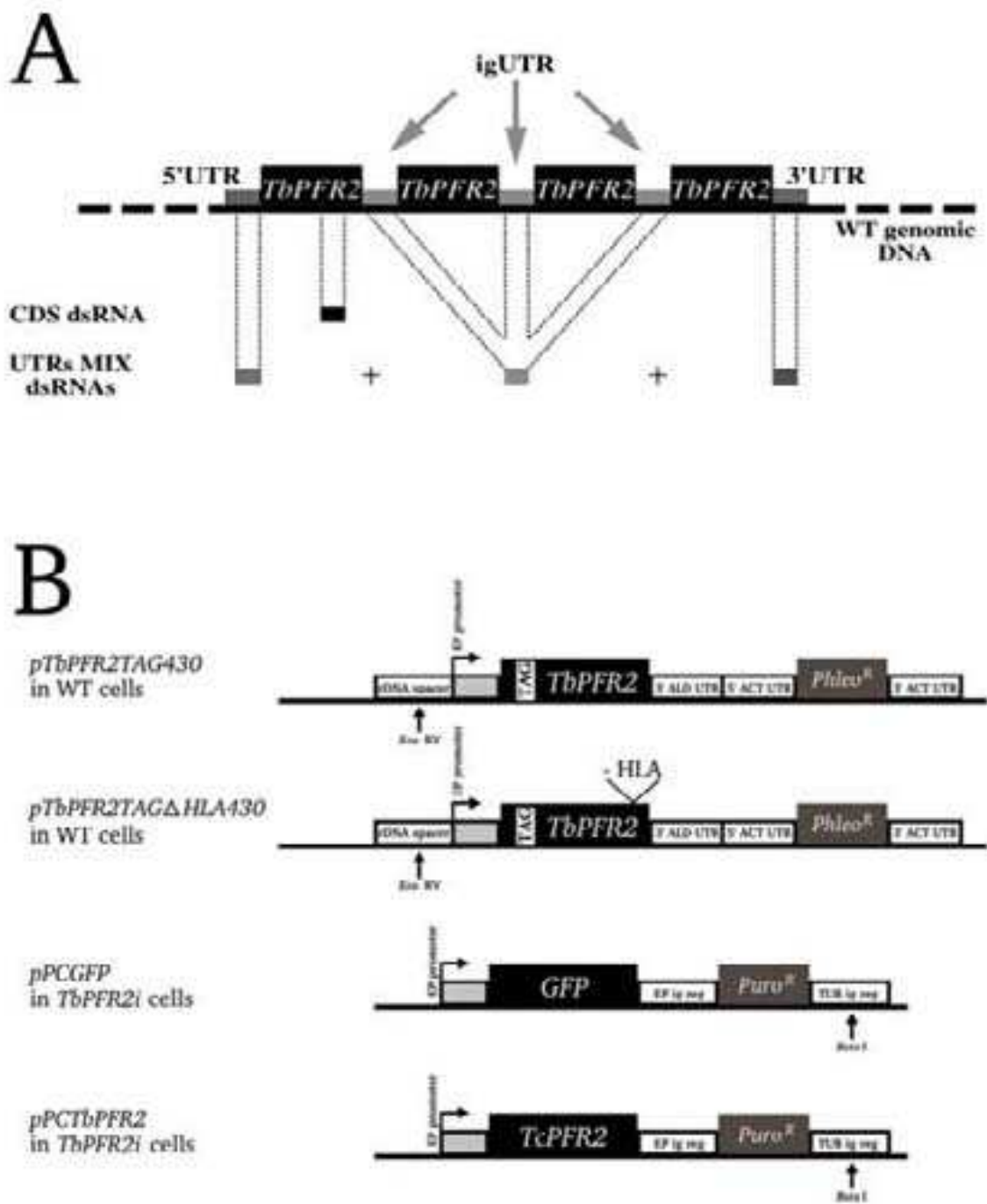


Figure 1
dsRNAs and plasmids used for transfections. (A) Not-to-scale schematic representation of the endogenous *TbPFR2* locus, with four copies of *TbPFR2* coding sequence and specific UTRs. Regions targeted by RNAi are highlighted. The *TbPFR2* coding sequence was targeted using CDS dsRNA and the UTRs were targeted all together with a set of dsRNA homologous to the 3' UTR, the intergenic UTR (igUTR) and the 5' UTR (UTRs MIX dsRNAs). (B) Not-to-scale representation of the constructs used for the transfection of WT cells (*pTbPFR2TAG430* and *pTbPFR2TAG430-ΔHLA*; integration in the rDNA spacer) or *TbPFR2i* cells (*pPCGFP* and *pPCTcPFR2*; integration in the tubulin intergenic region). Large boxes represent protein coding sequences (black boxes: proteins of interest; grey boxes: antibiotic-resistance activities). Each plasmid was linearized with the indicated restriction enzyme prior to transfection into the cells. 3' *ALD UTR*: 3' UTR of the aldolase gene; *ACT UTR*: 5' or 3' UTR of the actin gene; *EP ig reg*: EP procyclin intergenic region; *TUB ig reg*: tubulin intergenic region.

Table 2: Silencing efficiencies after transfection of various dsRNAs.

Cell line	<i>TbPFR2</i> silencing in the new flagellum (% bi-flagellated cells)	
	dsRNA transfected	
WT	<i>TbPFR2</i> CDS	<i>TbPFR2</i> UTRs MIX
<i>TbPFR2tag</i>	88 % (n = 53)	62 % (n = 147)
<i>TbPFR2tag-ΔHLA</i>	68 % (n = 113)	2 % (n = 51)
	78 % (n = 100)	72 % (n = 100)

WT, *TbPFR2tag* and *TbPFR2tag-ΔHLA* trypanosomes were transfected with GFP, *TbPFR2* CDS or *TbPFR2* UTRs MIX dsRNAs and bi-nucleated/bi-flagellated cells were counted for the status of their new flagellum. The data presented in this table correspond to the immunofluorescence experiment described in Figure 3 (see text for details).

The RNAi machinery could cope with two different dsRNA populations, without – in our conditions – any visible saturation effect. These results show the feasibility of experiments involving the use of multiple dsRNAs, thus allowing studies on complex processes in the cell physiology. However, such complex experiments can only be envisaged after ensuring that the phenotypes resulting from RNAi are specifically due to silencing of the target gene. In order to address that specific problem, we elaborated a method that involves RNAi experiments on trypanosomes that were engineered to possess an extra RNAi-resistant copy of the targeted gene, leading to functional complementation.

Gene silencing by dsRNA targeting UTRs

As a model for this study, we chose the *TbPFR2* gene, which is present in four copies in the WT trypanosome genome (Figure 1A), all transcribed as a single long polycistronic mRNA. All these gene copies are separated by three identical intergenic UTRs (igUTR), while the first copy has a unique 5' UTR and the last copy has a unique 3'UTR. Three types of dsRNA populations were used in our experiments, and termed as follows. dsRNA homologous to the GFP sequence was labelled "GFP dsRNA"; dsRNA homologous to coding sequence of the *TbPFR2* gene was labelled "CDS dsRNA"; finally, the mixture of three dsRNAs homologous to the 5' UTR, igUTR and 3'UTR of the *TbPFR2* gene was termed "UTRs MIX dsRNAs" (Figure 1A). These dsRNAs were transfected into three cell lines: WT, *TbPFR2tag* and *TbPFR2tag-ΔHLA* (see Methods). For each experiment, the presence or absence of TbPFR2 in the new flagellum of bi-nucleated/bi-flagellated cells was monitored by immunofluorescence 14 h after the transfection (Table 2).

Reports in [14,24] showed that RNAi silencing of a gene can be accomplished by targeting transcribed non-coding sequences. Here, we wanted to make sure that this kind of experiment was still feasible with a more complex system such as the *TbPFR2* multigene locus, where multiple and

distinct UTRs regulate the expression of four *TbPFR2* isoforms. We first transfected WT trypanosomes with GFP dsRNA as a negative control and did not detect any *TbPFR2* silencing (Figure 3A). Second, WT trypanosomes were transfected with the CDS dsRNA: 88 % of cells showed typical *TbPFR2* silencing with an anti-TbPFR2 immunofluorescence showing that the protein was missing from the new flagellum (Figure 3B). Finally, the WT trypanosomes were transfected with the UTRs MIX dsRNAs, yielding the same phenotype as for the CDS dsRNA, although the silencing appeared less pronounced (Figure 3C and Table 2). Overall, these results demonstrate that RNAi could efficiently silence all of the *TbPFR2* gene copies by targeting non-coding sequences present at the mRNA level.

When WT trypanosomes were transfected with *TbPFR2* dsRNA complementary to only one UTR, the cells did not display any specific phenotype (data not shown). This observation is probably explained by the organization of the *TbPFR2* locus: the polycistronic transcript is rapidly spliced into three different types of mRNA, each encoding one of the four copies of *TbPFR2* [51-53]. Thus, even if one type of *TbPFR2* RNA is destroyed, the three remaining ones would likely provide enough RNA to synthesize TbPFR2 levels compatible with normal PFR formation.

To demonstrate that the silencing observed upon transfection of WT trypanosomes with the UTRs MIX dsRNAs was due to the actual targeting of *TbPFR2*, we used two cell lines expressing a supplementary tagged *TbPFR2* gene copy. The *TbPFR2tag* cell line expresses the TbPFR2-TAG protein which correctly localizes to the flagellum.

The *TbPFR2tag-ΔHLA* cell line expresses TbPFR2-TAG-ΔHLA, lacking the HLA tripeptide, which prevents its localization to the flagellum. To determine both the cellular localization of the tagged TbPFR2 proteins (TbPFR2-TAG and TbPFR2-TAG-ΔHLA) and the completeness of the PFR assembly, immunofluorescence

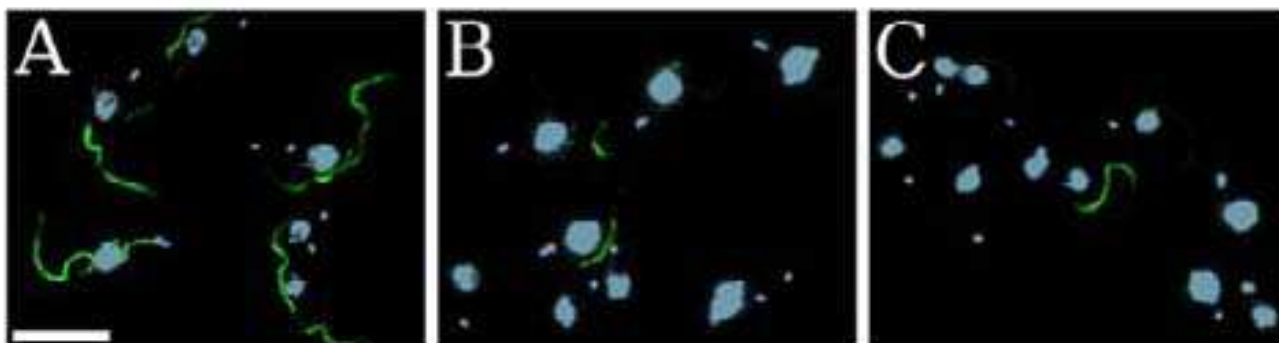


Figure 3

TbPFR2 silencing by targeting its UTRs all together. WT cells were transfected with GFP dsRNA (A), CDS dsRNA (B) or UTRs MIX dsRNAs (C). At 14 h post-transfection, cells were treated for immunofluorescence using the L8C4 anti-TbPFR2 antibody (green) and counterstained with DAPI (blue). Cells of interest are bi-nucleated/bi-flagellated. Transfection of GFP dsRNA did not produce any specific phenotype. Both the CDS dsRNA and the UTRs MIX dsRNAs successfully silenced *TbPFR2*. Scale bar: 10 μ m. See text for details.

experiments were carried out with the BB2 and ROD-1 antibodies; the former recognizes the Ty-1 epitope tag present on the two tagged *TbPFR2* proteins [54], while the latter is a marker for full PFR assembly [55,56].

GFP dsRNA was transfected as a negative control in each cell line. As expected, this did not yield any *TbPFR2* silencing: *TbPFR2* was decorated in both the old and new flagella by the anti-TbPFR2 antibody, and the PFR could be assembled fully, as evidenced by its staining with the ROD-1 antibody (data not shown, Table 2). In *TbPFR2tag* cells, *TbPFR2*-TAG was able to localize to the PFR, as evidenced by the PFR decoration with BB2 (red color, Figure 4A). In contrast, *TbPFR2*-TAG- Δ HLA failed to do so in *TbPFR2tag*- Δ HLA cells, and the BB2 signal was detected in the cytoplasm, as expected (red color, Figure 4D).

We next compared *TbPFR2tag* trypanosomes after transfection with either CDS dsRNA or UTRs MIX dsRNAs. *TbPFR2tag* cells transfected with CDS dsRNA had a flagellum not (or faintly) decorated with the anti-TbPFR2 antibody, demonstrating that both the WT and the recombinant *TbPFR2* gene copies were efficiently silenced (Table 2). That result was confirmed with anti-TAG immunofluorescence that showed no staining of the flagellum, demonstrating that *TbPFR2*-TAG was absent (no red color, Figure 4B). This lack of both *TbPFR2* and *TbPFR2*-TAG led to an incomplete assembly of the PFR, which was therefore not decorated with the ROD-1 antibody (no yellow color, Figure 4B). In contrast, cells transfected with the UTRs MIX dsRNAs exhibited a WT phenotype, with only 2 % of the cells displaying *TbPFR2* silencing in the flagellum (Table 2). In this case, the

tagged protein was expressed, leading to complete assembly of the PFR (yellow color, Figure 4C) because the protein is functional and localized to the flagellum (red color, Figure 4C; [56]). This remarkable result indicates a complementation phenomenon that is explained by the fact that the tagged *TbPFR2* gene was not silenced, as it was expressed from a coding sequence flanked by UTRs from the expression vector: from the 5' UTR of the procyclin gene and from the 3'UTR of the aldolase gene (Figure 1B; [57]).

To definitely demonstrate that the complementation described above is indeed due to the expression of functional *TbPFR2*-TAG, we transfected the same dsRNA into *TbPFR2tag*- Δ HLA trypanosomes expressing a modified *TbPFR2* protein missing three amino acids (that is nine nucleotides out of 1800). *TbPFR2tag*- Δ HLA does not access the flagellar compartment and thus cannot be functional [58]. Transfecting either CDS dsRNA or UTRs MIX dsRNAs produced cells in which the new flagellum was not (or faintly) decorated by the anti-TbPFR2 antibody (Table 2). *TbPFR2*-TAG- Δ HLA was not decorated by the anti-TAG antibody when cells were transfected with CDS dsRNA (red color, Figure 4E), indicating that both the WT and the tagged *TbPFR2* copies were silenced, thus leading to an incomplete PFR edification (yellow color, Figure 4E). In contrast, transfection of UTRs MIX dsRNAs did not prevent the expression of the recombinant *TbPFR2*-TAG- Δ HLA protein, as it appeared stained by the anti-TAG antibody (red color, Figure 4F). However, that non-functional protein could not participate in the construction of the PFR, as shown by the absence of ROD-1 signal in the new

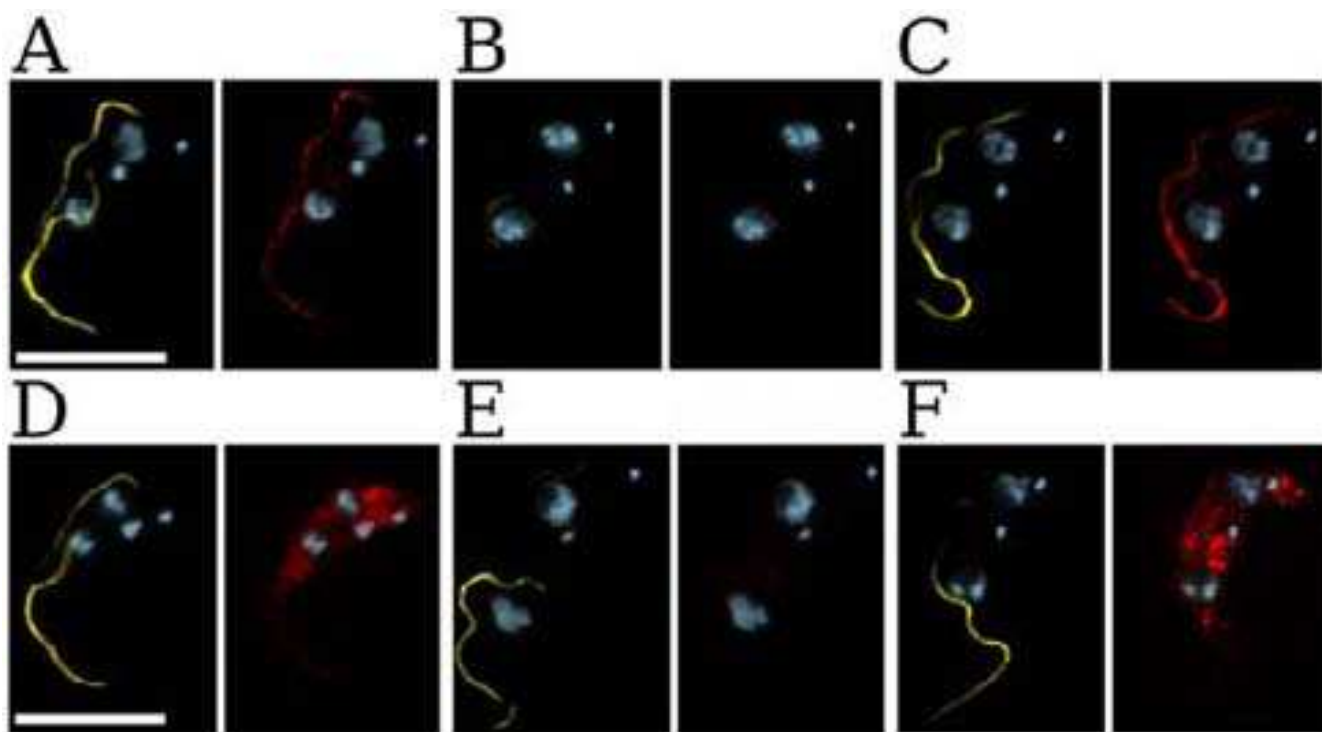


Figure 4

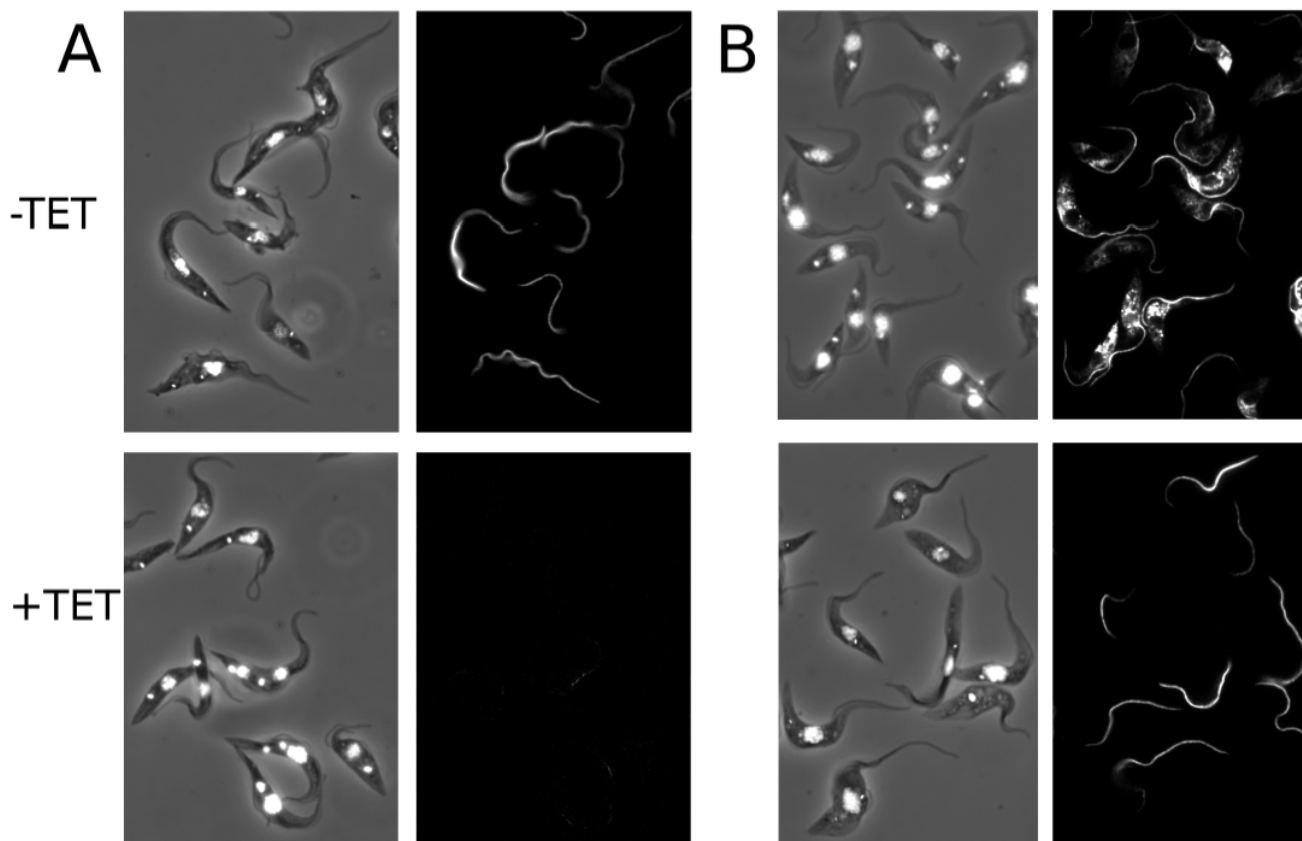
Structural complementation of RNAi mutants. *TbPFR2tag* (panels A–C) or *TbPFR2tag-ΔHLA* (panels D–F) cells were transfected with GFP dsRNA (first column), CDS dsRNA (second column) or UTRs MIX dsRNAs (last column). At 14 h post-transfection, cells were treated for immunofluorescence with both the ROD-1 antibody (marker for full PFR assembly, yellow) and the BB2 anti-TAG antibody (red). All cells were counterstained with DAPI (blue). Cells of interest are bi-nucleated/bi-flagellated. Transfection of GFP dsRNA (A, D) did not produce any specific phenotype, whatever the recipient cells: the paraflagellar rod could assemble normally (yellow). As expected, *TbPFR2-TAG* localized to the flagellum (A, red), while *TbPFR2-TAG-ΔHLA* accumulated in the cytosol (D, red). The CDS dsRNA (B, E) successfully silenced the WT and the tagged *TbPFR2* genes on both cell lines: no tagged *TbPFR2* was stained with BB2; the paraflagellar rod could not assemble (no yellow signal is visible in the new flagellum). When using the UTRs MIX dsRNAs in *TbPFR2tag* and *TbPFR2tag-ΔHLA* cells, the wild-type *TbPFR2* gene is silenced (see Figure 3). However, only in the *TbPFR2tag* cells does *TbPFR2-TAG* complement the missing *TbPFR2* protein: *TbPFR2-TAG* was stained in the flagellum in (C, red). *TbPFR2-TAG-ΔHLA* failed to complement in the *TbPFR2tag-ΔHLA* cells: *TbPFR2-TAG-ΔHLA* was stained in the cytoplasm in (F, red). Thus, the paraflagellar rod could assemble fully in (C, yellow) but failed to do so in (F, yellow). Scale bar: 10 μ m.

flagellum, since it cannot access the flagellum (yellow color, Figure 4F).

RNA-directed RNA polymerase activity (RdRP) has been implicated as one possible step in the formation of siRNA in fungi [59], plants [17,18], and worms [60]. The fact that we could specifically silence WT *TbPFR2* by targeting its UTRs, without interfering with the tagged *TbPFR2* genes, suggests that spreading of silencing beyond the initial targeted sequence does not occur in trypanosomes [61-64].

Functional complementation with orthologue genes

We next asked if an RNAi-mediated loss of function could be complemented by the expression of a gene orthologue to the silenced one. The system used to answer that question involved the *TbPFR2i* cell line – that expresses *TbPFR2* dsRNA under the control of a tetracycline-inducible promoter [47] – into which constitutive expression of *Trypanosoma cruzi* *TbPFR2* orthologue (*TcPFR2*) was established using stable transfection procedures. *TbPFR2* and *TcPFR2* proteins share 90 % identity (both of them are recognized by the anti-*TbPFR2* L8C4 antibody), but their gene sequences have diverged enough for us to envisage that the RNAi-silencing of *TbPFR2* would not affect significantly the introduced *TcPFR2* gene (83 % overall nucle-

**Figure 5**

Interspecies structural complementation of RNAi mutants. *TbPFR2i*-derived trypanosomes, constitutively expressing GFP (panel A; *PCGFP* cells) or TcPFR2 (panel B; *PCTcPFR2* cells) were cultured for 48 h in the absence (-TET) or in the presence (+TET) of tetracycline. In these *TbPFR2i*-derived cells, tetracycline-induction triggers RNAi-silencing of the endogenous *TbPFR2* gene. The cells were then treated for immunofluorescence using L8C4 as an anti-TbPFR2 (right panel, black background) and counterstained with DAPI (left panel, merged with phase contrast image). Non-induced *PCGFP* cells show normal flagellar staining (A, -TET) while induced cells show an almost total loss of flagellar signal (A, +TET) due to silencing of *TbPFR2*. Non-induced *PCTcPFR2* cells show an intense L8C4 signal in the flagellum and sometimes in the cytoplasm, due to overexpression (B, -TET). Upon tetracycline-induction of these cells, the flagellar L8C4 decoration did not disappear, indicating that *TcPFR2* was not subject to RNAi and that TcPFR2 could successfully localize to the flagellum (B, +TET).

otide identity). We thus created two new cell lines based on the previously described *TbPFR2i* cells [47] (see Methods). TbPFR2 expression and cell motility were analyzed.

Our first experiment showed that the *PCGFP* cells constitutively expressed GFP, as detected by microscope observation of living cells (data not shown). Both the *PCGFP* and *PCTcPFR2* cell lines were induced to express *TbPFR2* dsRNA for 48 hours. Immunofluorescence revealed that non-induced *PCGFP* cells exhibit a WT-like phenotype (Figure 5A, -TET). When these cells were induced with tetracycline, expected *TbPFR2* silencing occurred (Figure 5A,

+TET). Non-induced *PCTcPFR2* cells displayed an intense anti-TbPFR2 antibody decoration with bright dots in the cytoplasm, indicative of TcPFR2 overexpression (such overexpression by the EP procyclin promoter is frequent; Figure 5B, -TET). When these same cells were tetracycline-induced, the flagellar staining was still perfectly visible, at a level comparable to the one previously observed in the non-induced *PCGFP* control cells (Figure 5B, +TET). Bright dots previously observed had disappeared, probably as a result of *TbPFR2* silencing. The fact that the paraflagellar rod was still neatly decorated by the anti-TbPFR2 antibody demonstrated that the *structural* inter-species

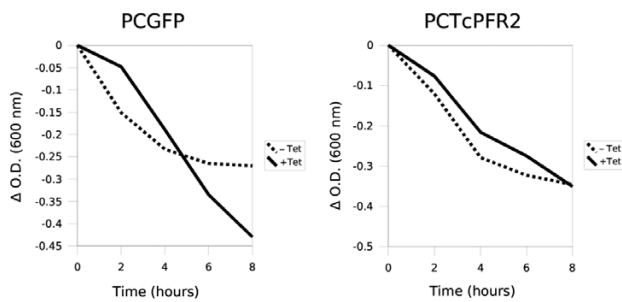


Figure 6
Phenotype analysis by sedimentation assay. *PCGFP* and *PCTcPFR2* trypanosomes were induced (+Tet) with tetracycline for 48 h or non-induced (-Tet) and grown in cuvettes. Non-motile cells do not swim and sediment to the bottom of the cuvette, leading to a reduction in optical density that can be monitored over time. The *PCTcPFR2* cells show an almost perfect functional complementation phenotype, as induced and non-induced cells had virtually identical sedimentation curves.

complementation had indeed taken place in these cells, with TcPFR2 being effectively located at the flagellum.

Did these structurally-complemented cells show a *functional* complementation, i.e. a normal flagellum motility (hence a normal cellular mobility)? To address this question, we performed a sedimentation assay [56] on non-induced and tetracycline-induced *PCGFP* and *PCTcPFR2* trypanosomes (Figure 6). Non-induced *PCGFP* cells showed a little tendency to sediment due to the fact that expression of *TbPFR2* dsRNA in *TbPFR2i* cells is partially leaky, producing low amounts of *TbPFR2* dsRNA even in the absence of tetracycline ([43]; Durand-Dubief and Bastin, unpublished data). When expression of *TbPFR2* dsRNA was fully induced, motility stopped leading to increased sedimentation (Figure 6, left panel). In contrast, expression of *TbPFR2* dsRNA in *PCTcPFR2* cells did not reduce motility (Figure 6, right panel). That result definitely demonstrates that the ortholog protein TcPFR2 fully complemented the loss of function resulting from *TbPFR2* silencing.

The complementation described above shows the robustness of our strategy, because *TbPFR2* and *TcPFR2* are highly similar (they share 82 % identity at the nucleotide level [65]) and are nonetheless correctly differentiated by the RNAi machinery. However, our complementation strategy might be more difficult to implement when the gene studied is too similar to the *T. brucei* counterpart. While this unfavorable case might happen with extremely

evolutionarily-related organisms, studies have shown that the overall genetic sequence identity between *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*, for example (the closest evolutionarily-related organisms envisaged for these studies), is roughly 80 % ([65] and [66]). [47] showed that this identity percentage is still compatible with an RNAi-based complementation strategy. It goes without saying that when the organisms are evolutionarily-distant, gene sequences diverge more rapidly than the protein sequences, thus laying off a field where our strategy can be implemented with good confidence that complementation will occur.

Conclusions

In this report, we demonstrated that RNAi-mediated silencing of a gene by targeting its UTRs is useful in studies where the loss of function resulting from this silencing must be complemented with the expression of an RNAi-resistant copy of the silenced gene, in order to demonstrate that the phenotype is indeed due to silencing of that gene, and not to inactivation of another one. The results obtained in this work are of particular interest when reverse-genetics studies cannot be easily achieved in organisms not amenable to RNAi, like *Leishmania* [67] or *Trypanosoma cruzi* [68], or where genetics experiments are hardly set up, like mammals. When genes from these organisms are to be studied, a complementation experiment can be set up as a three-step procedure whereby: 1) the ortholog gene in *Trypanosoma brucei* is RNAi-silenced and the loss-of-function phenotype is established; 2) *T. brucei* cells are engineered to ensure constitutive heterologous expression of the gene of interest, still allowing RNAi-mediated silencing of the *T. brucei* gene; 3) function of the investigated gene is assessed by checking if the loss-of-function phenotype observed in the first place gets complemented. Additionally, one application of the strategy described herein is genetic functional dissection, which is of interest when protein domains are to be characterized with respect to their function (e.g. the HLA tripeptide sequence in *TbPFR2* that localizes the protein to the flagellum).

Complementation had previously been demonstrated following transformation of mammalian cells with EGFP siRNA and expression of a codon-modified, but functional, EGFP version [69]. Our strategies are increasing flexibility for complementation studies after RNAi as unmodified genes can be used for rescue.

Methods

Trypanosomes

The procyclic *T. brucei brucei* strain 427 (or its derivatives) was used throughout this work. Cells were cultured at 27°C in semi-defined medium 79 (SDM 79) containing 10% foetal calf serum. *PFRAi* cells were described in [47].

The *TbPFR2i* trypanosomes can be tetracycline-induced to express *TbPFR2* dsRNA, thus eliciting an RNAi response against that gene. Note that this cell line is referred to as *TbPFR2i* in this article because of a change in the gene nomenclature [70].

RNAi assays by transient transfection

RNA was synthesized *in vitro* with T3 and Sp6 polymerases using PCR products as templates [71]. The following primers (incorporating T3 or Sp6 promoters) were used:

for *GFP* (from the nucleotide coding sequence 476–691 of the *EGFPN2* gene; Clontech), *AATTAACCCTCACTAAAGGGAGAAG AACGCGATCAAGGTGAAC* (T3 promoter italicized) and *ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGTGATCCCGGCGGCGGTCACG* (Sp6 promoter italicized);

for *FLA1*, *AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA CCAAACCGTGGGCACCAAGG* (T3 promoter italicized) and *ATT-TAGGTGAAGTATAGAAGAG GTGGGATGATTAACGAGC* (Sp6 promoter italicized);

for the *TbPFR2* 5' untranslated region (5' UTR; nucleotide sequence [-545→-1] upstream of *TbPFR2* ATG start codon), *AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA* (T3 promoter) and *ATTTAGGTGACACT-ATAGAAGAG* (Sp6 promoter);

for the *TbPFR2* intergenic untranslated region (igUTR), *AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA CGCTGCGCTTAAATGTCTT* (T3 promoter italicized) and *ATTTAGGTGACACTATAGAAGA GTGATGCTTTATTGCTTTCT* (Sp6 promoter italicized);

for the *TbPFR2* 3'untranslated region (3'UTR; nucleotide sequence [1→533] downstream of the *TbPFR2* TAG stop codon), *AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA* (universal T3 promoter) and *ATTTAGGTGACACTATAGAAGAG* (universal Sp6 promoter);

for the *TbPFR2* coding sequence (CDS; nucleotide coding sequence [1084→1358]), *ATTTAGGTGACACTATAGA GAGGTGAAGCGCCGTATTGAGGA* (Sp6 promoter italicized) and *AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA GTTTTGTACAGGCGACGGAA* (T3 promoter italicized);

Figure 1A shows the *TbPFR2* locus and the position of the two dsRNA populations that were used, and their homology to either the coding sequence (labelled "CDS dsRNA") or the different 5'UTR, igUTR and 3'UTR all together (labelled "UTRs MIX dsRNAs"). A third dsRNA, homologous to the *GFP* gene is labelled "GFP dsRNA" throughout this work and was used as a control dsRNA. dsRNA was introduced into trypanosomes by electroporation, as described [14].

Plasmids

Plasmid pPC was generated from plasmid pSk1-GFP [50] as follows: pSk1-GFP was digested with *Hind* III and *Eco* RI to remove the *GFP* gene. Oligonucleotides *AGCTGTCTAGCGATATCGGATCCG* (forward) and *AATTCGGATCCGATATCGCTAGCA* (reverse) were annealed (protruding ends italicized) and the resulting double-strand oligonucleotide was ligated into the pSk1-GFP plasmid, resulting in the insertion of a poly-linker containing restriction sites *Cla* I, *Hind* III, *Nhe* I, *Eco* RV, *Bam* HI and *Eco* RI (Branche and Bastin; unpublished data). Plasmid pPCTcPFR2 was generated as follows: amplification of the *TcPFR2* gene was performed using *Trypanosoma cruzi* genomic DNA (kind gift of Cécile Gallet and Philippe Grellier, MNHN) and the two primers *TcPFR2H* (*GAGTCTAAGCTTATGAGCTACAAGGAGGCATC*) and *TcPFR2ER* (*GCGTGGAATTCTTACTGTGTGATCTGCTGCAC*). Both the amplified DNA fragment and the pPC plasmid were digested with *Eco* RI and *Hind* III. The fragment was ligated into pPC so as to yield the plasmid pPCTcPFR2 (Figure 1B).

Cell lines

The different constructs used to transform trypanosomes are shown on Figure 1B. The cell lines were established as follows.

WT-derived trypanosomes constitutively expressing *TbPFR2-TAG* proteins

The *TbPFR2tag* cell line was derived from the WT cell line into which the pTbPFR2TAG430 plasmid [72] was transfected. The recombinant cells constitutively expressed the *TbPFR2-TAG* protein, that is localized in the flagellum (Fig 4D). Tagged *TbPFR2* is known to be functional [56,72]. In contrast, transformation of WT cells with the pTbPFR2TAGΔHLA430 plasmid lead to the expression of slightly modified *TbPFR2* protein, missing only three amino acids, that failed to enter the flagellum compartment and hence was found in the cell body cytoplasm [58] (Fig 4G). This cell line was called *TbPFR2tag-ΔHLA*. After electroporation [73], cells were grown overnight and then distributed in 24-well plates in the presence of phleomycin (2 μg/mL) for selection.

TbPFR2i-derived trypanosomes constitutively expressing *GFP* and *TcPFR2*

TbPFR2i cells [47] constituted the genetic background into which we established the *PCGFP* and *PCTcPFR2* new cell lines. The *PCGFP* cell line was established by transfecting *TbPFR2i* cells with plasmid pPCGFP after linearization with *Bst*X I. For establishing the *PCTcPFR2* cell line, the pPCTcPFR2 plasmid was linearized with *Bst*X I and transfected into *TbPFR2i* cells. Recombinant cells were selected by addition of puromycin (1 μg/mL), phleomycin (2 μg/

mL), G418 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and hygromycin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to the culture medium.

Immunofluorescence and microscopy

Three different monoclonal antibodies were used as hybridoma supernatants: L8C4, IgG recognizing *T. brucei* TbPFR2 and cross-reacting with *T. cruzi* orthologue TcPFR2 [74]; BB2, IgG recognizing the Ty-1 tag of the TbPFR2-TAG and TbPFR2-TAG- Δ HLA recombinant proteins [54]; and ROD-1, IgM recognizing a doublet of minor PFR proteins [55]. For immunofluorescence, trypanosomes were spread onto poly-L-lysine-coated slides, fixed in cold methanol and processed as described [75]. Experiments involving the use of L8C4 only were performed with an FITC-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody. Double-staining experiments using BB2 and ROD-1 were performed with a TRITC-conjugated specific anti-mouse IgG secondary antibody and an FITC-conjugated specific anti-mouse IgM secondary antibody. DNA was systematically stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Slides were examined with a Leica DMR microscope, images were captured using a cooled CCD camera (Cool Snap HQ, Roper Scientific) and processed with the GNU image manipulation program version 2 [76].

Cell sedimentation assay

The trypanosome sedimentation assay was performed as described in [56]. Briefly: trypanosomes were grown at $\approx 5 \cdot 10^6$ cells/mL in normal culture medium, with or without 48 hour tetracycline induction. 1 mL of these cultures was dispensed to 5 plastic spectrophotometry cuvettes, for time points 0, 2, 4, 6, 8 hours, and left still. At each time point, the optical density at 600 nm was measured twice: first without mixing (O.D._{no mix}) and second after mixing the cuvette (O.D._{mix}). Data were plotted as a function of time.

Authors' contributions

F.R. carried out most of the experiments reported and wrote the manuscript, M.D.-D. performed the double transfection reported at Table 1 & Figure 2 and P.B. conceived the study and participated in its design and coordination.

Acknowledgements

We wish to thank Linda Kohl for live image acquisition, Carole Branche for providing pPC, Cécile Gal-let and Philippe Grellier for providing *T. cruzi* genomic DNA and Sabrina Benganem for helpful discussions. M.D.-D. is supported by a "Bourse de formation recherche du Gouvernement luxembourgeois". This work was financed with the following grants: "ACI dynamique et réactivité des assemblages biologiques", (CNRS and Ministère de la recherche), "ACI biologie du développement et physiologie intégrative" (Ministère de la recherche), "GIS recherche sur les maladies rares" (INSERM and Institut des Maladies rares).

References

1. Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391(6669)**:806-11.
2. Hamilton A, Baulcombe D: **A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.** *Science* 1999, **286(5441)**:950-2.
3. Bernstein E, Caudy A, Hammond S, Hannon G: **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** *Nature* 2001, **409(6818)**:363-6.
4. Zamore P, Tuschl T, Sharp P, Bartel D: **RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals.** *Cell* 2000, **101**:25-33.
5. Nykanen A, Haley B, Zamore P: **ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway.** *Cell* 2001, **107(3)**:309-21.
6. Schwarz D, Hutvagner G, Haley B, Zamore P: **Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways.** *Mol Cell* 2002, **10(3)**:537-48.
7. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R: **Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.** *Plant Cell* 1990, **2(4)**:279-289.
8. van der Krol A, Mur L, Beld M, Mol J, Stuitje A: **Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression.** *Plant Cell* 1990, **2(4)**:291-9.
9. Cogoni C, Irelan J, Schumacher M, Schmidhauser T, Selker E, Macino G: **Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation.** *EMBO J* 1996, **15(12)**:3153-63.
10. Ruiz F, Vayssie L, Klotz C, Sperling L, Madeddu L: **Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*.** *Mol Biol Cell* 1998, **9(4)**:931-43.
11. Kennerdell J, Carthew R: **Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway.** *Cell* 1998, **95(7)**:1017-26.
12. Misquitta L, Paterson B: **Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96(4)**:1451-6.
13. Bastin P, Sherwin T, Gull K: **Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility.** *Nature* 1998, **391(6667)**:548.
14. Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E: **Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95(25)**:14687-92.
15. Wianny F, Zernicka-Goetz M: **Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development.** *Nat Cell Biol* 2000, **2(2)**:70-5.
16. Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.** *Nature* 2001, **411(6836)**:494-8.
17. Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J, Jouette D, Lacombe A, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo T, Vaucheret H: ***Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance.** *Cell* 2000, **101(5)**:533-42.
18. Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe D: **An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus.** *Cell* 2000, **101(5)**:543-53.
19. Tabara H, Sarkissian M, Kelly W, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello C: **The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*.** *Cell* 1999, **99(2)**:123-32.
20. Ketting R, Haverkamp T, van Luenen H, Plasterk R: ***Mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD.** *Cell* 1999, **99(2)**:133-41.
21. Sijen T, Plasterk R: **Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi.** *Nature* 2003, **426(6964)**:310-4.
22. Fraser A, Kamath R, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J: **Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference.** *Nature* 2000, **408(6810)**:325-30.

23. Gonczy P, Echeverri C, Oegema K, Coulson A, Jones S, Copley R, Duperon J, Oegema J, Brehm M, Cassin E, Hannak E, Kirkham M, Pichler S, Flohrs K, Goessen A, Leidel S, Alleaume A, Martin C, Ozlu N, Bork P, Hyman A: **Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III.** *Nature* 2000, **408(6810)**:331-6.
24. Morris J, Wang Z, Drew M, Englund P: **Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library.** *EMBO J* 2002, **21(17)**:4429-38.
25. Kiger A, Baum B, Jones S, Jones M, Coulson A, Echeverri C, Perrimon N: **A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference.** *J Biol* 2003, **2(4)**:27.
26. Kamath R, Fraser A, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman D, Zipperlen P, Ahringer J: **Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi.** *Nature* 2003, **421(6920)**:231-7.
27. Paddison P, Caudy A, Bernstein E, Hannon G, Conklin D: **Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells.** *Genes Dev* 2002, **16(8)**:948-58.
28. Svoboda P, Stein P, Schultz R: **RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **287(5)**:1099-104.
29. Stark G, Kerr I, Williams B, Silverman R, Schreiber R: **How cells respond to interferons.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:227-64.
30. Yu J, DeRuiter S, Turner D: **RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99(9)**:6047-52.
31. Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester W, Shi Y: **A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99(8)**:5515-20.
32. McManus M, Sharp P: **Gene silencing in mammals by small interfering RNAs.** *Nat Rev Genet* 2002, **3(10)**:737-47.
33. Dykxhoorn D, Novina C, Sharp P: **Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4(6)**:457-67.
34. Chi J, Chang H, Wang N, Chang D, Dunphy N, Brown P: **Genome-wide view of gene silencing by small interfering RNAs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100(11)**:6343-6.
35. Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert D, Fesik S: **Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100(11)**:6347-52.
36. Jackson A, Bartz S, Schelter J, Kobayashi S, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley P: **Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi.** *Nat Biotechnol* 2003, **21(6)**:635-7.
37. Scacheri P, Rozenblatt-Rosen O, Caplen N, Wolfsberg T, Umayam L, Lee J, Hughes C, Shanmugam K, Bhattacharjee A, Meyerson M, Collins F: **Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101(7)**:1892-7.
38. Clayton C, Hausler T, Blattner J: **Protein trafficking in kinetoplastid protozoa.** *Microbiol Rev* 1995, **59(3)**:325-44.
39. Gull K: **The cytoskeleton of trypanosomatid parasites.** *Annu Rev Microbiol* 1999, **53**:629-55.
40. Vanhamme L, Pays E: **Control of gene expression in trypanosomes.** *Microbiol Rev* 1995, **59(2)**:223-40.
41. Bastin P, Ellis K, Kohl L, Gull K: **Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system.** *J Cell Sci* 2000, **113(Pt 18)**:3321-8.
42. LaCount D, Bruse S, Hill K, Donelson J: **Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters.** *Mol Biochem Parasitol* 2000, **111**:67-76.
43. Wang Z, Morris J, Drew M, Englund P: **Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters.** *J Biol Chem* 2000, **275(51)**:40174-9.
44. Kohl L, Robinson D, Bastin P: **Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes.** *EMBO J* 2003, **22(20)**:5336-46.
45. Bastin P, Matthews K, Gull K: **The paraflagellar rod of Kinetoplastida: solved and unsolved questions.** *Parasitol Today* 1996, **12**:302-307.
46. Maga J, LeBowitz J: **Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod.** *Trends Cell Biol* 1999, **9(10)**:409-13.
47. 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.
48. Sherwin T, Gull K: **The cell division cycle of *Trypanosoma brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1989, **323(1218)**:573-88.
49. Redmond S, Vadivelu J, Field M: **RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*.** *Mol Biochem Parasitol* 2003, **128**:115-8.
50. LaCount D, Barrett B, Donelson J: ***Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis.** *J Biol Chem* 2002, **277(20)**:17580-8.
51. Schlaeppi K, Deflorin J, Seebeck T: **The major component of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* is a helical protein that is encoded by two identical, tandemly linked genes.** *J Cell Biol* 1989, **109(4 Pt 1)**:1695-709.
52. Deflorin J, Rudolf M, Seebeck T: **The major components of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* are two similar, but distinct proteins which are encoded by two different gene loci.** *J Biol Chem* 1994, **269(46)**:28745-51.
53. Birkett C, Parma A, Gerke-Bonet R, Woodward R, Gull K: **Isolation of cDNA clones encoding proteins of complex structures: analysis of the *Trypanosoma brucei* cytoskeleton.** *Gene* 1992, **110**:65-70.
54. Bastin P, Bagherzadeh Z, Matthews K, Gull K: **A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*.** *Mol Biochem Parasitol* 1996, **77(2)**:235-9.
55. Woods A, Sherwin T, Sasse R, MacRae T, Baines A, Gull K: **Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies.** *J Cell Sci* 1989, **93(Pt 3)**:491-500.
56. Bastin P, Pullen T, Sherwin T, Gull K: **Protein transport and flagellum assembly dynamics revealed by analysis of the paralysed trypanosome mutant snl-1.** *J Cell Sci* 1999, **112(Pt 21)**:3769-77.
57. Wirtz E, Clayton C: **Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor.** *Science* 1995, **268(5214)**:1179-83.
58. Ersfeld K, Gull K: **Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*.** *J Cell Sci* 2001, **114(Pt 1)**:141-148.
59. Cogoni C, Macino G: **Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase.** *Nature* 1999, **399(6732)**:166-9.
60. Smardon A, Spoerke J, Stacey S, Klein M, Mackin N, Maine E: **EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*.** *Curr Biol* 2000, **10(4)**:169-78.
61. Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen K, Parrish S, Timmons L, Plasterk R, Fire A: **On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing.** *Cell* 2001, **107(4)**:465-76.
62. Elbashir S, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T: **Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate.** *EMBO J* 2001, **20(23)**:6877-88.
63. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T: **Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi.** *Cell* 2002, **110(5)**:563-74.
64. Roignant J, Carre C, Mugat B, Szymczak D, Lepesant J, Antoniewski C: **Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*.** *RNA* 2003, **9(3)**:299-308.
65. Beard C, Saborio J, Tewari D, Kriegstein K, Henschen A, Manning J: **Evidence for two distinct major protein components, PAR 1 and PAR 2, in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. Complete nucleotide sequence of PAR.** *J Biol Chem* 1992, **267(30)**:21656-62.
66. Worthey E, Schnauffer A, Mian I, Stuart K, Salavati R: **Comparative analysis of editosome proteins in trypanosomatids.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31(22)**:6392-408.
67. Robinson K, Beverley S: **Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*.** *Mol Biochem Parasitol* 2003, **128(2)**:217-28.
68. DaRocha W, Otsu K, Teixeira S, Donelson J: **Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-**

- inducible T7 promoter system in Trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol* 2004, **133(2)**:175-86.**
69. Kim D, Rossi J: **Coupling of RNAi-mediated target downregulation with gene replacement.** *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003, **13(3)**:151-5.
 70. Gadelha C, LeBowitz J, Manning J, Seebeck T, Gull K: **Relationships between the major kinetoplastid paraflagellar rod proteins: a consolidating nomenclature.** *Mol Biochem Parasitol* 2004, **136**:113-5.
 71. Durand-Dubief M, Bastin P: **TbAGO1, an Argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in Trypanosoma brucei.** *BMC Biol* 2003, **1**:2.
 72. Bastin P, MacRae T, Francis S, Matthews K, Gull K: **Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes.** *Mol Cell Biol* 1999, **19(12)**:8191-200.
 73. Beverley S, Clayton C: **Transfection of Leishmania and Trypanosoma brucei by electroporation.** *Methods Mol Biol* 1993, **21**:333-48.
 74. 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(2)**:105-9.
 75. Sherwin T, Schneider A, Sasse R, Seebeck T, Gull K: **Distinct localization and cell cycle dependence of COOH terminally tyrosinolated alpha-tubulin in the microtubules of Trypanosoma brucei brucei.** *J Cell Biol* 1987, **104(3)**:439-46.
 76. Kimball S, Mattis P, Others: **The GIMP, the GNU image manipulation program.** [<http://www.gimp.org>].

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Résultats

2^{ème} partie :

Protéines impliquées dans l'ARN interférence

II.B Protéines impliquées dans l'ARN interférence

L'identification des protéines impliquées dans l'ARNi est une étape nécessaire à la compréhension des mécanismes d'actions et de fonctions de ce mécanisme. Chez d'autres organismes, l'ARNi implique des protéines appartenant à plusieurs familles : les « RNA dependent RNA polymerase » (RdRp), les ARN hélicases, les RNases III de la famille 3 (Dicer) et les protéines Argonaute/Piwi. Par analyse bio-informatique du génome de *T. brucei*, nous avons recherché les homologues de ces gènes.

Nous avons identifié deux protéines TbAGO1 et TbPWI1 appartenant à la famille Argonaute/Piwi, (**figure 26**). La protéine TbAGO1 possède les domaines PAZ et piwi, alors que TbPWI1 ne possède que le domaine piwi et au contraire de TbAGO1 et est retrouvée chez *T. cruzi* et *Leishmania* n'effectuant pas l'ARNi (voir article Chapitre II. B. a). Les deux gènes étant exprimés chez la forme procyclique, nous les avons clonés et séquencés pour les étudier (*TbAGO1* : DB source AY433802.1, *TPWI1* : DB source AY4338803.1 en annexe). Les gènes ont été éteints par ARN interférence *via* le système « pZJM » (Wang et al., 2000) qui permet l'expression d'ARNdb à partir de deux promoteurs inductibles faisant face et encadrant un fragment des gènes d'intérêts (**figure 27**) (voir les différentes lignées en annexe). Plusieurs lignées pZJM-*TbAGO1* induites par rapport aux non induites et au contrôle non-induit présentent un léger retard de croissance. Par contre les lignées pZJM-*TPWI1* induites ne présentent pas de phénotype de croissance particulier. Ces expériences sont toutefois délicates vu qu'on utilise l'ARNi pour étudier des gènes potentiellement impliqués dans l'ARNi. Nous avons poursuivi l'étude de ces gènes au chapitre suivant.

Trypanosoma brucei, à l'inverse de *T. cruzi* (DaRocha et al., 2004), est capable de fragmenter les grands ARNdb en petits fragments, suggérant une activité Dicer (Djikeng et al., 2001). Nous avons donc recherché et identifié plusieurs RNases III (reconnaissable à leur domaine catalytique) mais aucune ne possède toutes les signatures (hélicase, PAZ, dsRNAdb) de Dicer. Nous avons remarqué qu'un candidat nommé RBN (GeneDB Tb08.26A17.170)(**figure 26**) est de taille similaire aux Dicer chez les autres espèces et est exprimé chez la forme procyclique. Nous avons généré et analysé des mutants ARNi pZJM-*RBN*, mais les lignées induites et non induites ne présentent pas de défauts particuliers dans la mitose et la croissance (**figure 27**).

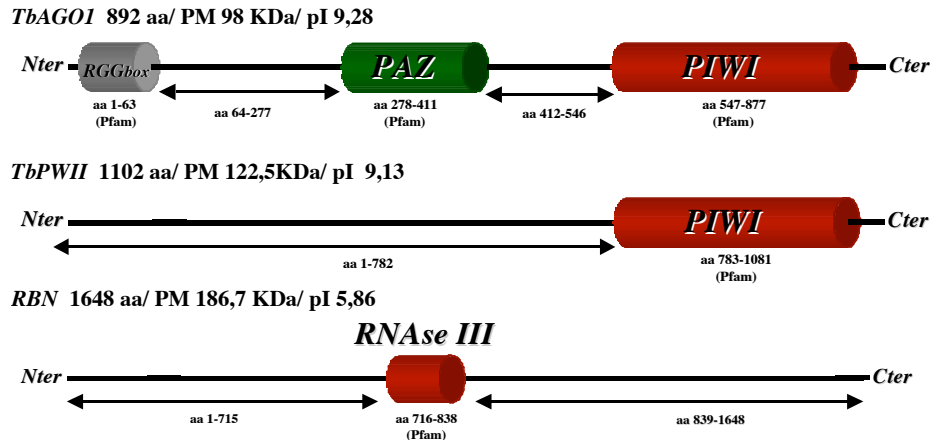


Figure 26 Représentation schématique des protéines TbAGO1, TbPW11 et RBN

Les zones cylindriques et colorées ont été identifiées par Pfam, base de données cataloguant les domaines conservés. Le point isoélectrique (pI) a été calculé par le programme pI/MW tool d'EXPASY.

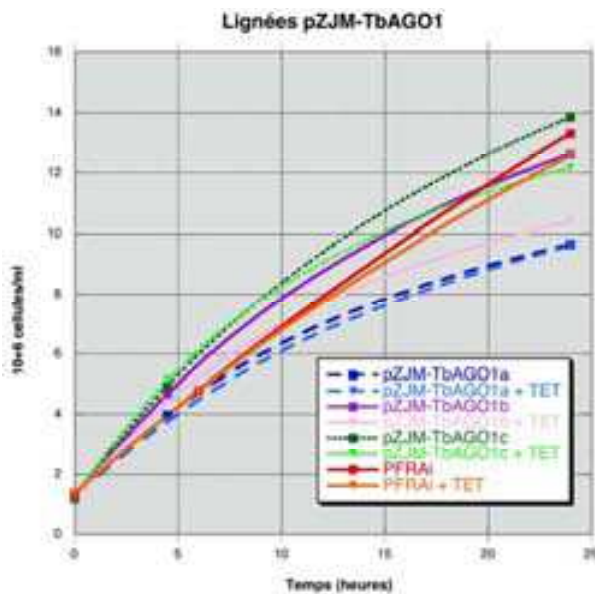
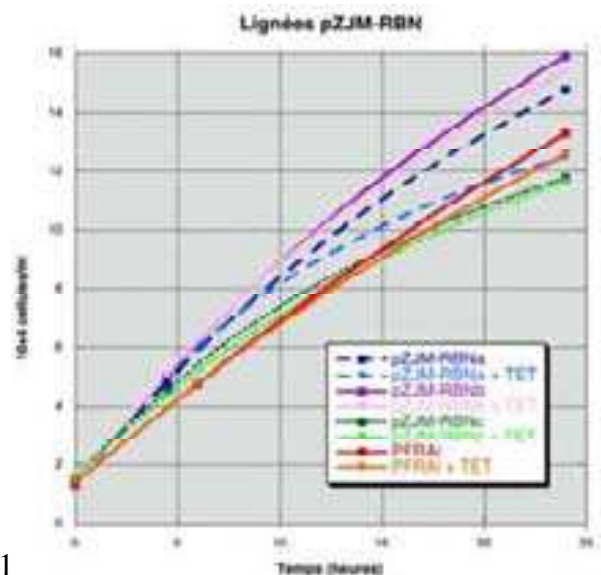
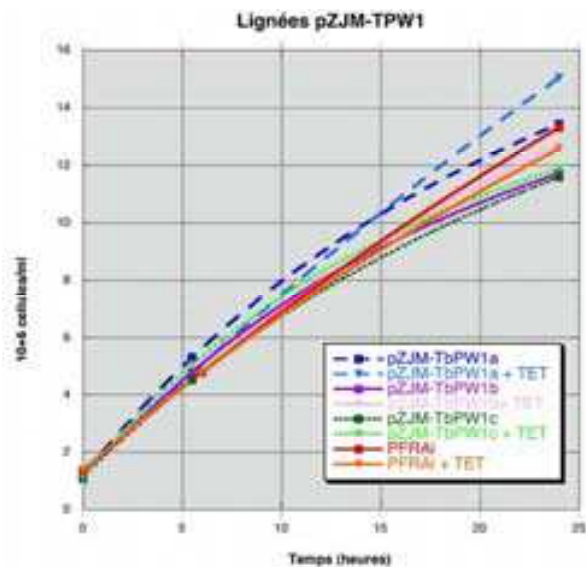


Figure 27 Analyse de la croissance cellulaire au cours du temps des lignées induites et non induites à la tétracycline.

Le témoin *PFRAi* (Durand-Dubief et al., 2003) cible un gène de la fibre paraflagellaire n'affectant pas la croissance cellulaire chez la forme procyclique.

Trois lignées ayant intégré le plasmide pZJM (contenant le gène d'intérêt) ont été étudiées : Les lignées pZJM-TbAGO1 a, b et c ; pZJM-TbPW11 a, b et c et pZJM-RBN a, b et c



D'autre part, nous n'avons pas pu étudier d'implication directe dans l'ARNi, car la lignée hôte nécessaire pour contrôler le pZJM (lignée 29-13 voir matériels et méthodes et annexe) répond difficilement à l'ARNdb en condition transitoire.

Nous avons également effectué des recherches au niveau des ARN hélicase et identifié de nombreux candidats dans le génome du trypanosome (>40). Cependant l'absence de signature caractéristique de l'ARNi de ces enzymes et l'abondance de ces hélicases ne nous a pas permis d'identifier des candidats spécifiques. D'autres recherches ont été effectuées pour trouver la RdRP, rde-4 et FMRX mais se sont avérées sans succès.

La protéine Mdp2 co-exprimée avec la protéine Argonaute Mdp1 est lors du développement du macronoyau chez le cilié *Stylonychia lemnae* (Fetzer et al., 2002). Etant donné la contribution des protéines Argonaute et de mécanismes apparentés à l'ARNi dans ce processus chez un autre cilié *Tetrahymena* (Mochizuki et al., 2002). Nous avons suspecté que Mdp2 pouvait aussi participer à l'ARNi. Nous avons analysé deux homologues de la protéine Mdp2 retrouvés chez *T. brucei* (Gene DB : Tb04.29M18.690, Tb04.29M18.71). Les deux gènes *Mdp2* sont exprimés au stade procyclique (données non montrées) et sont de séquences quasiment identiques (>90% d'homologie globale). Nous avons donc ciblé conjointement ces deux homologues par ARNi à l'aide du vecteur pZJM. Après induction, l'analyse de trois clones pZJM-Mdp2 montre une réduction dramatique de la croissance dès 24h (**figure 28**). L'analyse au DAPI démontre que les lignées induites pZJM-Mdp2 ont de sérieux problèmes dans le cycle cellulaire (**figure 29**).

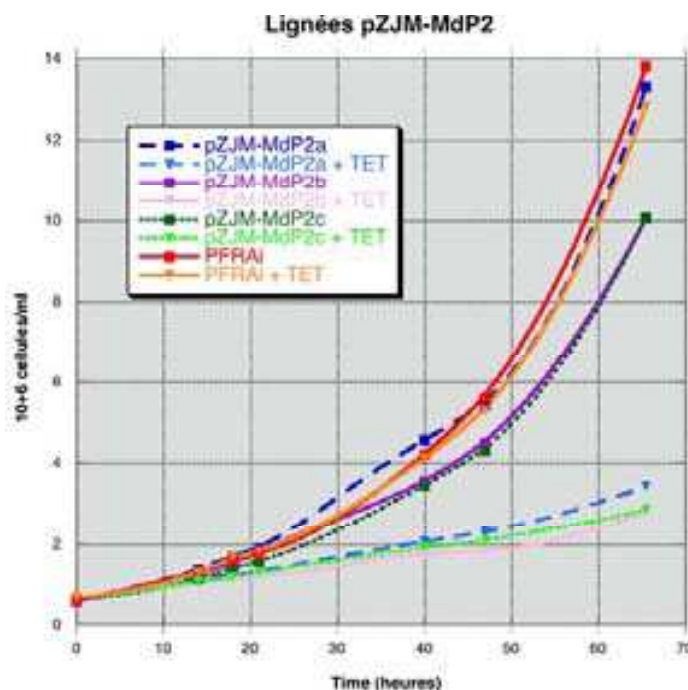


Figure 28

Analyse de la croissance des lignées pZJM-Mdp2 (a,b et c) induites et non induites à la tétracycline.

Les lignées sont induites avec 1µg/ml de tétracycline. La lignée pZJM-PFRA (*PFRAi*) est un contrôle où la croissance n'est pas affectée (Durand-Dubief et al. MBP 2003)

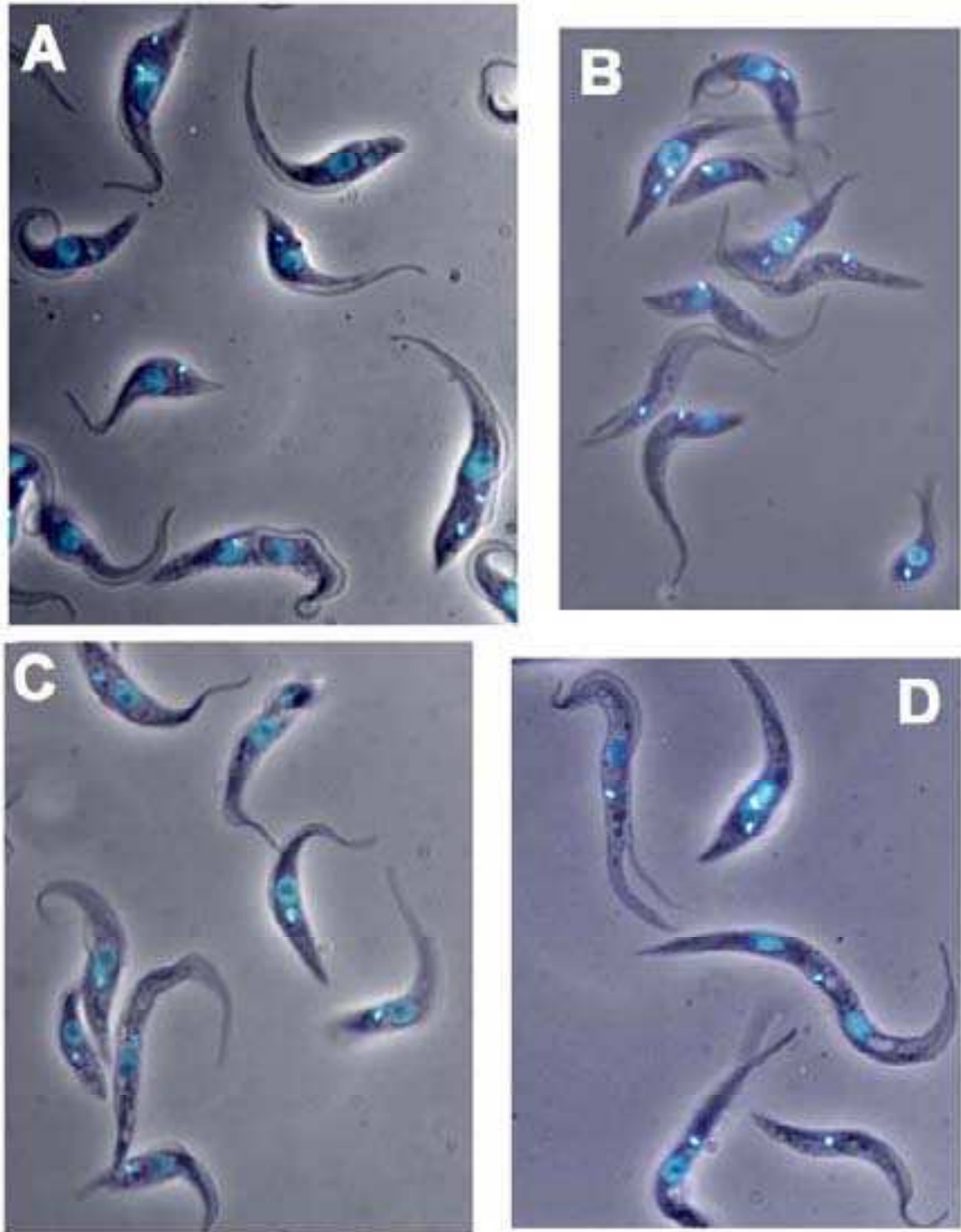


Figure 29

Phénotype observé après extinction de *Mdp2*

A/ Lignée contrôle *PFRAi* exprimant l'ARNdb de *PFRA* **B/** Lignée *pZJM-Mdp2a* **C/** Lignée *pZJM-Mdp2b* **D/** Lignée *pZJM-Mdp2c*. Les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde 4% et colorées au DAPI (bleu). Les images en contraste de phase et en fluorescence ont été superposées.

Résultats

3^{ème} partie :

L'ARNi et la mitose

II.C L'ARNi et la mitose

II.C.1. La protéine Argonaute est impliquée dans la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes

II.C.1.a Résumé de l'article

La machinerie ARNi est un complexe ribonucléoprotéique composé de plusieurs protéines incluant notamment un membre de la famille Argonaute.

Nous avons identifié deux gènes de la famille Argonaute *TbAGO1* et *TbPW11* chez *Trypanosoma brucei*.

Par ARNi transitoire, nous avons montré que le gène *TbAGO1*, mais pas le gène *TbPW11*, était impliqué dans l'ARNi. La génération d'une lignée double knockout *TbAGO1*^{-/-} montre une résistance à l'ARNdb et démontre que *TbAGO1* est une protéine essentielle à l'ARNi. Les cellules *TbAGO1*^{-/-} sont viables, mais présentent un important ralentissement de leur croissance en culture. Le marquage à l'aide d'un anticorps anti-tubuline révèle une formation anormale du fuseau mitotique ainsi qu'une répartition anormale de l'ADN à la mitose. L'analyse des cellules mutantes par hybridation *in situ* (FISH) révèle des défauts significatifs de ségrégation des chromosomes. Par expression inductible d'une protéine recombinante GFP::*TbAGO1* dans la lignée *TbAGO1*^{-/-}, nous avons pu restaurer le phénotype sauvage pour l'ARNi et la croissance cellulaire démontrant la spécificité des résultats. La protéine recombinante GFP::*TbAGO1* révèle également une localisation majoritairement cytoplasmique avec un enrichissement périnucléaire lors de la mitose. Nous avons donc identifié une protéine nécessaire à l'ARNi et montré que ce mécanisme est impliqué dans la ségrégation des chromosomes.

Ces résultats évoquent le modèle proposé sur base du phénotype des mutants *Dicer/Ago* chez la levure *S. pombe*. Notre hypothèse de travail serait que la machinerie ARNi pourrait être impliquée dans la formation de l'hétérochromatine et dans l'association des chromosomes au fuseau mitotique.

II.C.1.b Article

Research article

Open Access

TbAGO1, an Argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*

Mickaël Durand-Dubief and Philippe Bastin*

Address: INSERM U565 & CNRS UMR8646, MNHN USM0503, Muséum National d'Histoire Naturelle, 43 rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05, France

Email: Mickaël Durand-Dubief - duranddu@mnhn.fr; Philippe Bastin* - pbastin@mnhn.fr

* Corresponding author

Published: 12 December 2003

Received: 03 October 2003

BMC Biology 2003, 1:2

Accepted: 12 December 2003

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/1/2>

© 2003 Durand-Dubief and Bastin; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article: verbatim copying and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original URL.

Abstract

Background: RNA silencing processes are widespread in almost all eukaryotic organisms. They have various functions including genome protection, and the control of gene expression, development and heterochromatin formation. RNA interference (RNAi) is the post-transcriptional destruction of RNA, which is mediated by a ribonucleoprotein complex that contains, among several components, RNA helicases and Argonaute proteins. RNAi is functional in trypanosomes, protozoan parasites that separated very early from the main eukaryotic lineage and exhibit several intriguing features in terms of the control of gene expression. In this report, we investigated the functions of RNAi in *Trypanosoma brucei*.

Results: By searching through genome databases, novel Argonaute-like proteins were identified in several protozoa that belong to the kinetoplastid order, a group of organisms that diverged early from the main eukaryotic lineage. *T. brucei* possesses two Argonaute-like genes termed *TbAGO1* and *TbPW11*. Dual transient transfection assays suggest that *TbAGO1*, but not *TbPW11*, is involved in RNAi. The entire coding region of *TbAGO1* was deleted by double gene knockout. *TbAGO1*^{-/-} cells turned out to be completely resistant to RNAi generated either by transfected double-stranded RNA or by expression of an inverted repeat. *TbAGO1*^{-/-} cells were viable but showed a dramatically reduced growth rate. This was probably due to defects in mitosis and abnormal chromosome segregation as revealed by *in situ* analysis. The RNAi and growth phenotypes were complemented by the inducible expression of a GFP::TbAGO1 fusion protein that revealed the cytoplasmic location of the protein.

Conclusions: The requirement of *TbAGO1* for RNAi in trypanosomes demonstrates the evolutionary ancient involvement of Argonaute proteins in RNAi silencing processes. RNAi-deficient *TbAGO1*^{-/-} cells showed numerous defects in chromosome segregation and mitotic spindle assembly. We propose a working hypothesis in which RNAi would be involved in heterochromatin formation at the centromere and therefore in chromosome segregation.

Background

RNA silencing includes a wide range of post-transcrip-

tional phenomena in eukaryotes, such as post-transcriptional gene silencing in plants [1], quelling in fungi [2],

homology-dependent gene silencing in ciliates [3] and RNA interference (RNAi) in animals [4]. The latter is a process in which the presence of double-stranded RNA (dsRNA) of a given sequence induces the rapid, efficient and specific degradation of the mRNA with the corresponding sequence. In most cases, long dsRNA is fragmented into 21 – 26 bp dsRNAs, termed short interfering RNAs (siRNAs) [5], by the action of Dicer, a type III ribonuclease [6]. These siRNAs are part of an enzymatic complex that scan RNA and target those with the identical sequence to that of the siRNAs for destruction. Other types of proteins involved in RNAi include RNA helicases, Argonaute proteins, and, in some species, RNA-dependent RNA polymerases [7]. Mechanistic aspects of RNA silencing are remarkably well conserved among organisms as diverse as protists, fungi, plants and animals, indicating that it has important functions. One such function appears to be the protection of the genome from unwanted nucleic acids, such as those expressed by viruses in plants [8,9], or those originating from transposons [10,11]. Additional functions have been unveiled, such as the control of gene expression during development [12], genome rearrangement in ciliates [13,14] and the formation of heterochromatin and control of gene expression in plants and fission yeast [15-17].

Trypanosomes are protozoan parasites belonging to the order Kinetoplastida, which diverged very early from the main eukaryotic lineage. These unicellular organisms are responsible for several tropical diseases including sleeping sickness in central Africa, which is caused by the species *Trypanosoma brucei*. This species is found alternately in the digestive tract of an insect vector, the tsetse fly, and the bloodstream of a mammalian host. It adapts to these different environments by activating specific programs of differentiation [18]. Trypanosomes develop as extracellular parasites and escape the host immune response by means of a sophisticated process of antigenic variation. Their surface is entirely covered by a dense coat composed of a single type of molecule, the variant surface glycoprotein (VSG). Trypanosomes possess several hundreds of VSG genes scattered throughout their genome but these can only be expressed from one of ~20 expression sites, with only a single site being active at one time [19].

Trypanosomes were among the first organisms in which RNAi was identified. RNAi was detected in mutants expressing dsRNA of genes coding for the paraflagellar rod A protein (PFRA) [20] and for tubulin [21]. RNAi was rapidly exploited as a powerful tool for the study of gene function [22-26]. As in other organisms, long dsRNAs are degraded into siRNAs and incorporated into a ribonucleoprotein complex [27]. About 10 – 20 % of siRNAs are associated with translating polyribosomes, suggesting a possible interaction between RNAi and the translation

machinery [28]. Cloning and sequencing of trypanosome siRNA has revealed a large number of endogenous short RNAs corresponding to the INGI and SLACS retroposon elements, suggesting that one function of RNAi could be the control of mobile genetic elements [27]. Interestingly, such mobile elements are missing from the genome of the related parasite *Leishmania*, where RNAi does not seem to be functional [29].

To evaluate the role of RNAi in the control of gene expression and in the general biology of trypanosomes, we searched for molecular components of the RNAi machinery and investigated their function. We identified two Argonaute proteins, TbAGO1 and TbPWI1 and demonstrate that the first is essential for RNAi. Moreover, we show that cells deprived of TbAGO1 display numerous defects in chromosome segregation and mitotic spindle assembly. Finally, we propose a working model to explain the observed results.

Results

Identification of new Argonaute proteins

In order to investigate RNAi functions in trypanosomes, we first searched candidate genes potentially involved in this mechanism. We screened various protist genome databases with the sequence of genes known to be involved in RNAi in other organisms. The genomes analysed were from *T. brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania major* (all belonging to the order Kinetoplastida), from *Giardia lamblia* and from *Plasmodium falciparum*. Two distinct Argonaute-like proteins, TbAGO1 and TbPWI1, were identified in *T. brucei* whereas single proteins were found in *G. lamblia* (GLAGO1), *T. cruzi* (TcPWI1) and *L. major* (LmPWI1). Searches through the complete genome sequence of *P. falciparum* failed to identify any Argonaute-like genes. These proteins were examined for the presence of motifs and aligned with other members of the Argonaute protein family from several eukaryotic species (Fig. 1A). TbAGO1 is a protein of 892 amino acids, with a calculated molecular weight of 98015 Da and with an estimated pI of 9.18. It possesses a PAZ and a Piwi domain, typical signatures of Argonaute proteins [30]. The Piwi domain shows 20 – 31 % homology with Piwi domains of Argonaute proteins from other species (see Additional file: 1), whereas the PAZ domain shows weaker conservation. In addition, TbAGO1 contains an amino-terminal RGG box (a nucleic acid-binding domain), with 10 copies of the arginine-glycine-glycine motif. This feature has not been observed previously in Argonaute proteins from other species. However, detailed analysis of the polyglutamine (poly-Q) box present at the amino-terminal end of the *Arabidopsis thaliana* AGO1 protein revealed the presence of five copies of the RGG motif (Fig. 1B).

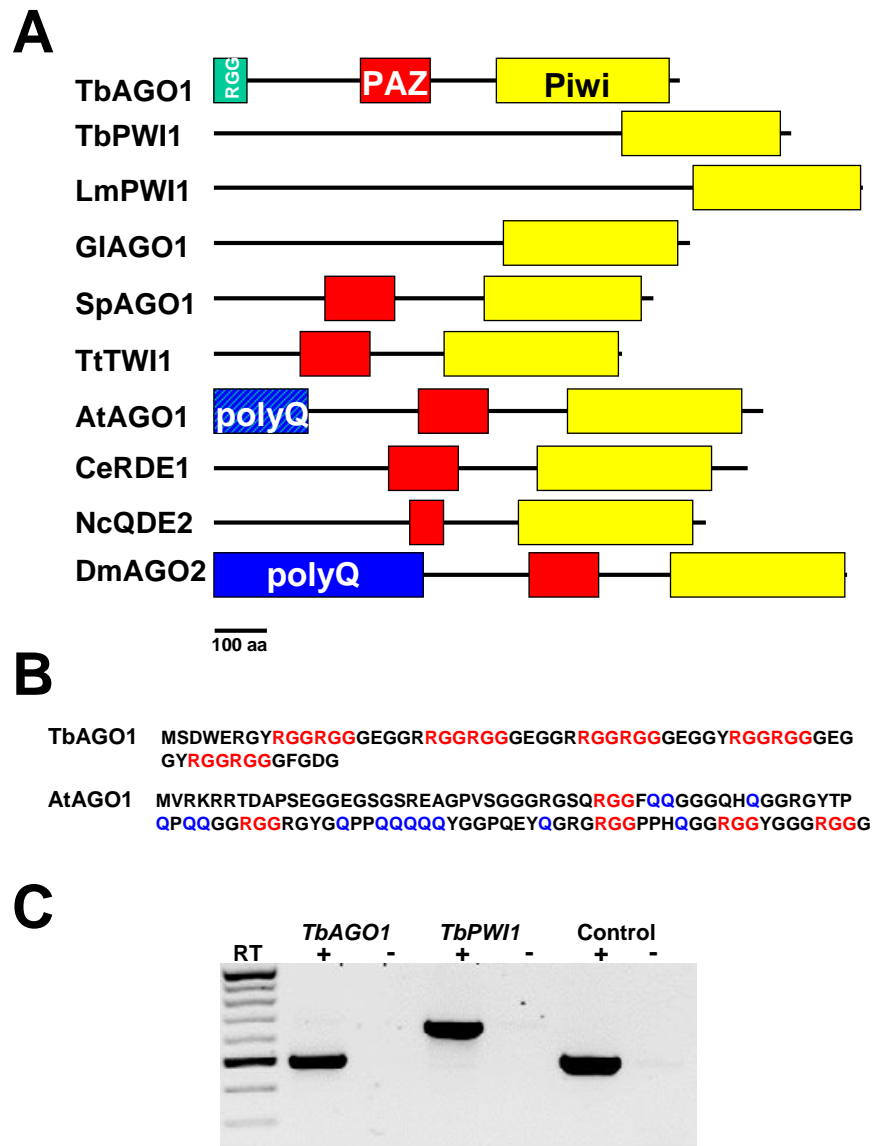


Figure 1

Argonaute-like proteins in protists. **A.** Schematic representation of Argonaute-like proteins. TbAGO1, *Trypanosoma brucei* AGO1 (accession number AY433802); TbPWI1, *Trypanosoma brucei* PWI1 (AY433803); LmPWI1, *Leishmania major* AGO1 (AL446005); GIAGO1, *Giardia intestinalis* AGO1 (AY142143); SpAGO1 *Schizosaccharomyces pombe* AGO1 (CAA19275); TtTWI1 *Tetrahymena thermophila* TWI1 (AB084111); AtAGO1, *Arabidopsis thaliana* AGO1 (U91995), CeRDE1, *Caenorhabditis elegans* RDE1 (AF180730); NcQDE2, *Neurospora crassa* QDE2 (AF217760); DmAGO2, *Drosophila melanogaster* AGO2 (NMI68626). The red and yellow boxes indicate PAZ and Piwi domains respectively. The TbAGO1 RGG box is shown in green, the DmAGO2 poly-Q box is shown in blue and the N-terminal extension of AtAGO1 is annotated as a poly-Q box but also containing RGG motifs and is shown in blue and green. **B.** Amino-terminal extensions of TbAGO1 and AtAGO1 contain RGG boxes. The RGG motifs are shown in red and the poly-Q box in blue. **C.** *TbAGO1* and *TbPWI1* RNA are expressed in the culture-adapted procyclic stage of *T. brucei*. Total RNA extracted from wild-type trypanosomes was incubated with (+) or without (-) reverse transcriptase and PCR-amplified using specific primers for the indicated genes.

TbPWI1 and LmPWI1 contain a typical Piwi domain, but no PAZ domain could be recognised. Neither possesses an RGG box. These two proteins show high homology in their Piwi domain (55.4% identity), with a specific insertion that is not found in Argonaute proteins from other organisms (see supplementary data).

TbAGO1, but not TbPWI1, is required for RNAi

We explored whether TbAGO1 and TbPWI1 are involved in RNAi silencing in *T. brucei*. Since trypanosomes display different life cycle stages, each with a specific pattern of protein expression, we first checked whether *TbAGO1* and *TbPWI1* were expressed in the procyclic culture stage used for this study. Real time PCR analysis (Fig. 1C) showed that RNA for both *TbAGO1* and *TbPWI1* were expressed in this stage.

To evaluate the possible participation of TbAGO1 and TbPWI1 in RNAi in trypanosomes, we used a double transient transfection assay as developed in *Drosophila* [6,31]. Trypanosomes were first transfected with dsRNA targeting RNA coding for proteins potentially involved in RNAi and returned to culture for 10 h. To evaluate the consequences of silencing the candidate protein on the behaviour of the RNAi machinery, a second dsRNA targeting a marker gene was introduced. We selected the *PFRA* gene as a marker: this gene codes for an abundant flagellar protein that is essential for cell motility [20]. Loss of *PFRA* via RNAi produces a viable and obvious paralysis phenotype that can easily be monitored by immunofluorescence [22,32]. Candidate genes included *TbAGO1* and *TbPWI1*, as well as *green fluorescent protein (GFP)* as a control. Transfection of *GFP* dsRNA did not modify the ability of *PFRA* dsRNA to subsequently silence *PFRA* expression, producing the usual number of paralysed trypanosomes (Fig. 2A). In contrast, the introduction of *TbAGO1* dsRNA led to a five-fold reduction in the efficiency of RNAi generated by *PFRA* dsRNA. Electroporation of *TbPWI1* dsRNA led to normal *PFRA* silencing (Fig. 2A). These results were reproduced six times, including with two different markers (tubulin and flagellum adhesion glycoprotein-1 [FLA1]). These data suggest that TbAGO1, but not TbPWI1, is involved in RNAi.

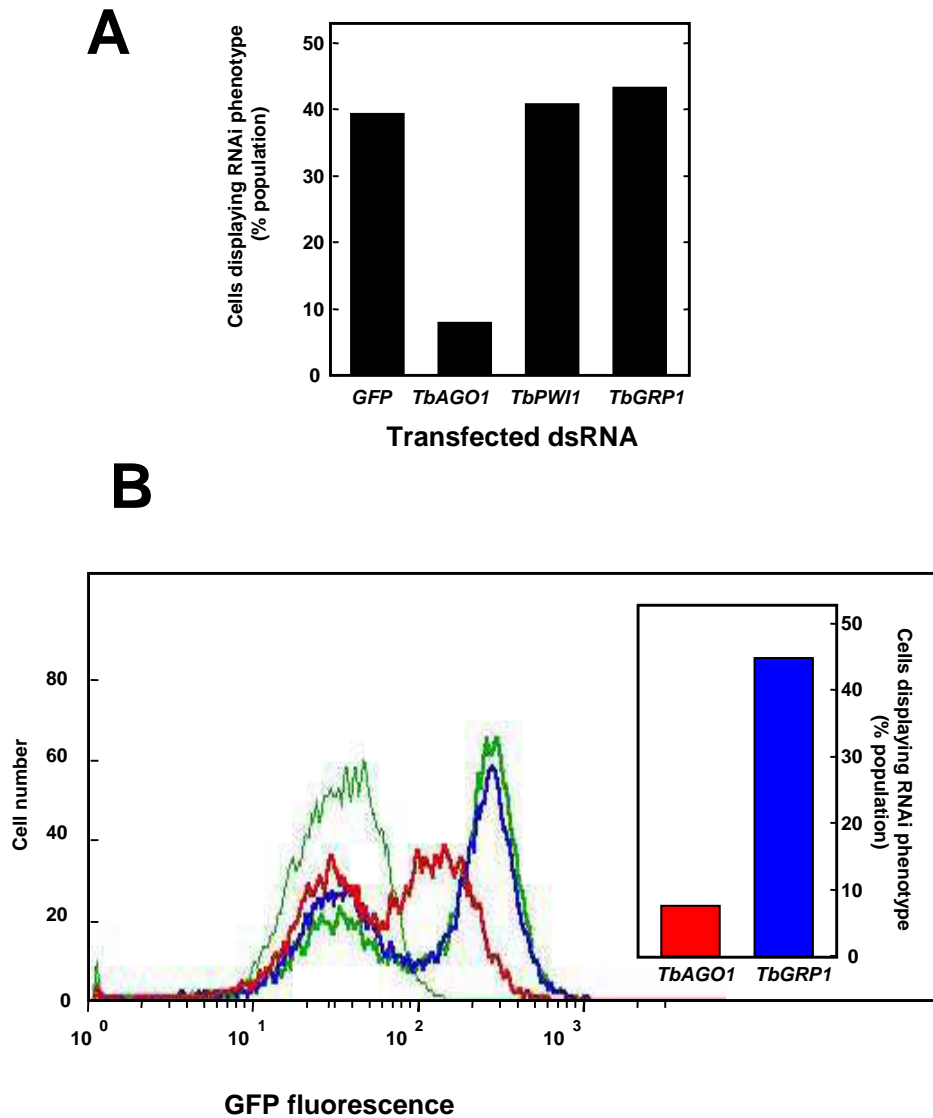
To confirm that the observed reduction in RNAi silencing activity was due to the knockdown of TbAGO1 RNA and protein, we generated a cell line expressing TbAGO1 fused to GFP under the control of a tetracycline-inducible promoter (Fig. 3A). We fused the *GFP* gene upstream of *TbAGO1* as downstream fusions have turned out to be non-functional in other organisms [33]. This construct allows monitoring of the TbAGO1 silencing effect by visualisation of the GFP::TbAGO1 fluorescent protein. The cell line expressing the GFP::TbAGO1 protein was transfected with *TbAGO1* dsRNA or with dsRNA from the unre-

lated *TbGRP1* gene as control. *GFP* dsRNA could not be used as a control in this experiment as the *GFP* gene was fused to *TbAGO1*. Cells were returned to culture for 10 h and then transfected with *PFRA* dsRNA. FACS analysis revealed a ~10-fold reduction of GFP::TbAGO1 fluorescence after introduction of *TbAGO1* dsRNA, confirming that *TbAGO1* is at least partially silenced during the assay (Fig. 2B). In these conditions, *PFRA* silencing was strongly diminished (Fig. 2B, inset), reproducing the results obtained with wild type (WT) cells (Fig. 2A). In contrast, cells electroporated with the control *TbGRP1* dsRNA did not show any reduction in their GFP::TbAGO1 fluorescence signal compared with untransfected controls, and subsequent introduction of *PFRA* dsRNA produced the usual *PFRA* silencing effect (Fig. 2B). These data indicate that the observed inhibition of RNAi silencing was indeed due to the reduction in TbAGO1 abundance.

Since RNAi effects rarely last more two generations under these conditions, the transient nature of this type of experiment, and the difficulty of using RNAi silencing to study RNAi processes restricted further investigation. Having demonstrated the importance of *TbAGO1* for RNAi, we decided to delete *TbAGO1* by double gene knockout.

Deletion of TbAGO1 completely inhibits RNAi

Data from the *T. brucei* genome sequencing project, as well as our Southern blotting analysis (data not shown) showed that *TbAGO1* is a single copy gene. As trypanosomes are diploid organisms, we produced two separate constructs for targeted gene replacement of the whole coding sequence of *TbAGO1* by the drug resistance markers blasticidin S deaminase (BSD) and neomycin phosphotransferase (NEO) (Fig. 3A). The first allele of *TbAGO1* was replaced by the BSD marker before the obtained cell line was transfected with the NEO construct to replace the second allele. Viable double-resistant cells were obtained and further characterised. Southern blotting (Fig. 3B) and PCR analysis (data not shown) of genomic DNA from the double-resistant cells confirmed that both constructs had integrated at the expected locus and that all endogenous copies of *TbAGO1* had been deleted. The cell line was subcloned and termed *TbAGO1*^{-/-}. *TbAGO1*^{-/-} cells were further transfected with plasmid pGFPTbAGO1430 for expression of the fusion protein GFP::TbAGO1 in order to attempt functional complementation experiments (Fig. 3A). As the *GFP::TbAGO1* fusion gene in this plasmid is expressed via a tetracycline-inducible promoter, we further transformed these cells with plasmid pHD360 [34] that expresses the tet-repressor, allowing tetracycline-inducible control of expression of GFP::TbAGO1. The cell line was named *TbAGO1*^{-/+GFP::TbAGO1^{Ti}. Northern blotting analysis confirmed that the *GFP::TbAGO1* RNA was expressed in the presence of tetracycline (Fig. 3C). Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis}

**Figure 2**

TbAGO1 is required for RNAi in transient transfection assays. **A.** Wild-type trypanosomes were first electroporated with dsRNA corresponding to the indicated genes, returned to culture for 10 h and then transfected with *PFRA* dsRNA. Samples were fixed 15 h later and cells exhibiting *PFRA* silencing were identified by immunofluorescence using an anti-*PFRA* specific monoclonal antibody. The experiment was repeated six times, yielding similar results. **B.** FACS analysis of trypanosomes transformed with plasmid pGFPTbAGO1430 grown in the absence (non-induced; thin green line) or in the presence of tetracycline (induced; thick lines). Induced cells were not transfected (thick green line) or transfected with *TbAGO1* dsRNA (thick red line) or with *TbGRP1* dsRNA as negative control (thick blue line). GFP::TbAGO1 protein levels were monitored by FACS analysis. Only *TbAGO1* dsRNA was able to reduce GFP::TbAGO1 fluorescent protein levels (notice shift of thick red line compared to blue or green thick lines). Cells were transfected with the *PFRA* dsRNA 10 h later and *PFRA* silencing was monitored as above (inset). This experiment was carried out twice and yielded similar results.

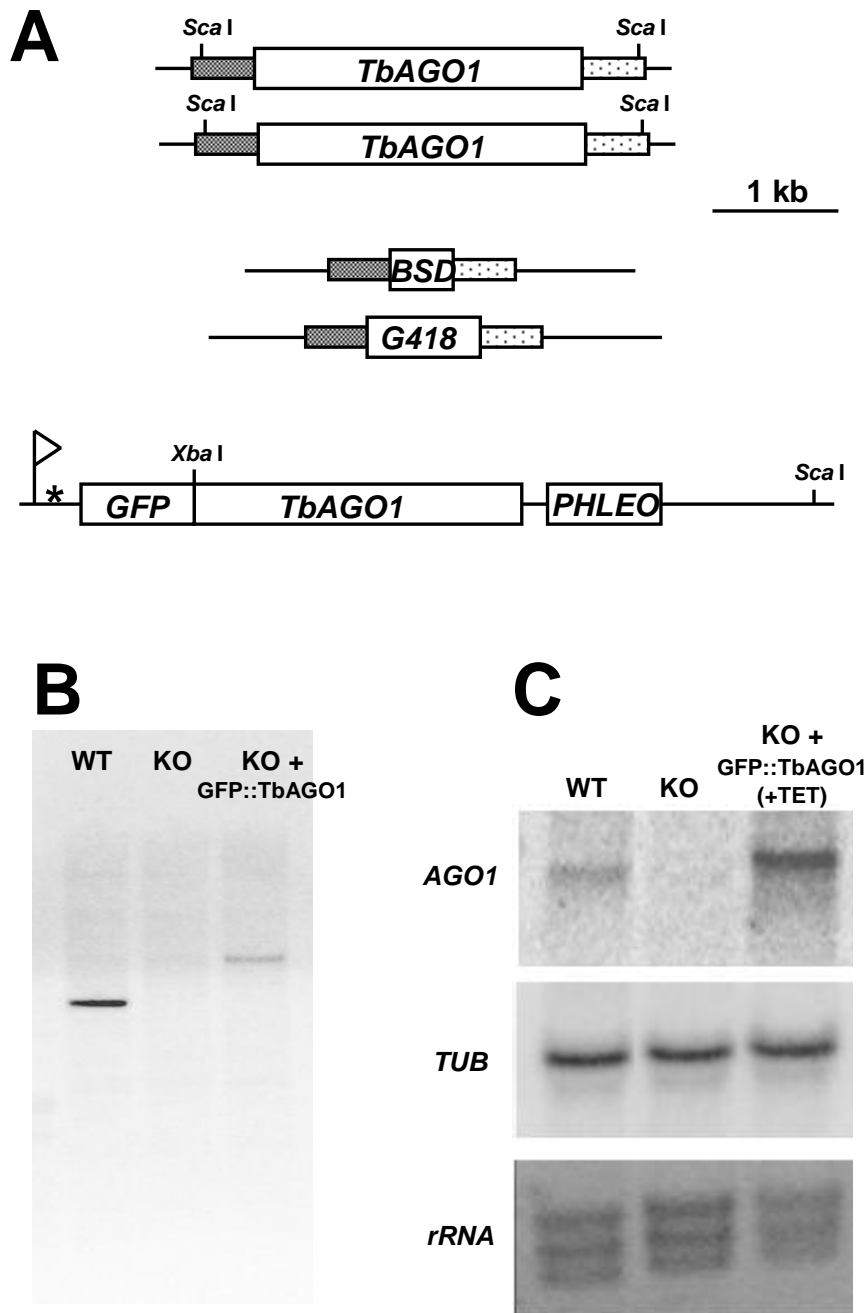


Figure 3

Generation of *TbAGO1*^{-/-} (KO) and *TbAGO1*^{-/-} +GFP::*TbAGO1*^{Ti} cell lines. **A.** Schematic representation of the endogenous *TbAGO1* locus (top), and of the constructs used for double *TbAGO1* knock-out (middle) and for expression of GFP::TbAGO1 fusion protein (bottom). Large and small boxes represent protein coding sequences and *TbAGO1* flanking regions used for the knockout construct. The tetracycline-inducible EP promoter of the pGFP::TbAGO1430 vector is indicated by a star. **B.** Southern blot analysis showing the absence of *TbAGO1* from the *TbAGO1*^{-/-} (KO) cell line. Genomic DNA was purified from the indicated cell lines, digested with *Sca*I and *Xba*I, and fragments were separated and transferred on a nylon membrane for hybridisation with a *TbAGO1* probe. **C.** Northern blot analysis. Total RNA (10 µg) from the indicated cell lines was run on a gel and transferred onto a nylon membrane for hybridisation with a *TbAGO1* probe (top panel) or with an α -*tubulin* probe (central panel). The bottom panel shows ethidium bromide staining of the membrane after transfer.

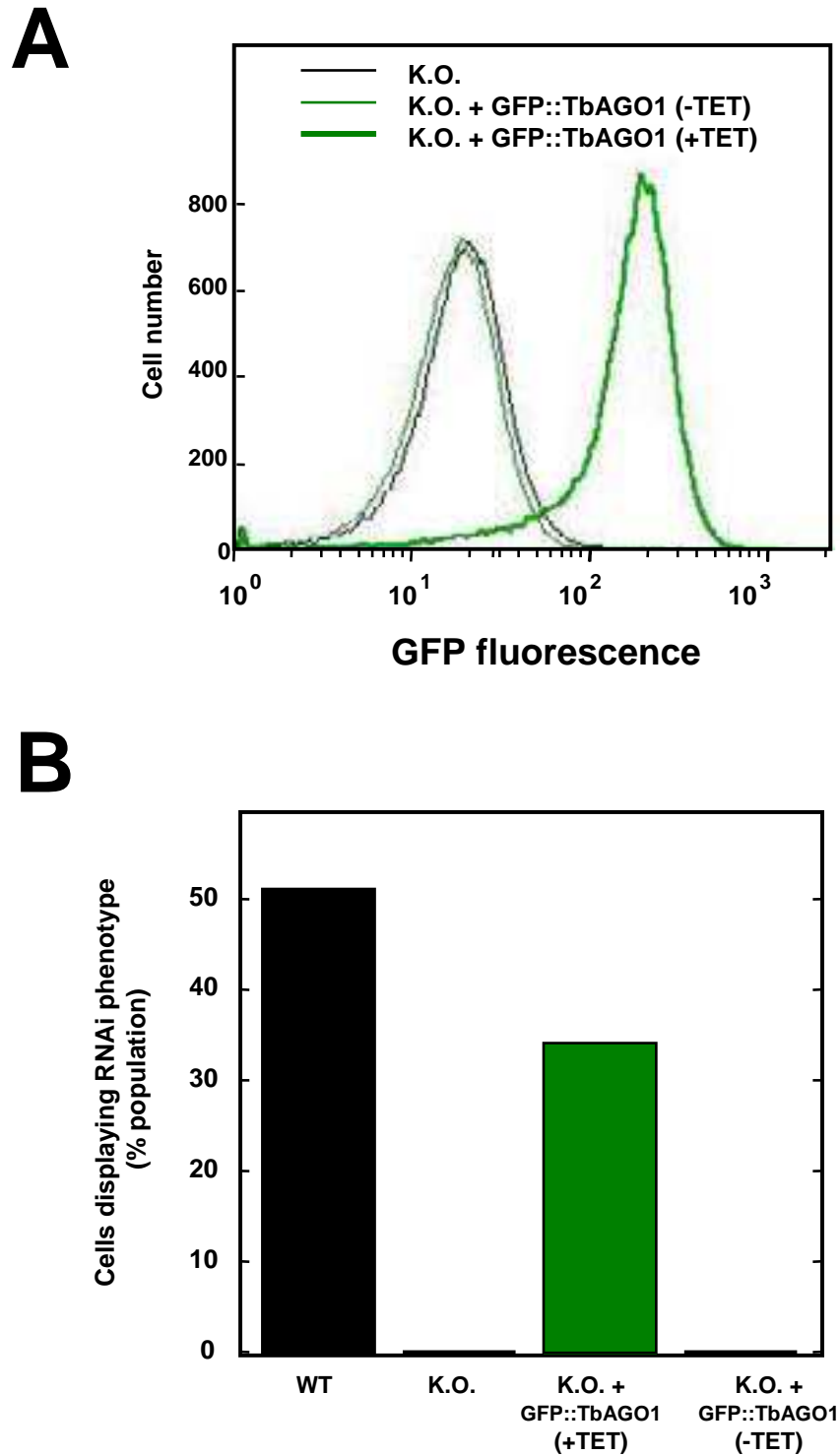


Figure 4

TbAGO1^{-/-} cells are resistant to RNAi. **A.** FACS profile of *TbAGO1*^{-/-} (K.O.), or of *TbAGO1*^{-/-} +GFP::*TbAGO1*^{Ti} cells grown in the absence (-TET, non-induced, thin green lines) or in the presence of tetracycline (+TET, induced, thick green lines). **B.** The indicated cell lines were transfected with *PFRA* dsRNA and returned to culture for 15 h before fixation and monitoring of the RNAi phenotype by immunofluorescence.

demonstrated that the GFP::TbAGO1 protein was only expressed in the presence of tetracycline (Fig. 4A).

To determine the involvement of TbAGO1 in RNAi, WT, *TbAGO1*^{-/-} and *TbAGO1*^{-/+GFP::TbAGO1^{Ti} cells grown either in the presence or absence of tetracycline were transfected with *PFRA* dsRNA (Fig. 4B) or with *tubulin* dsRNA (data not shown). Immunofluorescence analysis with a *PFRA*-specific antibody failed to detect a single cell with reduced *PFRA* abundance. Therefore, RNAi silencing was completely abolished in the knockout cell line, demonstrating that TbAGO1 was essential for RNAi. A similar result was observed in the *TbAGO1*^{-/+GFP::TbAGO1^{Ti} cell line as long as the fusion protein was not expressed. In contrast, expression of GFP::TbAGO1 was sufficient to restore *PFRA* silencing (Fig. 4B), therefore complementing the phenotype and confirming that TbAGO1 is required for RNAi in trypanosomes. Similarly, when *TbAGO1*^{-/-} cells were transfected with plasmid pα*PFRA*430, expressing a *PFRA* dsRNA as a hairpin [22], no *PFRA* silencing at all could be observed (data not shown). These data demonstrate that TbAGO1 is required for RNAi generated both by endogenously-expressed hairpin dsRNA and by exogenously dsRNA synthesised *in vitro*.}}

RNAi-deficient trypanosomes show mitotic defects

Although *TbAGO1*^{-/-} cells were viable, they showed reduced growth rate and morphological defects. The doubling time of the knockout cell line was ~15 h as opposed to 8–9 h for WT or complemented cells (Fig. 5A). In an effort to understand the reduced growth rate of mutant cells, we monitored their cell biological behaviour. During the cell cycle, trypanosomes need to replicate two single unit genomes: the nuclear and the mitochondrial genomes [35]. Trypanosomes possess a single mitochondrion, the kinetoplast, which contains a large DNA network that is visible under light microscopy. The kinetoplast duplicates first, followed by the nucleus, defining three cell cycle stages: cells with one kinetoplast and one nucleus (1K1N), cells with two kinetoplasts and one nucleus (2K1N) and cells with two kinetoplasts and two nuclei (2K2N) [35,36]. Cultures of *TbAGO1*^{-/-} cells showed normal proportions of these three sub-populations compared to WT or *TbAGO1*^{-/+GFP::TbAGO1^{Ti} cells grown in the presence of tetracycline (Fig. 5B), despite the presence of discrete modifications. However, *TbAGO1*^{-/-} cultures exhibited a >30-fold increase in the proportion of cells with one kinetoplast but with no nucleus, also called zooids [37,38], and a >20-fold increase in the proportion of cells with one kinetoplast but with two nuclei (Fig. 5B). These cell types are rare in normal, healthy cultures and are the consequences of a defect in nuclear mitosis. The classic nuclear mitosis / cytokinesis checkpoint is absent in trypanosomes, where cytokinesis is linked to kinetoplast duplication and segregation [38]. Therefore cells}

with delayed nuclear mitosis that have managed to duplicate and segregate their kinetoplasts can undergo cytokinesis to produce one daughter cell without a nucleus but with a kinetoplast and another daughter cell with a kinetoplast and one or two nuclei, if mitosis can be completed.

These results indicate potential mitosis defects in *TbAGO1*^{-/-} cells. We therefore examined the state of mitotic cells in cultures from WT, *TbAGO1*^{-/-} and *TbAGO1*^{-/+GFP::TbAGO1^{Ti} cells grown in the presence of tetracycline (Fig. 6). Trypanosomes were fixed and stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to visualise kinetoplast and nuclear DNA and with the anti-tubulin KMX-1 antibody to identify the mitotic spindle. In WT trypanosomes, mitotic cells are identified by the presence of a large nucleus and two well-separated kinetoplasts (2K1N cells). The mitotic spindle is easily recognisable, stretching in the direction of the long axis of the cells (Fig. 6, top panel). The vast majority of such 2K1N wild-type cells displayed a normal spindle (Table 1), as expected from previous observations [39]. In contrast, more than 20 % of the *TbAGO1*^{-/-} cells at the 2K1N stage did not possess a recognisable spindle at all, and of those with a spindle, almost half displayed various abnormalities (Fig. 6 and Table 1). In many cases, the spindle was not fully assembled and failed to show the typical elongation seen in WT trypanosomes. For example, the *TbAGO1*^{-/-} cell shown on the central panel of Fig. 6 is at the same stage of its cell cycle as its WT counterpart shown on the top panel, judging from the distance separating the two kinetoplasts. Intriguingly, in the knockout cell, the spindle was barely formed, being very short and with no recognisable spindle poles when compared with the WT cell in the top panel. Another frequent defect was the presence of a large bent spindle, showing a bundle of microtubules present on only one side of the nucleus (Fig. 6, bottom panel). In several cases, the DNA staining pattern of the mitotic nucleus also looked unusual. Instead of a large, relatively homogenous amount of DNA (trypanosome chromosomes do not condense at mitosis), patches of disperse intense staining were frequently observed (Fig. 6, central panel).}

The above data suggest significant mitotic defects in the *TbAGO1*^{-/-} cell line. To assess whether nuclear segregation was complete, we used the monoclonal antibody L1C6, which recognises an unknown antigen localised to the nucleolus (L. Kohl and K. Gull, unpublished observations). In trypanosomes, the nucleolus is not dispersed at mitosis, which is intranuclear, but it is segregated along the mitotic spindle. In non-mitotic WT cells, this antibody stained the nucleolus, producing one bright spot per nucleus (data not shown). During early anaphase, the signal looked like a bright bar (Fig. 7A, left), corresponding to the nucleolus that is being segregated, since the

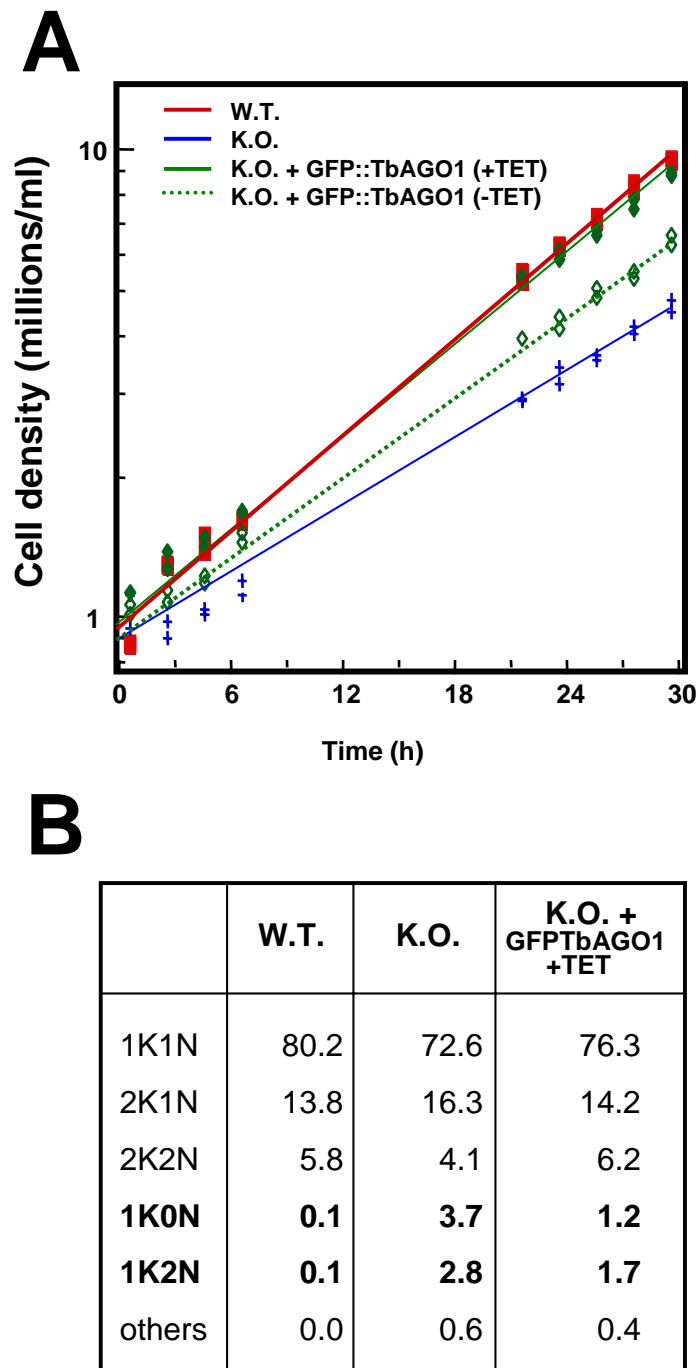
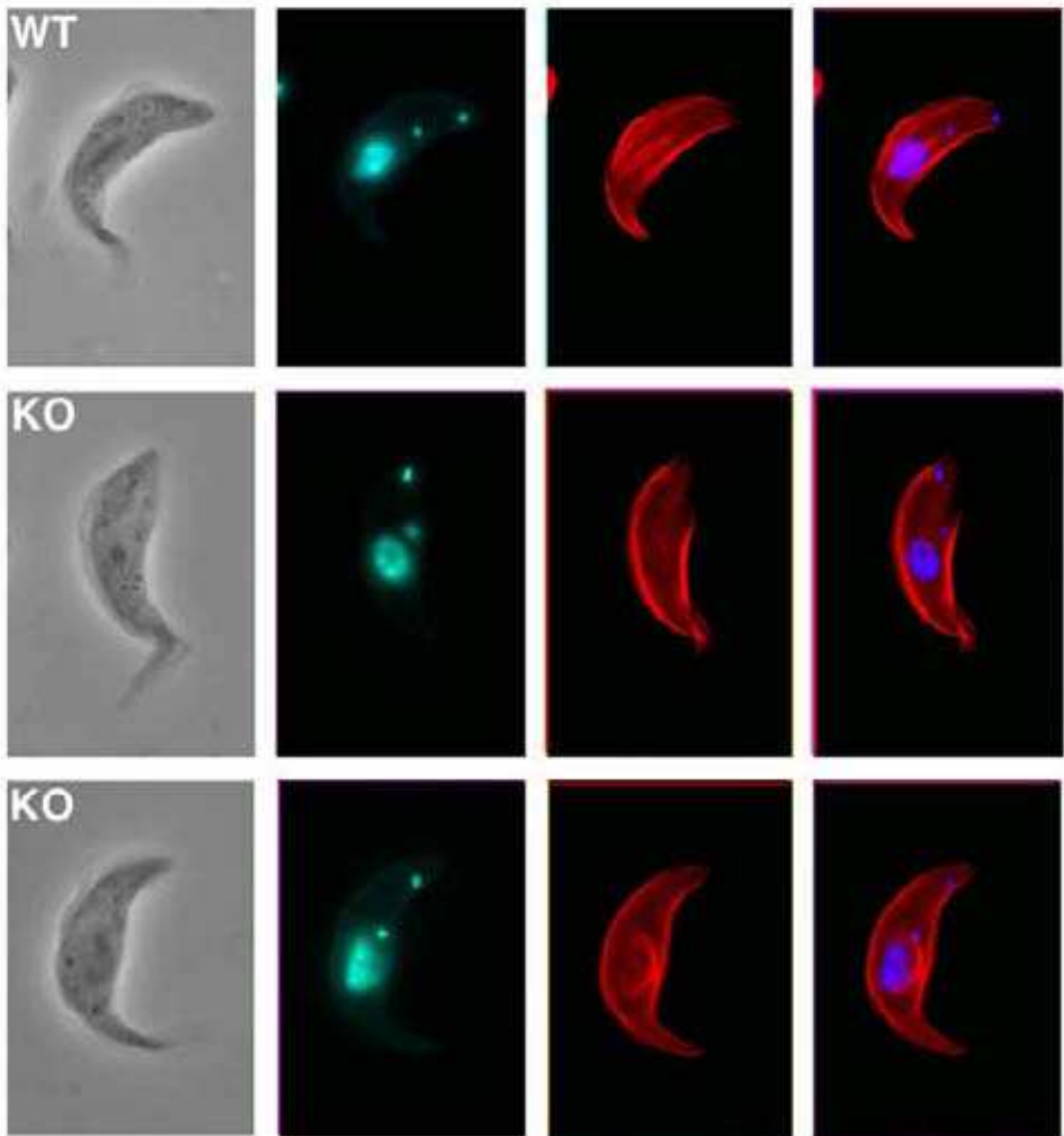


Figure 5

TbAGO1^{-/-} cells show delayed growth rate and abnormal cell types. **A.** Growth curve of wild type (W.T., red squares), *TbAGO1*^{-/-} (K.O., blue crosses), or of *TbAGO1*^{-/-} +GFP::*TbAGO1*^{Ti} cells grown in the absence (-TET, non-induced, open diamonds and dotted green line) or in the presence of tetracycline (+TET, induced, closed diamonds and full green line). **B.** Analysis of cell types within populations of wild-type (W.T.), *TbAGO1*^{-/-} (K.O.), or of *TbAGO1*^{-/-} +GFP::*TbAGO1*^{Ti} cells grown in the presence of tetracycline (K.O.+GFP::*TbAGO1*+TET). 1K1N, cells with one kinetoplast and one nucleus; 2K1N, cells with two kinetoplasts and one nucleus; 2K2N, cells with two kinetoplasts and two nuclei; 1K0N, cells with one kinetoplast but without nucleus (zoids) and 1K2N, cells with one kinetoplast and two nuclei. More than 1 000 cells were counted per experiment.

**Figure 6**

Spindle formation is frequently aberrant in *TbAGO1*^{-/-} cells. Trypanosomes were stained with the anti-tubulin KMX-1 monoclonal antibody and counterstained with DAPI to show nuclear and mitochondrial DNA. Mitotic cells from wild type (WT, top panels) or *TbAGO1*^{-/-} (KO, central and bottom panels). From left to right, phase contrast image, DAPI staining (blue), tubulin staining (red) and merged DAPI and tubulin staining. The typical elongated mitotic spindle found in wild-type trypanosomes is frequently poorly developed (central panels) or completely bent on one side of the nucleus (bottom panels) in *TbAGO1*^{-/-} cells.

Table 1: Proportion of various aberrant cell types.

	Mitotic cells without spindle ¹ (%)	Abnormal spindles ² (%)	Unequal distribution of nucleolar marker ³ (%)
W.T.	3.2	0.0	8.2
K.O.	21.0	43.9	33.0
K.O. + GFP::TbAGO1	13.6	16.7	18.0

¹2K1N cells were scored for the presence or the absence of a recognisable mitotic spindle after KMX-1 staining, n > 118. ²In cells with recognisable spindle, n > 118 ³Binucleated cells were scored, n > 100

nucleolus and nuclear membrane remain present throughout the trypanosome cell cycle. At telophase, both nuclei contained a well-defined nucleolus, recognisable as a bright spot (Fig. 7A, centre and right). Observation of binucleated cells of the *TbAGO1*^{-/-} mutant revealed that one third of them displayed unequal distribution of the L1C6 nucleolar marker, suggesting that nuclei did not inherit the same amount of nucleolar material (Table 1 and Fig. 7B). In some cells, spots of staining appeared in the cytoplasm between the two nuclei, suggesting delayed or lost material (Fig. 7B, central panels). In addition, DAPI staining showed that the two nuclei often had different morphologies (Fig. 7B, right panels).

Further observations of DAPI staining in binucleated cells from the *TbAGO1*^{-/-} mutant revealed the presence of lagging DNA material during mitosis (Fig. 7B and data not shown). These data suggest possible difficulties in chromosome segregation, a defect previously reported in yeast RNAi mutants [40,41]. To evaluate this possibility, we performed fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), using a probe recognising the tandem repeats of 5S ribosomal DNA, to visualise chromosome I at mitosis [42]. In WT trypanosomes, two spots could be identified in G1 cells (Fig. 8A). Progression through mitosis can be monitored by DAPI staining using both nuclear and mitochondrial genomes as markers [35]. In early (Fig. 8B) and late (Fig. 8C) anaphase, WT cells showed four spots migrating towards the spindle poles, reproducing published findings [42]. In contrast, this pattern was frequently modified in *TbAGO1*^{-/-} mitotic cells (Fig. 8D,8E,8F). Judging from the distance separating the two kinetoplasts, the *TbAGO1*^{-/-} cell shown in Fig. 8D is at the same stage of the cell cycle as its WT counterpart presented in Fig. 8B. However, chromosome I segregation appeared to be delayed, with all the chromosomes found in the centre of the mitotic spindle. This defect was the most frequent in *TbAGO1*^{-/-} mitotic cells. In other cases, unequal chromosome segregation was observed, with three chromosomes migrating towards one pole of the spindle and only one towards the opposite pole (Fig. 8E). In more remarkable cases, DAPI staining revealed the presence of several DNA entities containing variable numbers of chromosome I (Fig. 8F).

These data strongly suggest that, in addition to spindle formation defects and to nucleolar segregation defects, chromosome segregation is also affected in the absence of TbAGO1. Taken together, these data indicate that the growth delay measured in the *TbAGO1*^{-/-} mutant is very likely to be due to a mitotic defect and suggest a possible involvement of the RNAi machinery in this process.

Finally, as the GFP::TbAGO1 fusion protein is functional as it is able to complement the double mutant, it can be used as a tool to determine TbAGO1 localisation. Direct observation of live *TbAGO1*^{-/-}+GFP::TbAGO1^{Ti} cells grown in the presence of tetracycline without any fixative under the microscope revealed that the GFP::TbAGO1 fusion protein was mostly cytoplasmic (Fig. 9). However, some redistribution seemed to occur at mitosis, when the protein was concentrated around the nucleus and it was spread between the two nuclei at the end of mitosis. A similar distribution was observed at different levels of induction, irrespective of the amount of GFP::TbAGO1 fusion protein present.

Discussion

Identification of novel Argonaute proteins

Searches through protist genome databases identified four novel Argonaute protein members: TbAGO1 and TbPWI1 in *T. brucei*, TcPWI1 in *T. cruzi*, LmPWI1 in *L. major* and GLAGO1 in *G. lamblia*. These protists belong to the orders Kinetoplastida and Diplomononida, which diverged very early from the main eukaryotic lineage, revealing the ancient origin of the Argonaute proteins. Since genome sequencing of these organisms has not yet been completed, other members of the Argonaute family may be uncovered. We could not identify any Argonaute protein in the database of *P. falciparum* or in other *Plasmodium* species, although genome sequencing is complete. *Plasmodium* is a parasite that belongs to the apicomplexan group that appeared later than kinetoplastids in evolution. It is possible that Argonaute proteins have been lost in this group, as they have in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [43]. Alternatively, they could have diverged too much to be recognised by conventional

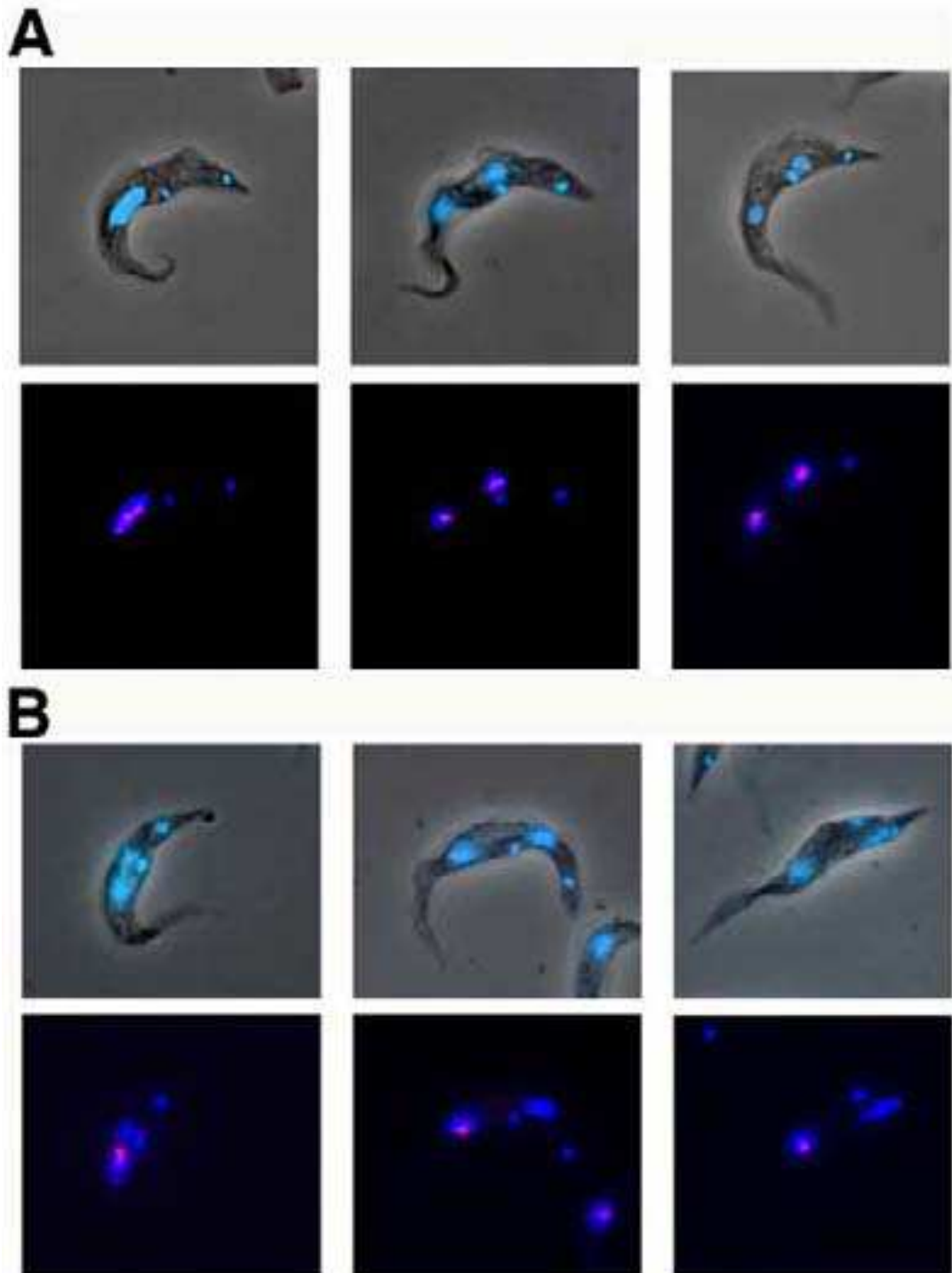
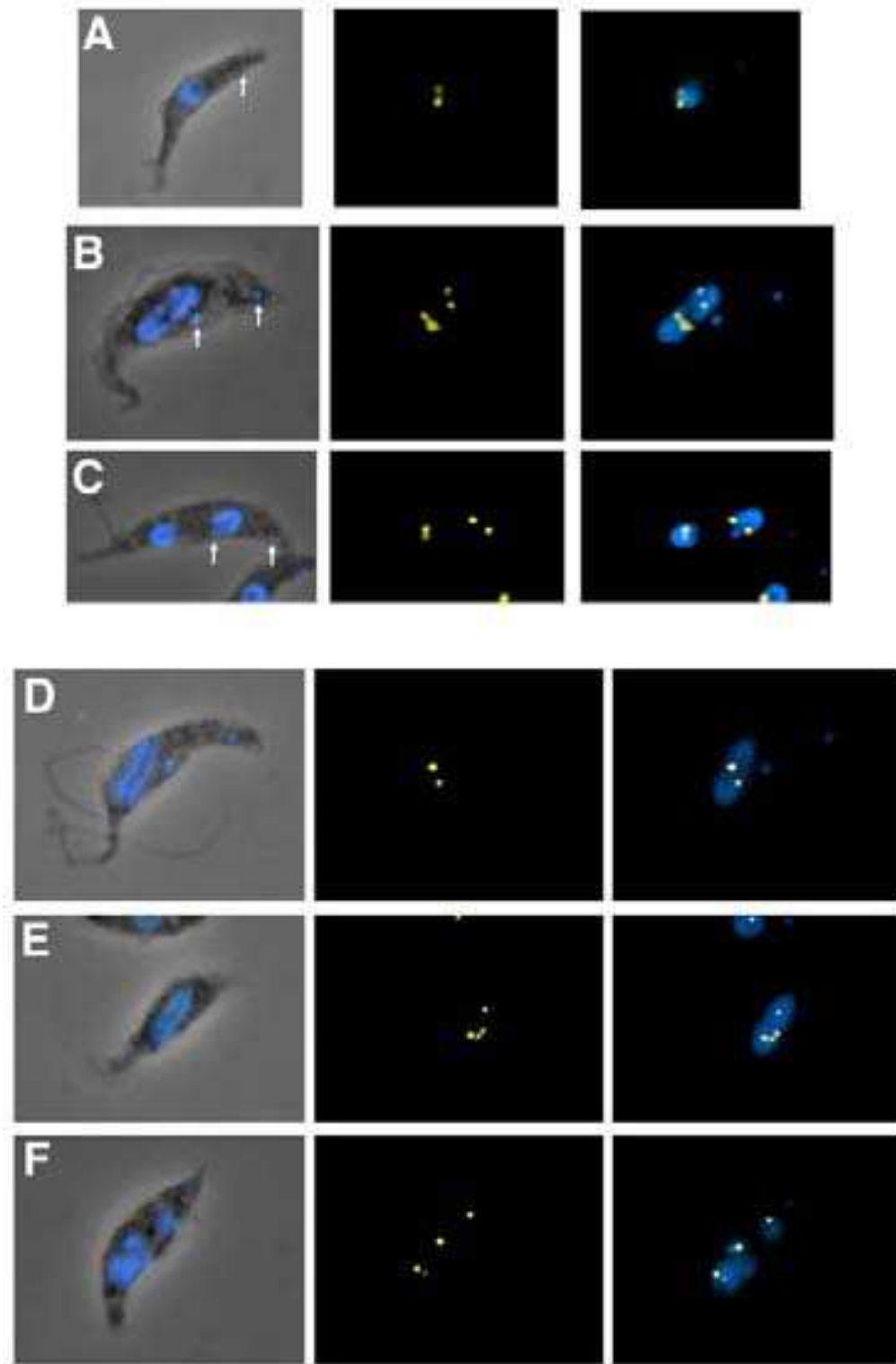


Figure 7

Nucleolus segregation is not equal in *TbAGO1*^{-/-} cells. Immunofluorescence of trypanosomes stained with the anti-nucleolus marker LIC6 monoclonal antibody and counterstained with DAPI to show nuclear and mitochondrial DNA. **A.** Wild-type trypanosomes, **B.** *TbAGO1*^{-/-} trypanosomes. In both cases, the top series shows a phase contrast image superimposed onto the DAPI image (blue), and the bottom series shows the DAPI image (blue) merged with nucleolus staining (red). Left panels, cells at the anaphase stage of nuclear mitosis. Middle and right panels, cells at the telophase stage of nuclear mitosis. In wild-type cells (A), both nuclei inherit similar amounts of nucleolar material, whereas clear differences are visible between the two nuclei in a large number of binucleated cells from the *TbAGO1*^{-/-} mutant (B).

**Figure 8**

Chromosome segregation is modified in *TbAGO1*^{-/-} cells. Wild-type (A-C) and *TbAGO1*^{-/-} (D-F) cells were fixed and processed for FISH using a probe for the 5S tandem repeats, localised on chromosome I and stained with DAPI. Left, phase-contrast image merged to DAPI (blue), middle, chromosome I signal (yellow) and right, merged DAPI-FISH signals. **A.** G1 cell; **B-F.** Mitotic cells. Defects in chromosome segregation are frequently observed in mutant cells.

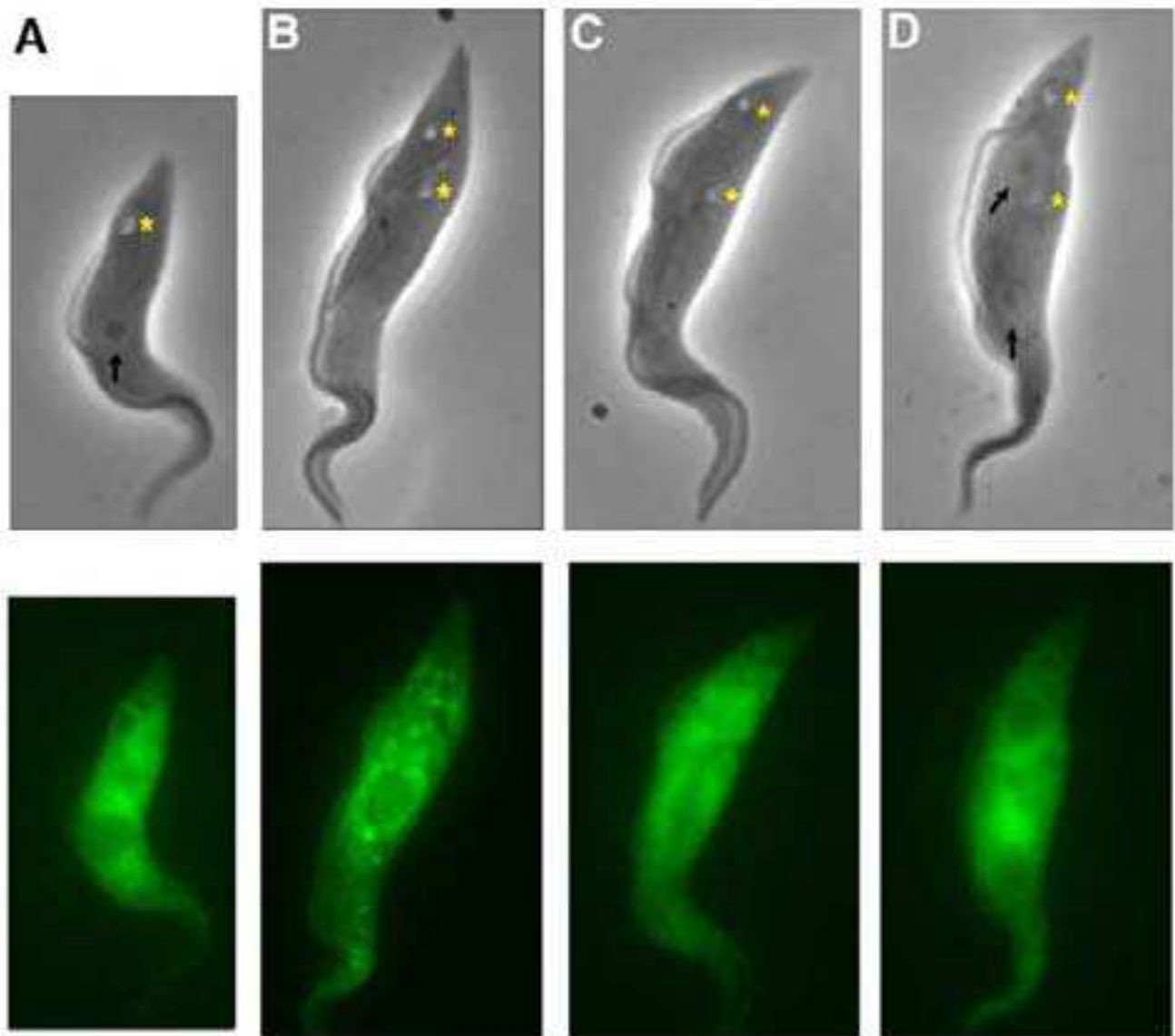


Figure 9

GFP::TbAGO1 is localised in the cytoplasm. Live cells from cell line *TbAGO1*^{-/-} +GFP::TbAGO1^{Ti} were observed by phase contrast (top panels) or by direct GFP fluorescence (bottom panels, images were not digitally enhanced). The position in the cell cycle can be evaluated by the number and position of flagellar pockets (indicated by yellow stars) and the distance separating them. Arrows indicate the position of the nucleolus (dark spot within the nucleus). **A.** Cell with one kinetoplast and one nucleus. **B, C.** Cells with two kinetoplasts and one mitotic nucleus. **D.** Post-mitotic cell with two kinetoplasts and two nuclei.

BLAST searches, especially since the genome of *Plasmodium* species is AT-biased.

All four proteins contained a typical Piwi domain [30], one of the signatures of the Argonaute protein family. The function of this domain is unknown but deletion experiments in mammalian cells suggest that it could be

involved in interactions with the type III ribonuclease Dicer [44]. The PAZ motif usually shows weaker conservation [13,45] and could only be unambiguously identified in TbAGO1. The function of this domain is also unknown, although interestingly, it is present in Dicer [6]. The PRP motif, identified in the mammalian Argonaute subfamily eIF2C [44], could not be found in any of the

four protist Argonaute proteins, suggesting that it appeared later in the evolution of multicellular organisms.

In addition to PAZ and Piwi domains, TbAGO1 possesses an RGG box, containing 10 copies of the arginine-glycine-glycine motif in the first 60 amino acids. This motif is involved in nucleic acid binding and has been identified in numerous proteins including nucleolin and the helicase Vasa. RNA binding proteins bearing RGG motifs have already been identified in the *T. brucei* proteins NOP40/44, a nucleolar protein [46] and the mitochondrial protein RBP16 [47]. In the latter case, extensive arginine methylation of RBP16 has been demonstrated, although its function remains to be determined [48].

TbAGO1 is required for RNAi

Dual transient transfection assays and *TbAGO1* gene deletion followed by transformation or endogenous expression of dsRNA clearly demonstrated that TbAGO1, but not TbPWI1 is required for RNAi. This shows that the two proteins are not redundant, since TbPWI1 could not substitute for TbAGO1 in any of the RNAi assays we used. Similarly, inactivation of *Caenorhabditis elegans* RDE1 abolishes RNAi completely despite the presence of at least 22 other Argonaute members in the genome [11,12]. Interestingly, *Leishmania* is not able to carry out RNAi [29] and possesses only a single Argonaute gene, LmPWI1 that is much closer to TbPWI1 than to TbAGO1.

A role for Argonaute proteins in RNA silencing processes has been shown in *C. elegans* [11], *Neurospora crassa* [45] and *A. thaliana* [49] by direct mutagenesis, and in *D. melanogaster* after purification of a ribonucleoprotein complex involved in RNAi, followed by functional characterisation in double transient transfection assays [31]. Involvement of the four mammalian Argonaute proteins of the eIF2C subfamily has also been shown by double transfection assays, this time using siRNA [44]. Trypanosomes are the first organisms for which a full knockout of an Argonaute protein involved in RNAi has been reported.

It is not yet clear how Argonaute proteins participate in RNAi. It should be noted that three of the Argonaute proteins proven to be involved in RNAi (AtAGO1, DmAGO2 and TbAGO1) possess amino-terminal extensions. The RGG box of TbAGO1 could be involved in RNA binding activities, supporting the hypothesis that Argonaute proteins could retain RNA molecules in the RNAi complex [28,50]. Interestingly, several RGG motifs are also present in the poly-Q box of *A. thaliana* (Fig. 1B), although no mutants affecting this domain have yet been reported [49,51].

TbAGO1 is required for proper chromosome segregation

Despite being completely resistant to RNAi generated by exogenous (*in vitro* synthesised) dsRNA or by endogenous (expressed hairpin) dsRNA, *TbAGO1*^{-/-} mutant cells are viable, showing that RNAi activity is dispensable for procyclic trypanosomes in culture. Similarly, several mutants of the RNAi pathway in *N. crassa*, *A. thaliana* and *C. elegans* survive normally under laboratory conditions [2,8,9,11]. A noticeable exception is found in *A. thaliana* where mutations in the *AGO1* gene have severe consequences on both RNA silencing and development [49,51]. In trypanosomes, detailed analysis demonstrated that *TbAGO1*^{-/-} mutant cells encountered significant difficulties in cell cycle progression, resulting in reduced growth rate. Four lines of evidence indicated that the Argonaute protein is essential for mitosis and proper chromosome segregation in *T. brucei*. Firstly, the mutant showed a 20–30-fold increase of zoids and 1K2N cells, aberrant cell types typical of problems with mitosis such as those caused by the microtubule inhibitor rhizoxin [37,38]. Treatment of WT trypanosomes with low concentrations of this drug selectively interferes with spindle formation, resulting in severe deficits in mitosis. However, mitochondrial genome duplication and segregation are not affected and cytokinesis can occur. This produces progeny with one kinetoplast but without a nucleus (zoids), and progeny with either one kinetoplast and one nucleus (if mitosis is completely inhibited) or with one kinetoplast and two nuclei (if mitosis is perturbed but not abolished). Significant production of zoids is also observed when mitosis progression is inhibited *via* RNAi targeting either cyclins or proteasome components potentially involved in cyclin control [52–54]. A delay in mitosis is further corroborated by the observation that, in the mutant *TbAGO1*^{-/-} cell line, the proportion of 2K1N cells is increased, whereas that of 2K2N cells is reduced (Fig. 5B). Secondly, the spindle was frequently not recognisable in mitotic mutant cells and, when present, it exhibited significant defects in formation, being too short, without poles or bent. Thirdly, following mitosis, around one third of the binucleated mutant cells showed an unequal distribution of a nucleolar marker. Fourthly, and most significantly, FISH analysis revealed frequent chromosome segregation defects in *TbAGO1*^{-/-} mitotic cells. Taken together with the presence of lagging DNA material and the frequent occurrence of apparently unequal DNA amounts in the two nuclei following mitosis, these data indicate significant problems in chromosome segregation and nuclear mitosis. It now remains to be seen whether these defects are related to the inability to carry out RNAi or to another function performed by TbAGO1.

These results are reminiscent of those reported in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, in which genetic deletion of *AGO1* (the only Argonaute protein) or RDP1

(a homologue of RNA-dependent RNA polymerase) or DCR1 (a homologue of Dicer) leads to chromosome segregation defects and a reduced growth rate [40,41]. RNAi has recently been shown to be functional in yeast [55]. However, it has not been reported whether any of these three proteins are involved. Intriguingly, AGO1, RDP1 and DCR1 are all essential for heterochromatin formation at the centromere, transcriptional gene silencing of this same area and proper centromere function [16,56]. It has been suggested that the RNAi machinery is required to process non-coding transcripts from the centromere, targeting these genomic sequences for formation of heterochromatin mediated by histone H3 methylation and recruiting Swi6/HP1 followed by cohesin protein complexes [16,17,57]. These results are also supported by the sequencing of yeast siRNAs, revealing a significant abundance of centromere-derived RNAs [58]. Defects in heterochromatin formation at the centromere interfere with kinetochore and mitotic spindle formation, probably explaining the mitotic segregation defects reported [40,41]. Interestingly, *csp9*, a fission yeast mutant impaired in chromosome segregation and transcriptional silencing at the centromere [59] turned out to be an allele of AGO1 (cited as personal communication by R.C. Allshire in [16]).

In *T. brucei*, one could imagine a similar involvement of the RNAi machinery in heterochromatin formation at the centromere, contribution to kinetochore assembly and chromosome segregation at mitosis. Unfortunately, centromeres have not yet been identified in trypanosomes and full sequencing and assembly of chromosomes I and II did not reveal any typical centromeric sequences [60,61], thereby preventing direct testing of this hypothesis. One may wonder how the related kinetoplastid *Leishmania* behaves during mitosis, as the RNAi machinery appears to be absent [29]. This situation is reminiscent of observations in yeast. Indeed, all the components of the RNAi machinery are present in fission yeast, whereas none of them have been found in budding yeast, although both genomes have been fully sequenced [43]. This observation could be related to the striking difference between centromere structure in these two organisms [62]. Similarly, trypanosomes and *Leishmania* separated a long time ago and could have developed separate systems to perform centromeric functions. Unfortunately the lack of information on centromere identity in both organisms prevents further investigation.

Finally, there is little information about heterochromatin structure in trypanosomes, despite the fact that it appears to play critical roles in the control of gene expression [63]. Understanding the mechanisms of heterochromatin formation will no doubt be a crucial advance in unveiling the

complex mechanisms of gene regulation in the Kinetoplastida.

Conclusions

We have identified novel Argonaute-like proteins in protozoa and demonstrated the essential role of one of them, TbAGO1, in RNAi in *Trypanosoma brucei*. Our data also reveal the importance of TbAGO1, probably *via* the RNAi machinery for proper chromosome segregation and spindle formation. Recent literature on the fission yeast *S. pombe* shows that AGO1 and two other components of the RNAi machinery are required for heterochromatin formation at the centromere and transcriptional gene silencing. Under these conditions, centromeres do not operate normally, leading to problems during mitosis. We postulate that a similar mechanism might operate in *T. brucei*, indicating the evolutionary ancient origin of Argonaute proteins involvement in RNAi and possibly in heterochromatin formation and centromere function.

Methods

Trypanosome cultures

The procyclic stage *Trypanosoma brucei brucei* strain 427 was used throughout this study. Cells were cultured at 27°C in semi-defined medium 79 containing 10 % foetal calf serum at densities of 1–8 million per ml. The PTH cell line that expresses the tet-repressor and allows tetracycline-inducible expression [64] was cultured under the same conditions.

Identification of Argonaute genes

The TIGR <http://www.tigr.org/tdb/mdb/tbdb> and Sanger Centre *T. brucei* databases http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_brucei/, the *L. major* database http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/, the *T. cruzi* database <http://tcruzidb.org/>, the *P. falciparum* database <http://www.plasmodb.org/> and the *G. lamblia* database <http://www.mbl.edu/Giardia> were screened by BLAST search for the presence of Argonaute-like genes using the full-length sequence of the *Paramecium* PAP gene. Homologous sequences were identified and when required the genes were re-constructed. TbAGO1 and TbPW11 were PCR-amplified using the high fidelity enzyme *Pwo* (Roche) and control-sequenced. Sequences were submitted to the GenBank database as AY433802 (TbAGO1) and AY433803 (TbPW11).

Plasmid construction and mutant cell line generation

For expression of GFP::TbAGO1, a fusion gene was constructed in plasmid pGFPPFRC430 (P.B., unpublished). This plasmid is a derivative of pHD430 [34] and contains the tetracycline-inducible EP1 promoter, followed by the *EGFPN2* gene (Clontech) from which the stop codon was deleted, immediately followed by an *XbaI* site, in frame with the *PFRC* gene, followed by the 3' untranslated

region of aldolase and by a cassette with the phleomycin gene resistance marker. The complete coding sequence of *TbAGO1* was amplified by PCR with *Pwo* DNA polymerase (Roche) from genomic DNA using primers GCACGCTCA-GAATGTCTGACTGGGAACGTGG (*Xba*I site underlined) and GCACGGGATCCTTATAGATAATGCATTGTTGT (*Bam*HI site underlined). The PCR product was cloned in pCR-Blunt-II-TOPO (Invitrogen) and the *TbAGO1* coding sequence (including its stop codon) was cloned in frame with the *EGFPN2* gene in the pGFPPFRC430 vector using *Xba*I and *Bam*HI sites to generate plasmid pGFPTbAGO1430. This plasmid was linearised with *Eco*RV and transformed in the PTH cell line that expresses the Tet-repressor [64] to generate a cell line that expresses the GFP::TbAGO1 fusion protein only in the presence of tetracycline (1 µg per ml).

For *TbAGO1* gene deletion, *TbAGO1* flanking sequences were amplified by PCR with *Pfu* DNA polymerase from genomic DNA using primers CGCCAACTGTACTCTCGTATT and TTTATTTAAATCCTTTTTATTAAGTTGCTT (upstream region, amplifying a sequence of 500 bp terminating immediately ahead of *TbAGO1* start codon) and ACCACCGCTTCTCCGGGAAAGCAA and ACCACGAACTCACACTGCTGT-CAG (downstream region, amplifying a sequence of 453 bp, starting immediately downstream of *TbAGO1* stop codon). The full coding sequences of gene resistance markers *BSD* and *NEO* were amplified with *Pfu* (Invitrogen) from plasmid DNA using primers ATGGCCAAGCCTTTGTCTCA and TTAGCCCTCCACACATAAC (*BSD*) or ATGCGCGAAATCGTCTGCG and TCA-GAAGAACTCGTCAAGAAGG (*NEO*). PCR products were ligated and re-amplified using the PCR-ligation protocol as described [65] with a few modifications. We used bolting primers CGCCAACTGTACTCTCGTATT (upstream region, position in the sequence: -466) and GAAACTCACACTGCTGTGTCAGC (downstream region, position in the 3' flanking sequence: +448) for amplification after the second ligation. Final products used for transfection were therefore composed of 466 bp from the *TbAGO1* upstream flanking region, the gene resistance marker *BSD* or *NEO* and 448 bp from the *TbAGO1* downstream flanking region. First, the first allele of *TbAGO1* was replaced by transformation of wild-type *T. brucei* (strain 427) with the *BSD* construct followed by selection with 10 µg/ml blasticidin (Sigma). Resistant cell lines were obtained at the expected frequency and further transformed with the *NEO* construct to replace the second *TbAGO1* allele. Cells were selected with 10 µg/ml of blasticidin and 15 µg/ml of G418 (Calbiochem). Double resistant cells were obtained at the expected frequency and analysed by Southern blotting. A transformant cell line was selected, subcloned by limited dilution and termed *TbAGO1*^{-/-} cell line.

For complementation, the *TbAGO1*^{-/-} cell line was transformed with the pGFPTbAGO1430 plasmid and selected with 2 µg/ml phleomycin (Sigma), 10 µg/ml of blasticidin and 15 µg/ml of G418. Transformant cell lines were screened by FACS analysis detecting GFP fluorescence. To obtain tetracycline-regulatable expression of GFP::TbAGO1 in the knock-out background, this cell line was further transformed with plasmid pHD360 (linearised with *Not*I), that expresses the tet-repressor after integration in the tubulin locus [34]. *TbAGO1*^{-/+GFP::TbAGO1^{Ti} cell lines were selected in the presence of 1 µg/ml tetracycline, 20 µg/ml hygromycin (Sigma), 2 µg/ml phleomycin, 10 µg/ml blasticidin and 15 µg/ml G418. Transformants were screened by FACS analysis before being grown in the absence of tetracycline to select cell lines with optimal control of expression. In all cases, cell lines were subcloned before any detailed analysis. For measurements of growth rates, cells were always grown without antibiotics (with the exception of tetracycline when required) for at least 7 days before the experiments and for the duration of the whole experiment.}

RT-PCR, Northern and Southern blotting

RT-PCR was performed as described previously [32] using 250 ng of total RNA (DNA-free) and the following primers: ACGCCAAGCTTGGCGGTAGCGAAGACGCATTG and GCACCCTCGAGACGCTCGTCGGATACTACCGCG (*TbAGO1* segment from the nucleotide coding sequence 425 to 936); GCATCCAAGCTTCCATAGGTCGTTACTGTCG and CGTCGTCGAGCCACCGGAAGATGTCCTGC (*TbPW11* segment from the nucleotide coding sequence 2228 to 2847). Northern blotting was carried out as described [32], except that DNA probes were radiolabelled by random priming. For Southern blotting, 20 µg genomic DNA was extracted from the various trypanosome cell lines and digested with the appropriate restriction enzymes, before separation on an 0.8 % agarose gel. Samples were transferred by capillarity to a HybondN⁺ (Amersham) membrane. The membrane was washed in 2x SSC, prehybridised in RapidHyb buffer (Amersham) at 65°C for 30 min and hybridised with radiolabelled probes overnight at 65°C. The membrane was washed twice for 5 min in 2x SSC and once for 20 min with 2x SSC, 0.1% SDS at 65°C. Radioactive signals were identified by Typhoon 9410 (Amersham) analysis and quantified using ImageQuant 5.2 software.

RNAi assays by transient transfection

RNA was synthesised *in vitro* with T3 and Sp6 polymerases using PCR products as templates. The following primers (incorporating T3 or Sp6 promoters) were used: for *TbAGO1* (from the nucleotide coding sequence 604–903), AATTAACCCTCACTAAAGGGAGATCGTTGAACCCCAAAGAGAG (T3 promoter underlined) and ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCGCTCGCCGGATAC-

TACCGC (Sp6 promoter underlined); for *TbPW11* (from the nucleotide coding sequence 2228–2848), AATTAACCTCACTAAAGGGAGACCATAGTCTGTTACTGTCGT (T3 promoter underlined) and ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCCACCGGAAGATGTGCCTGC (Sp6 promoter underlined); for *TbGRP1* (glycine-rich protein, from the nucleotide coding sequence 604–990), AATTAACCTCACTAAAGGGAGACAGCGTGTGCAGGTGTCTGG (T3 promoter underlined) and ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCACCTTCTGACTGGCATCAC (Sp6 promoter underlined); for *EGFPN2* (from the nucleotide coding sequence 476–691), AATTAACCTCACTAAAGGGAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC (T3 promoter underlined) and ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGTGATCCCGCGCGCGTACAG (Sp6 promoter underlined) and finally *PFRA* (from the nucleotide coding sequence 1084–1358), ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGGTGAAGCGCCGTATTGAGGA (Sp6 promoter underlined) and AATTAACCTCACTAAAGGGAGAGTTTTGTACAGGCCGACGGAA (T3 promoter underlined). Amplified regions were selected to avoid cross-RNAi with any other sequence present in the *T. brucei* database [32]. Single-stranded RNAs were mixed, heated at 90°C for 5 min and annealed in the RNA transcription buffer at 65°C for 30 min. Annealed dsRNA were sterilised by addition of 2.5 volumes of ethanol and 0.1 volume of 3 M sodium acetate (pH 5.0) followed by precipitation and resuspended in sterile water. Annealed dsRNA was introduced into trypanosomes by electroporation as described [21]. For direct transfection assays, cells were transformed with *PFRA*, *FLA1* or α -*tubulin* dsRNA, and returned to culture for 15–18 h before fixation and analysis by immunofluorescence. For dual transfection assays, cells were first electroporated with dsRNA from the gene to be tested, returned to culture for 10 hours and transfected with *PFRA*, *FLA1* or *tubulin* dsRNA, grown for 15–18 h and processed as above. When GFP fluorescent proteins were used, cells were analysed by FACS (FACSort, Becton Dickinson) before transfection and immediately before fixation.

Immunofluorescence, FISH, image acquisition and analysis

For indirect immunofluorescence with the anti-PFRA specific monoclonal antibody L8C4 [66] or with the anti-nucleolar antibody L1C6 (L. Kohl and K. Gull, University of Manchester, unpublished), cells were spread on poly-L-lysine coated slides and fixed in methanol at -20°C before processing as described [67]. For indirect immunofluorescence with the anti- β tubulin monoclonal antibody KMX-1 [68], trypanosomes were fixed in 4% (w/v) fresh paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature for 10 min, permeabilised for 10 minutes in 0.1% Nonidet P-40 and processed as described [67]. FISH was performed as described [42] except that

probes were directly labelled with Alexa 546-dUTP (Molecular Probes). Slides were viewed using a DMR Leica microscope and images were captured with a Cool Snap HQ camera (Roper Scientific). Images were analysed using the IPLab Spectrum software (Scanalytics).

Authors' contributions

M.D.-D. carried out all the experiments reported including database searches. P.B. conceived the study, participated in its design and coordination and wrote the manuscript.

Additional material

Additional file 1

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1741-7007-1-2-S1.ppt>]

Acknowledgements

We thank K. Gull and L. Kohl for providing the anti-nucleolar monoclonal antibody L1C6, C. Clayton for providing plasmids pHD360 and pHD430 and E. Charlier and H. Mitouard for technical assistance. We also wish to thank L. Kohl for help with sequence alignments and M. Gué for helpful discussion. Sequencing of *T. brucei* was carried out at TIGR and the Sanger Institute with support from NIAID and the Wellcome Trust, respectively. This work was funded by a CNRS ATIPE grant and by an "Aide à l'Implantation de Nouvelles Equipes" awarded by the Fondation pour la Recherche Médicale. M.D.-D is supported by a "Bourse de Formation Recherche du Gouvernement Luxembourgeois".

References

1. van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR: **Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression.** *Plant Cell* 1990, **2**:291-299.
2. Cogoni C, Ireland JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G: **Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation.** *EMBO J* 1996, **15**:3153-3163.
3. Ruiz F, Vayssie L, Klotz C, Sperling L, Madeddu L: **Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*.** *Mol Biol Cell* 1998, **9**:931-943.
4. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391**:806-811.
5. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T: **RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.** *Genes Dev* 2001, **15**:188-200.
6. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ: **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** *Nature* 2001, **409**:363-366.
7. Hutvagner G, Zamore PD: **RNAi: nature abhors a double-strand.** *Curr Opin Genet Dev* 2002, **12**:225-232.
8. Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nijkic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H: ***Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance.** *Cell* 2000, **101**:533-542.

9. Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC: **An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus.** *Cell* 2000, **101**:543-553.
10. Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH: **Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD.** *Cell* 1999, **99**:133-141.
11. Tabara H, Sarkisian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC: **The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*.** *Cell* 1999, **99**:123-132.
12. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC: **Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing.** *Cell* 2001, **106**:23-34.
13. Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA: **Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*.** *Cell* 2002, **110**:689-699.
14. Yao MC, Fuller P, Xi X: **Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense.** *Science* 2003, **300**:1581-1584.
15. Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ: **Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA.** *EMBO J* 2000, **19**:5194-5201.
16. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA: **Regulation of heterochromatin silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi.** *Science* 2002, **297**:1833-1837.
17. Schramke V, Allshire R: **Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing.** *Science* 2003, **301**:1069-1074.
18. Matthews KR: **Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*.** *Parasitol. Today* 1999, **15**:76-80.
19. Donelson JE: **Antigenic variation and the African trypanosome genome.** *Acta Trop.* 2003, **85**:391-404.
20. Bastin P, Sherwin T, Gull K: **Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility.** *Nature* 1998, **391**:548.
21. Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E: **Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:14687-14692.
22. Bastin P, Ellis K, Kohl L, Gull K: **Flagellum ontogeny studied via an inherited and regulated RNA interference system.** *J Cell Sci* 2000, **113**:3321-3328.
23. Wang Z, Morris JC, Drew ME, Englund PT: **Interference of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters.** *J Biol Chem* 2000, **275**:40174-40179.
24. Wang Z, Englund PT: **RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA.** *EMBO J* 2001, **20**:4674-4683.
25. Morris JC, Wang Z, Drew ME, Englund PT: **Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library.** *EMBO J* 2002, **21**:4429-4438.
26. Kohl L, Robinson DR, Bastin P: **Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes.** *EMBO J* 2003, **22**:5336-5346.
27. Dijkeng A, Shi H, Tschudi C, Ullu E: **RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs.** *RNA* 2001, **7**:1522-1530.
28. Dijkeng A, Shi H, Tschudi C, Shen S, Ullu E: **An siRNA ribonucleoprotein is found associated with polyribosomes in *Trypanosoma brucei*.** *RNA* 2003, **9**:802-808.
29. Robinson KA, Beverley SM: **Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*.** *Mol Biochem Parasitol* 2003, **128**:217-228.
30. Cerutti L, Mian N, Bateman A: **Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain.** *Trends Biochem Sci* 2000, **25**:481-482.
31. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ: **Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi.** *Science* 2001, **293**:1146-1150.
32. 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.
33. Cox DN, Chao A, Lin H: **piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells.** *Development* 2000, **127**:503-514.
34. Wirtz E, Clayton C: **Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor.** *Science* 1995, **268**:1179-1183.
35. Sherwin T, Gull K: **The cell division cycle of *Trypanosoma brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1989, **323**:573-588.
36. Woodward R, Gull K: **Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*.** *J Cell Sci* 1990, **95**:49-57.
37. Robinson DR, Sherwin T, Ploubidou A, Byard EH, 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.
38. Ploubidou A, Robinson DR, Docherty RC, Ogbadoyi EO, Gull K: **Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis.** *J Cell Sci* 1999, **112**:4641-4650.
39. Ogbadoyi E, Ersfeld K, Robinson D, Sherwin T, Gull K: **Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis.** *Chromosoma* 2000, **108**:501-513.
40. Provost P, Silverstein RA, Dishart D, Walfridsson J, Djupedal I, Kniola B, Wright A, Samuelsson B, Radmark O, Ekwall K: **Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:16648-16653.
41. Hall IM, Noma K, Grewal SI: **RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:193-198.
42. Ersfeld K, Gull K: **Partitioning of large and minichromosomes in *Trypanosoma brucei*.** *Science* 1997, **276**:611-614.
43. Aravind L, Watanabe H, Lipman DJ, Koonin EV: **Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:11319-11324.
44. Doi N, Zenko S, Ueda R, Ohki-Hamazaki H, Ui-Tei K, Saigo K: **Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors.** *Curr Biol* 2003, **13**:41-46.
45. Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C: **Gene silencing in worms and fungi.** *Nature* 2000, **404**:245.
46. Das A, Peterson GC, Kanner SB, Frevert U, Parsons M: **A major tyrosine-phosphorylated protein of *Trypanosoma brucei* is a nucleolar RNA-binding protein.** *J Biol Chem* 1996, **271**:15675-15681.
47. Pelletier M, Miller MM, Read LK: **RNA-binding properties of the mitochondrial Y-box protein RBPI6.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:1266-1275.
48. Pelletier M, Xu Y, Wang X, Zahariev S, Pongor S, Aletta JM, Read LK: **Arginine methylation of a mitochondrial guide RNA binding protein from *Trypanosoma brucei*.** *Mol Biochem Parasitol* 2001, **118**:49-59.
49. Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H: **AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:11650-11654.
50. Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C: **Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*.** *Genes Dev* 2002, **16**:790-795.
51. Morel JB, Godon C, Mourrain P, Beclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H: **Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance.** *Plant Cell* 2002, **14**:629-639.
52. Li Z, Zou CB, Yao Y, Hoyt MA, McDonough S, Mackey ZB, Coffino P, Wang CC: **An easily dissociated 26 S proteasome catalyzes an essential ubiquitin-mediated protein degradation pathway in *Trypanosoma brucei*.** *J Biol Chem* 2002, **277**:15486-15498.
53. Hammarton TC, Clark J, Douglas F, Boshart M, Mottram JC: **Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin.** *J Biol Chem* 2003, **278**:22877-22886.
54. Li Z, Wang CC: **A PHO80-like cyclin and a B-type cyclin control the cell cycle of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*.** *J Biol Chem* 2003, **278**:20652-20658.

55. Raponi M, Arndt GM: **Double-stranded RNA-mediated gene silencing in fission yeast.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:4481-4489.
56. Volpe T, Schramke V, Hamilton GL, White SA, Teng G, Martienssen RA, Allshire RC: **RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast.** *Chromosome Res* 2003, **11**:137-146.
57. Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI: **Establishment and maintenance of a heterochromatin domain.** *Science* 2002, **297**:2232-2237.
58. Reinhart BJ, Bartel DP: **Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats.** *Science* 2002, **297**:1831.
59. Ekwall K, Cranston G, Allshire RC: **Fission yeast mutants that alleviate transcriptional gene silencing in centromeric flanking repeats and disrupts chromosome segregation.** *Genetics* 1999, **153**:1153-1169.
60. Hall N, Berriman M, Lennard NJ, Harris BR, Hertz-Fowler C, Bart-Delabesse EN, Gerrard CS, Atkin RJ, Barron AJ, Bowman S, Bray-Allen SP, Bringaud F, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies R, Doggett J, Fraser A, Gruter E, Hall S, Harper AD, Kay MP, Leech V, Mayes R, Price C, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reitter C, Rutherford K, Sasse J, Sharp S, Shownkeen R, MacLeod A, Taylor S, Tweedie A, Turner CM, Tait A, Gull K, Barrell B, Melville SE: **The DNA sequence of chromosome I of an African trypanosome: gene content, chromosome organisation, recombination and polymorphism.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:4864-4873.
61. El-Sayed NM, Ghedin E, Song J, MacLeod A, Bringaud F, Larkin C, Wanless D, Peterson J, Hou L, Taylor S, Tweedie A, Biteau N, Khalak HG, Lin X, Mason T, Hannick L, Caler E, Blandin G, Bartholomeu D, Simpson AJ, Kaul S, Zhao H, Pai G, Van Aken S, Utterback T, Haas B, Koo HL, Umayam L, Suh B, Gerrard C, Leech V, Qi R, Zhou S, Schwartz D, Feldblyum T, Salzberg S, Tait A, Turner CM, Ullu E, White O, Melville S, Adams MD, Fraser CM, Donelson JE: **The sequence and analysis of *Trypanosoma brucei* chromosome II.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:4856-4863.
62. Malik HS, Henikoff S: **Conflict begets complexity: the evolution of centromeres.** *Curr Opin Genet Dev* 2002, **12**:711-718.
63. Navarro M, Cross GA, Wirtz E: ***Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein regulation involves coupled activation/inactivation and chromatin remodeling of expression sites.** *EMBO J* 1999, **18**:2265-2272.
64. Bastin P, MacRae TH, Francis SB, Matthews KR, Gull K: **Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:8191-8200.
65. Ali SA, Steinkasserer A: **PCR-ligation-PCR mutagenesis: a protocol for creating gene fusions and mutations.** *Biotechniques* 1995, **18**:746-750.
66. 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.
67. Sherwin T, Schneider A, Sasse R, Seebeck T, Gull K: **Distinct localization and cell cycle dependence of COOH terminally tyrosinolated alpha-tubulin in the microtubules of *Trypanosoma brucei*.** *J Cell Biol* 1987, **104**:439-446.
68. Birkett CR, Foster KE, Johnson L, Gull K: **Use of monoclonal antibodies to analyse the expression of a multi-tubulin family.** *FEBS Lett* 1985, **187**:211-218.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



II.C.2. Rôles distincts de la protéine Argonaute TbAGO1 dans la mitose et le contrôle des transcrits de rétroposons

II.C.2.a Introduction

Chez *Trypanosoma brucei*, nos résultats ont donc démontré que les cellules *TbAGO1*^{-/-} présentent des problèmes de formation du fuseau mitotique et de ségrégation des chromosomes (Durand-Dubief and Bastin, 2003). Cependant, l'analyse d'une autre mutant *TbAGO1*^{-/-} généré dans une autre souche de *T. brucei* (YTAT1.1), révèle une augmentation considérable des transcrits des rétroposons *ingi* et SLACS (Shi et al., 2004b). Ces rétroéléments représentent près 6% du génome nucléaire et pourraient donc redevenir actifs en absence d'ARNi comme cela a été observé chez d'autres espèces (Vastenhouw and Plasterk, 2004; Wu-Scharf et al., 2000). Dans ces conditions, il est possible que des insertions importantes de rétroéléments puissent altérer les chromosomes et être responsables du phénotype mitotique. Dans cette partie, nous approfondissons l'analyse des défauts mitotiques et évaluons sa connexion avec la surexpression des rétroposons *ingi*.

La lignée *Ytat1.1TbAGO1*^{-/-} ne montre pas de défauts mitotiques aussi dramatiques que ceux obtenus lors du knockout de *TbAGO1* dans notre souche 427. Seules ont été constatées une légère réduction de la croissance et une apparition discrète de zoïdes (Ullu. E communication personnelle). Ces différences de phénotypes sont troublantes car les variations génétiques entre les deux souches sont faibles (Ullu et al., 2004). Ces deux analyses soulèvent au moins deux hypothèses concernant les fonctions biologiques de l'ARNi. Premièrement l'ARNi participerait au maintien de l'intégrité du génome par l'extinction d'éléments potentiellement transposables (Vastenhouw and Plasterk, 2004; Wu-Scharf et al., 2000) et deuxièmement l'ARNi contribuerait au maintien de l'hétérochromatine (Schramke and Allshire, 2003). Dans cette hypothèse, l'augmentation de la transcription de ces rétroéléments pourrait provoquer un défaut de formation de l'hétérochromatine chez *T. brucei*. Les défauts mitotiques présents dans la lignée procyclique *427TbAGO1*^{-/-} sont-ils reliés à l'absence du mécanisme de l'ARNi ou à une surexpression des rétroposons *ingi* provoquant une accumulation de mutations provoquées par ces rétroéléments devenant létale pour la cellule ? En face de cette problématique, nous avons approfondi la caractérisation du mutant *427TbAGO1*^{-/-}.

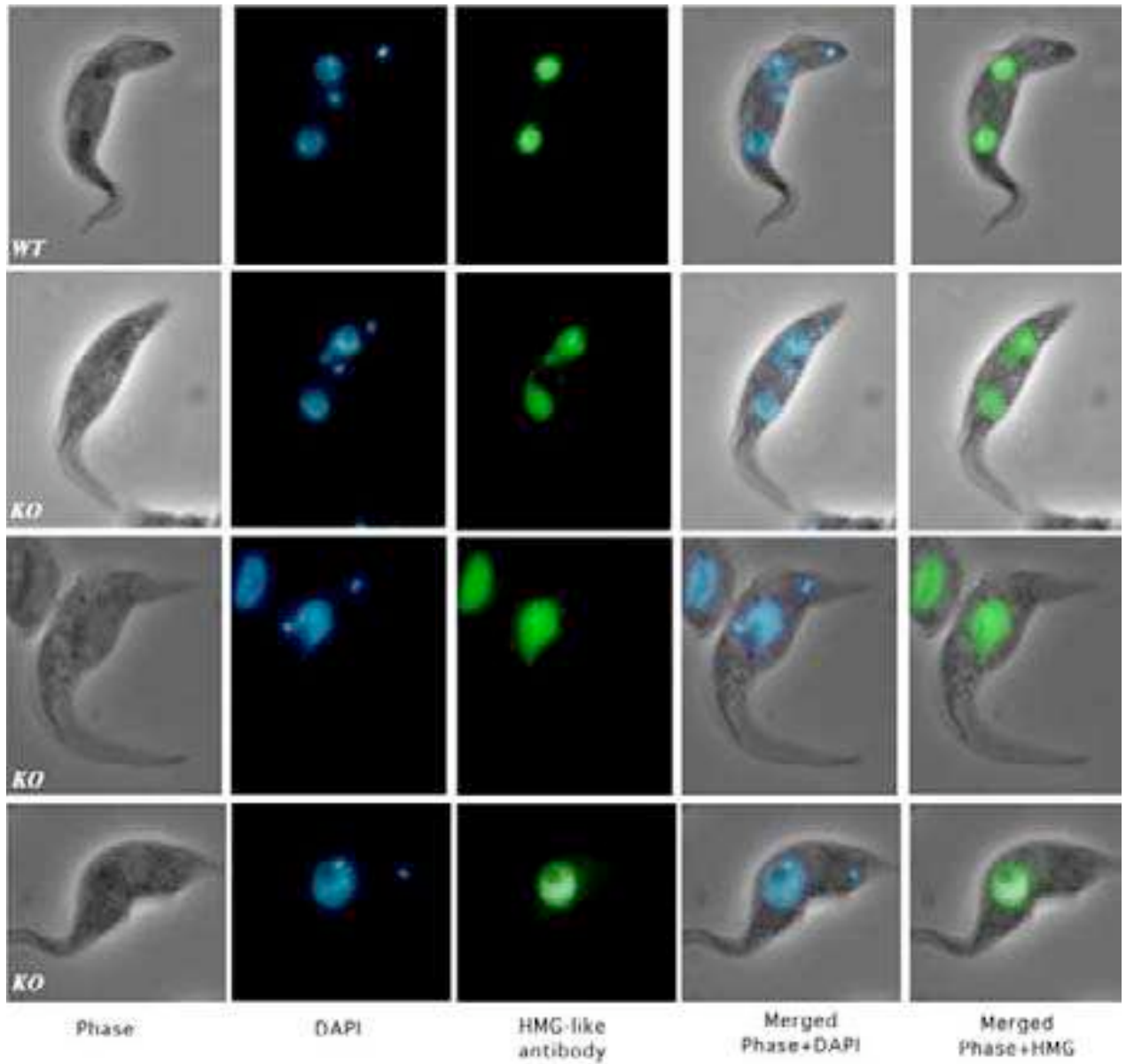


Figure 30

Détection de la protéine HMG-like chez les cellules sauvages (*WT*) et *TbAGO1*^{-/-} (*KO*) en mitose.

La protéine HMG marque exclusivement l'ADN nucléaire (en vert). A droite, les images en contraste de phase ont été superposées avec les images DAPI ou HMG-like. Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde 4%, incubées avec l'antisérum HMG et analysées en immunofluorescence.

II.C.2.b Résultats

II.C.2.b.1 L'unique protéine HMG-like est associée à l'ADN nucléaire chez TbAGO1-/-

Dans l'hypothèse que la perte de TbAGO1 affecte la formation de l'hétérochromatine, nous avons recherché des marqueurs de la chromatine. Malheureusement, ceux-ci sont peu nombreux chez les trypanosomes. Chez la plupart des eucaryotes, plusieurs des protéines de la famille des protéines HMG (« High Mobility Group ») régulent la compaction de la chromatine et influencent en conséquence l'activité transcriptionnelle. Aussi, les protéines HMG peuvent rentrer en compétition avec l'histone H1 pour la compaction de la chromatine et l'accès aux éléments régulateurs (Catez et al., 2004; Ragab and Travers, 2003). Chez *T. brucei*, le gène *TPD1* code pour la seule protéine homologue des protéines HMG (pour « High Mobility Group ») (Erondu and Donelson, 1992) et la séquence de l'histone H1 est très peu conservée par rapport aux autres espèces (Gruter and Betschart, 2001; Horn, 2001). À l'aide d'un antisérum reconnaissant spécifiquement la protéine TPD1 (Ersfeld K., donnée non publiée), nous avons analysé par immunofluorescence la localisation de cette protéine chez la lignée *427TbAGO1-/-* pour observer des défauts éventuels dans l'hétérochromatine. Chez les cellules sauvages, la protéine HMG est associée spécifiquement à l'ADN nucléaire et pas à l'ADN mitochondrial. Elle est exclue du nucléole (zone sombre, **figure 30**) et sa répartition suit celle de l'ADN lors de la mitose. Chez la lignée *TbAGO1-/-*, la protéine HMG reflète aussi le marquage de l'ADN nucléaire et montre des défauts similaires à ceux observés avec l'ADN (**figure 30**). Cependant en dehors de cette observation, aucune particularité n'a pu être observée, comme la présence de domaines spécifiques.

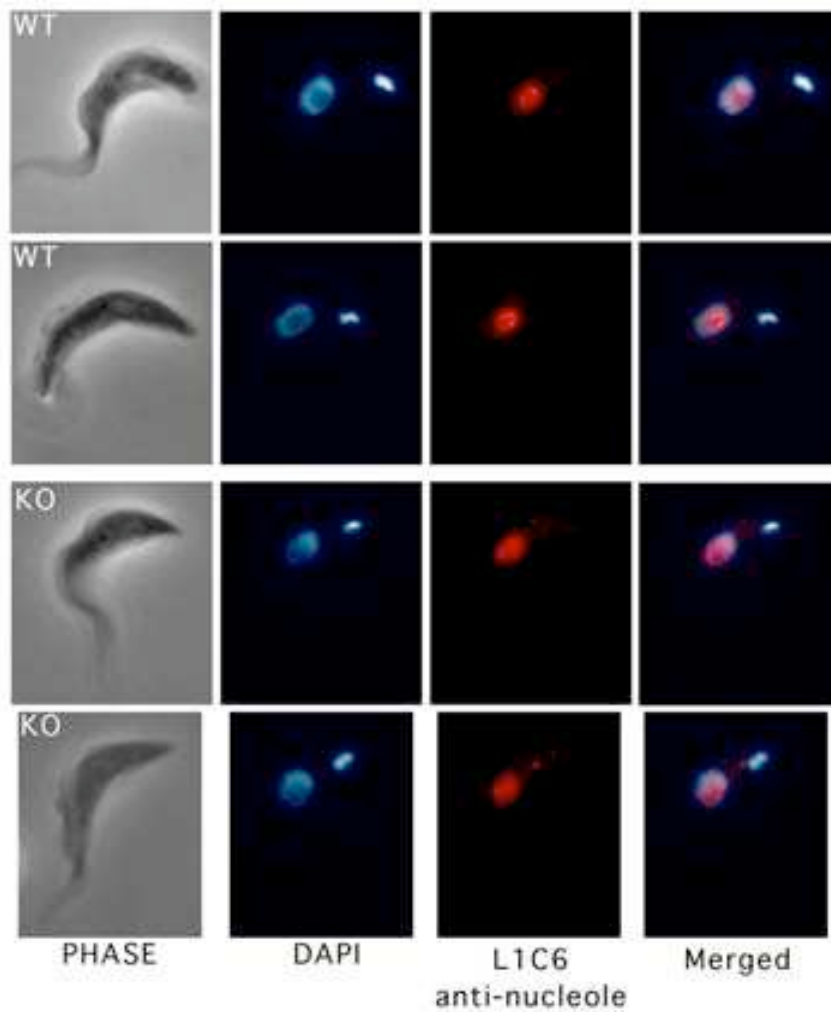


Figure 31

Détection de l'antigène nucléolaire dans des cellules sauvages (WT) et *TbAGO1*^{-/-} (KO) en interphase.

Fixation au PFA 4% et immunofluorescence avec l'anticorps monoclonal L1C6.

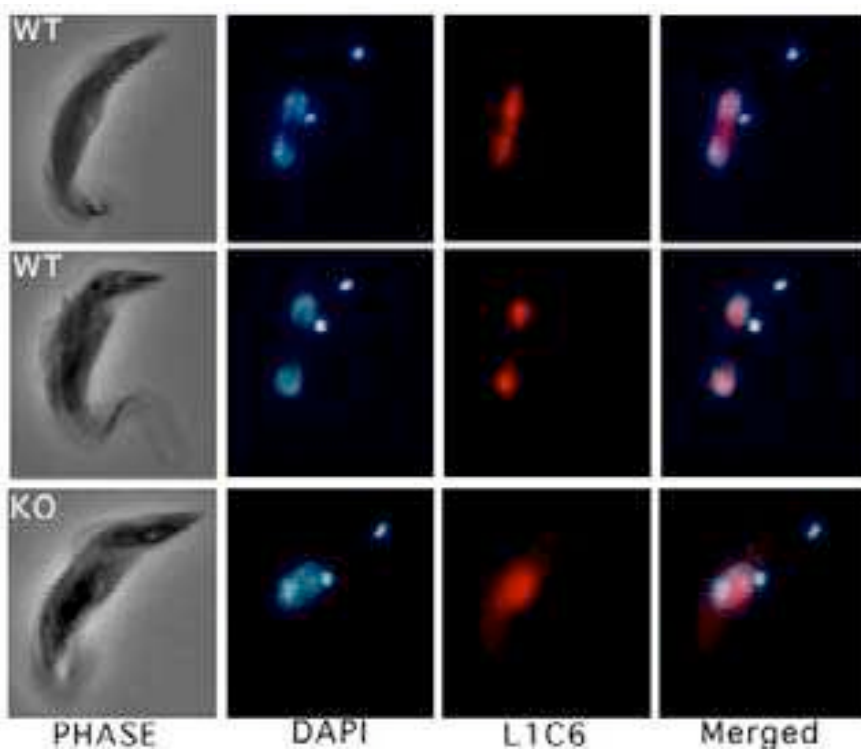


Figure 32

Détection de l'antigène nucléolaire dans des cellules sauvages (WT) et *TbAGO1*^{-/-} (KO) en mitose.

Fixation au PFA 4% et immunofluorescence avec l'anticorps monoclonal L1C6

II.C.2.b.2 Migration anormale du nucléole sur le fuseau mitotique

Chez les trypanosomes, le nucléole et la membrane nucléaire ne se désassemblent pas lors de la mitose. Le nucléole se duplique et s'associe au fuseau mitotique afin de ségréger vers les pôles du noyau (Ogbadoyi et al., 2000). Comme marqueur du nucléole, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal LIC6 qui reconnaît un antigène d'identité inconnue (L. Kohl et K. Gull, données non publiées)(Durand-Dubief and Bastin, 2003). Au cours de nos expériences initiales, nous avons utilisé des conditions de fixation au méthanol, qui peuvent générer une dispersion des acides nucléiques et donc aussi de l'antigène nucléolaire. Nous avons dès lors recouru à la fixation des cellules au para-formaldéhyde qui assure une meilleure préservation générale, y compris des acides nucléiques.

Chez les cellules sauvages en interphase, le nucléole se délimite précisément dans le noyau et est exclu de l'ADN nucléaire marqué au DAPI (**figure 31**). Durant la mitose, le nucléole est toujours exclu de l'ADN et se duplique en s'étirant vers les pôles du noyau (**figure 32**). Les cellules *TbAGO1*^{-/-} en interphase présentent toujours un fort marquage mais l'antigène est souvent dispersé dans le noyau et colocalise avec l'ADN nucléaire (**figure 31**). La taille et la forme du nucléole sont affectées chez les cellules mutantes. En mitose, l'antigène nucléolaire est dispersé dans le noyau et, comme l'ADN, ne ségrège pas correctement vers les pôles du noyau (**figure 32**).

Ces résultats démontrent que le nucléole ségrége bien *via* un mécanisme dépendant de la présence du fuseau mitotique. Les problèmes de ségrégation observés chez les cellules *TbAGO1*^{-/-} sont sans doute responsables de la disposition aberrante du nucléole dans les cellules en interphase .

II.C.2.b.3 Migration des minichromosomes chez le mutant TbAGO1-/-

Le mode de ségrégation des différents types de chromosomes n'est pas connu. En général, lors la mitose chez les eucaryotes, la ségrégation d'un chromosome requiert au minimum la présence d'un microtubule (Zhou et al., 2002). Chez *T. brucei*, seulement huit microtubules centraux constituent le fuseau mitotique qui sépare 11 grands chromosomes, les chromosomes de taille intermédiaire et une centaine de minichromosomes (Gull et al., 1998). Pourtant, tous ces chromosomes sont séparés correctement et dépendent du fuseau mitotique (Alsford et al., 2001; Ersfeld and Gull, 1997; Wickstead et al., 2003a). La lignée *TbAGO1-/-* présente de sévères défauts dans la formation du fuseau mitotique et dans la ségrégation des grands chromosomes (Durand-Dubief and Bastin, 2003)(Durand-Dubief et Bastin, données non publiées). Nous avons ensuite analysé la migration des minichromosomes par fluorescence *in situ* (FISH) en utilisant une sonde reconnaissant le motif répété de 177bp qui leur est spécifique.

Les cellules sauvages en mitose ségrégent les minichromosomes vers les pôles du noyau (en haut et au milieu, **figure 33**). Nous avons ensuite analysé par FISH la migration des grands chromosomes et des minichromosomes lors de la mitose. Chez la lignée sauvage, les minichromosomes migrent en premier, puis suit la migration des grands chromosomes vers les pôles du noyau (**figure 34** en haut). Les cellules *TbAGO1-/-* mitotiques montrent une faible proportion avec une ségrégation anormale des minichromosomes (en bas **figure 33**). Nous avons confirmé ces résultats par FISH sur les répétitions télomériques présentes en grand nombre dans les minichromosomes (données non montrées). Dans certains cas, les grands chromosomes n'ont pas migré vers les pôles du noyau alors que les minichromosomes ont quand même effectué une migration normale ce qui indique qu'ils pourraient migrer de façon différente (**figure 34**).

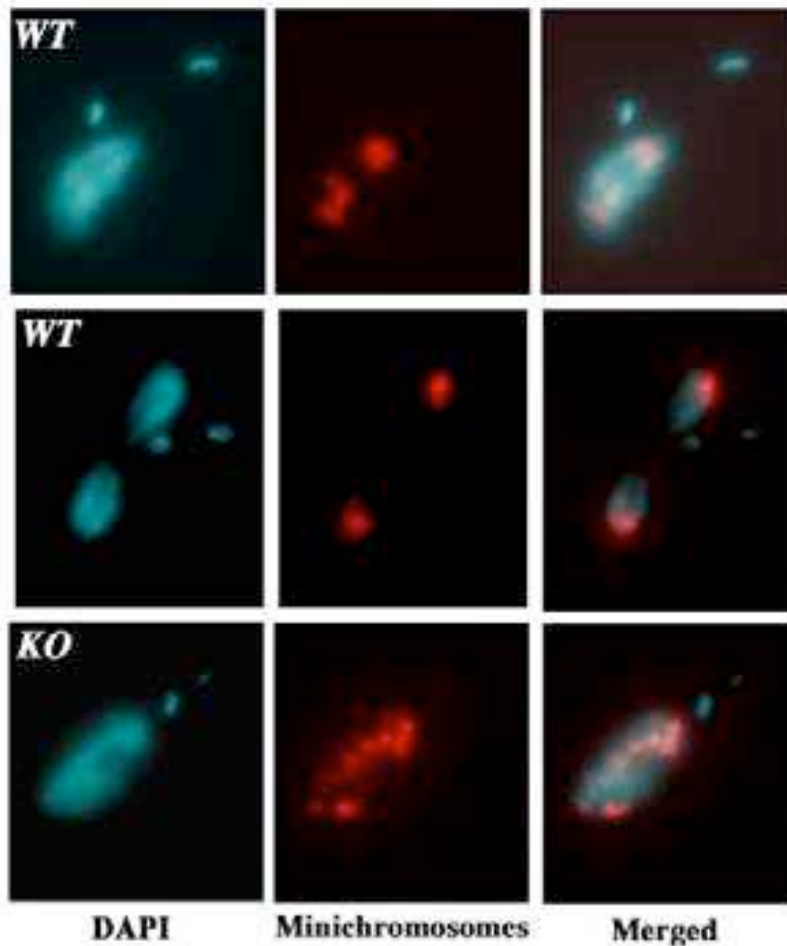


Figure 33

Migration des minichromosomes dans des cellules sauvages (WT) et *TbAGO1*^{-/-} (KO) en mitose.

Hybridation par fluorescence *in situ* (Cy3) des répétitions de 177bp des minichromosomes.

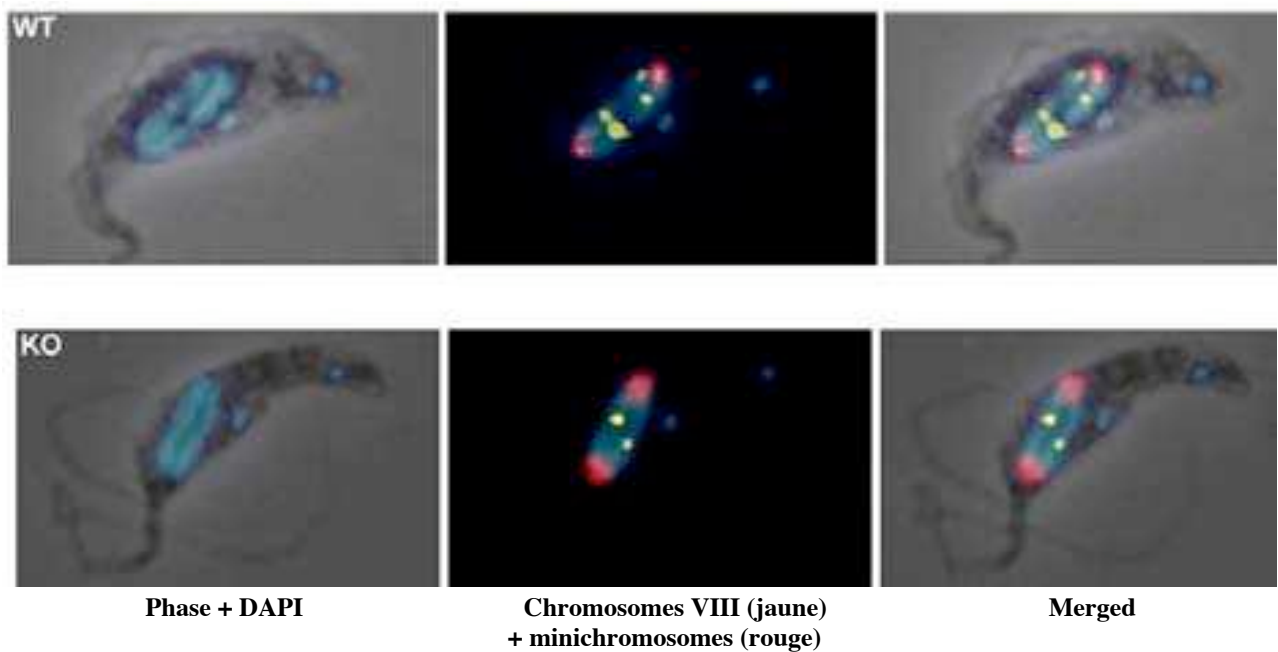


Figure 34

FISH des chromosomes VIII et des minichromosomes chez des cellules sauvages (WT) et *TbAGO1*^{-/-} (KO) en anaphase

Fixation au paraformaldéhyde. En bleu, le marquage au DAPI du noyau et du kinétoplaste. En rouge, le marquage de la région répétitive de 177bp des minichromosomes (Cy3). En jaune, le marquage des gènes 5S rDNA situés sur le chromosome VIII (Alexa 488).

II.C.2.b.4 Localisation des rétroéléments *ingi* dans le génome

Le niveau d'expression des ARN des rétroposons *ingi* est régulé par la protéine TbAGO1 au niveau transcriptionnel chez la lignée *Ytat1.TbAGO1*^{-/-} (Shi et al., 2004b). De plus, plusieurs de nos résultats suggèrent que ces rétroéléments pourraient être contrôlés par la formation de l'hétérochromatine. La condensation des chromosomes en mitose est insuffisante chez *T. brucei* pour observer et déterminer les régions centromériques. À ce jour, aucun centromère n'a pu être identifié. Chez *S. pombe*, on retrouve des siARN provenant de la région centromérique et les mutants incapables d'ARNi ont des phénotypes mitotiques similaires à *TbAGO1*^{-/-}. Nous avons émis l'hypothèse que les rétroposons *ingi* pourraient jouer le rôle d'hétérochromatine centromérique chez *T. brucei* et nous avons regardé la disposition des *ingi* par fluorescence *in situ* (FISH) dans la cellule.

Chez les cellules sauvages en interphase, nous observons un fort marquage par la sonde *ingi* (**figure 35** marqué en vert, partie gauche) illustrant leur répartition dans la plupart de l'ADN (coloré au DAPI). Les éléments sont exclus du territoire occupé par les minichromosomes marqués par FISH (marqué en rouge). Chez les cellules sauvages en mitose précoce (**figure 35** partie droite) et tardive (données non montrées), les minichromosomes se ségrègent et migrent vers les pôles du fuseau. Nous n'observons pas de marquage prépondérant avec la sonde *ingi* au niveau de la position attendue des centromères des grands chromosomes. Ces résultats suggèrent que ces rétroéléments ne jouent pas directement le rôle de centromère. Chez les cellules *TbAGO1*^{-/-} en mitose, à l'exception des défauts mitotiques décrits précédemment, nous n'observons pas de différences significatives avec les cellules sauvages au niveau de la compaction de la chromatine des *ingi* (données non montrées), le profil après marquage est identique à celui de l'ADN.

Toutefois, la superposition des différents marquages suggère qu'il y existe des territoires chromosomiques bien distincts entre les grands chromosomes et les minichromosomes dans les cellules en interphase et en mitose chez *T. brucei*. Ces observations apportent de nouveaux outils pour le marquage des territoires chromosomiques et l'étude du noyau chez *T. brucei*.

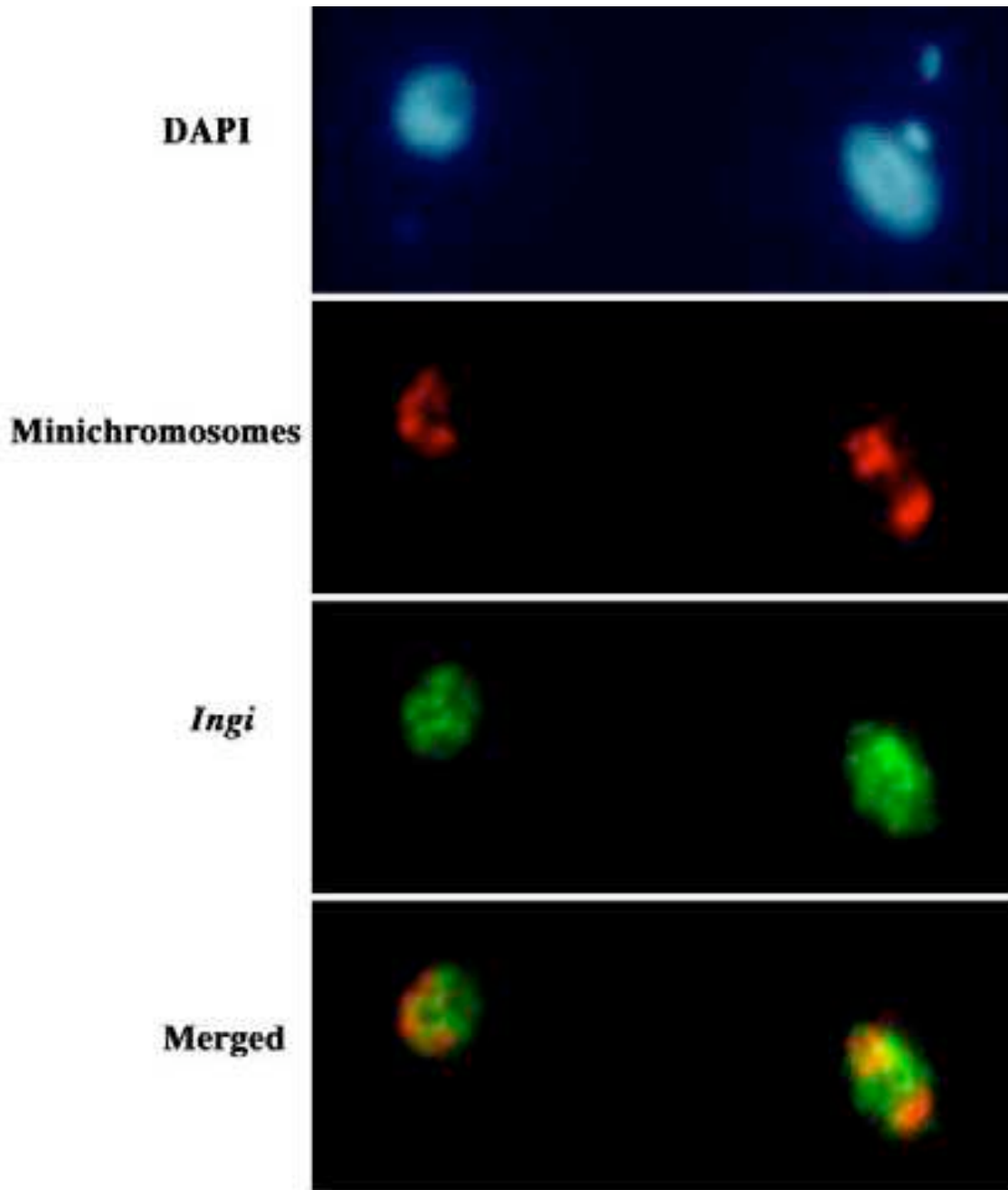


Figure 35

Localisation des rétroposons *ingi* et des minichromosomes sur des cellules sauvages en interphase ou en mitose.

Les cellules sont traitées au paraformaldéhyde 4%. Les rétroposons *ingi* sont marqués à l'aide d'une sonde spécifique avec le dUTPAlexa 488 (vert) et les minichromosomes sont marqués par une sonde spécifique de la répétition palindromique de 177bp avec le dUTPCy3 (rouge). Merged= superposition de la fluorescence des minichromosomes (rouge) et *ingi* (vert). La cellule à gauche est en interphase alors que celle à droite est en mitose.

II.C.2.b.5 Surexpression des éléments *ingi* dans la lignée *TbAGO1*^{-/-}

L'analyse de la lignée *Ytat1.1TbAGO1*^{-/-} démontre une implication de *TbAGO1* dans le contrôle de l'expression des rétroposons (Shi et al., 2004b). Nous avons donc analysé par northern blot l'expression des rétroposons *ingi* dans notre lignée *TbAGO1*^{-/-} générée dans la souche 427 (**figure 36 B**). La lignée sauvage exprime à un niveau faible les rétroposons *ingi* montrant plusieurs bandes. Notre lignée mutante montre une surexpression des transcrits *ingi*. Le même phénomène est observé pour le rétrotransposon site-spécifique SLACS (**figure 36 C**). Ces résultats démontrent que la délétion de *TbAGO1*, accompagnée de la perte d'activité ARNi, entraîne une dérégulation de l'expression des rétroposons, quelle que soit la souche étudiée. Ceci pourrait donc entraîner une augmentation de la fréquence de rétrotransposition, comme c'est observé chez d'autres espèces (Ketting et al., 1999; Wu-Scharf et al., 2000). Cette situation pourrait expliquer certains défauts mitotiques au cas où l'insertion incontrôlée de rétroposons entraînerait des cassures de chromosomes ou la mutation de gènes.

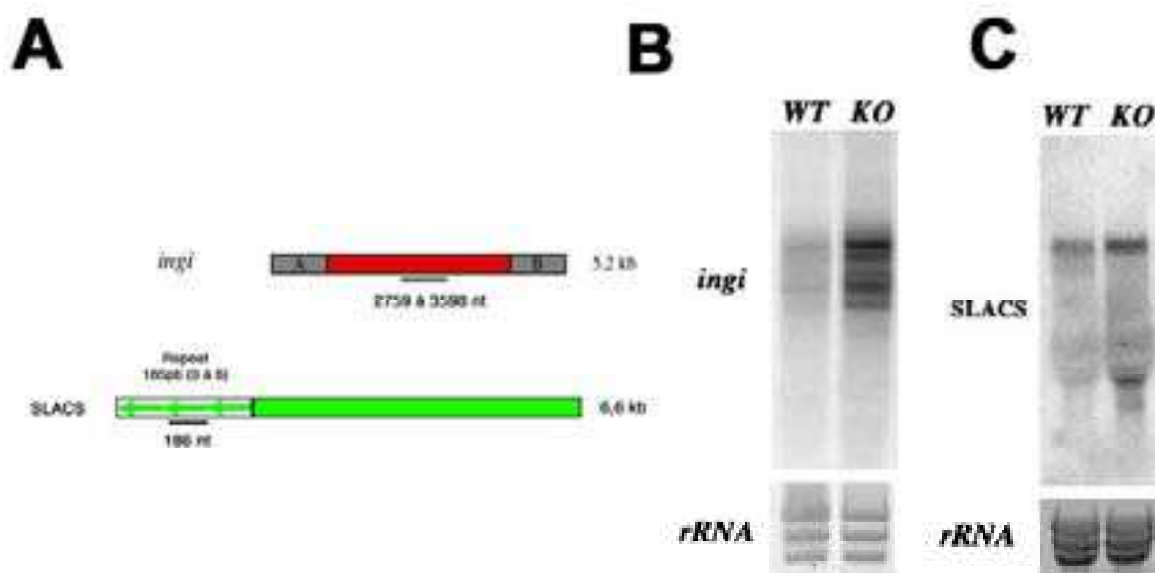


Figure 36

La délétion de *TbAGO1* chez la souche 427 entraîne une surexpression des rétroposons *ingi* et SLACS

A/ Représentation schématique des éléments *ingi* et SLACS et des sondes utilisés B/ Détection des transcrits *ingi* C/ Détection des transcrits SLACS.

Les sondes *ingi* et SLACS ont été marquées par random priming. Dépot 10 μ g d'ARN totaux par puits pour *ingi* et 30 μ g pour SLACS. WT: cellules sauvages; KO: cellules *TbAGO1*^{-/-}. rRNA: ARN ribosomiques visualisés au BET. Migration sur gel 1% agarose/formaldehyde MAE1x.

II.C.2.b.6 Analyse de la mobilité des rétroposons chez la lignée *TbAGO1*^{-/-}

La surexpression des rétroéléments *ingi* chez la lignée *TbAGO1*^{-/-} est-elle associée à une augmentation de leur activité de rétrotransposition et leur réintégration dans le génome ? Pour détecter d'éventuelles modifications du génome, les lignées sauvage et *TbAGO1*^{-/-} ont été maintenues plusieurs mois en culture continue. Si l'activité de rétrotransposition augmente, celle-ci devrait pouvoir se manifester au niveau de l'abondance et la localisation d'*ingi* dans l'ADN.

La lignée *TbAGO1*^{-/-} maintenue en culture a été renommée *TbAGO1*^{-/-*}. Deux analyses ont été effectuées pour détecter *ingi* par Southern blot et par PCR pour détecter les éléments RIME. Pour la première analyse, nous avons utilisé une sonde spécifique de l'élément *ingi* pour marquer l'ADN génomique des lignées *WT* et *TbAGO1*^{-/-*} digéré par différentes enzymes de restriction (*Sph*I et *Bam*HI)(Murphy et al., 1987). Les résultats du Southern Blot (**figure 37**) ne révèlent pas de différences significatives entre les profils d'hybridation des deux lignées et suggèrent qu'il n'y a pas eu de modification majeure des éléments *ingi* suite à leur surexpression.

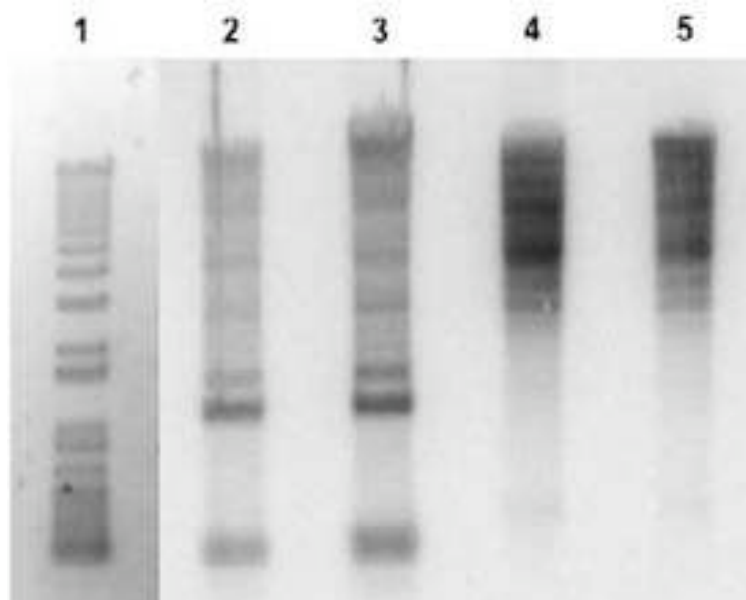


Figure 37

Southern blot par la sonde *ingi* (1-1402nt) sur l'ADN génomique des cellules sauvages et *TbAGO1*^{-/-*}

(1) 1kb+ ladder coloré au bromure d'éthydiu (BET) (2 & 4) ADN génomique de cellules sauvages digéré respectivement par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Sph*I. (3 & 5) ADN génomique de *TbAGO1*^{-/-*} digéré respectivement par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Sph*I.

Pour confirmer les observations obtenues par Southern blot, nous avons utilisé la MGE-PCR (Mobile Genetic Element-PCR), technique plus sensible employée avec succès pour différencier les souches de *T. brucei* sur le terrain (**figure 38**) (Terry et al., 2001; Tilley et al., 2003). Révélée par gel d'agarose, la MGE-PCR permet d'apposer une « empreinte » fiable des éléments RIME d'un génome. Notre analyse par MGE-PCR confirme nos résultats précédents et démontrent un profil similaire entre la souche sauvage et *TbAGO1*^{-/-}* (**figure 39**).

En conclusion, la culture des lignées *TbAGO1*^{-/-}* pendant plusieurs mois n'a pas permis de détecter des modifications majeures par Southern blot et MGE-PCR et suggère qu'il n'y a eu que peu ou pas de nouvelles intégrations des rétroéléments *ingi* et RIME dans le génome. Ces résultats indiquent que la surexpression des éléments *ingi* n'induit pas de mobilisation massive des rétroposons *ingi*/RIME et suggèrent qu'ils ne seraient pas directement responsables des défauts de mitose et de ségrégation initialement observés dans les cellules *TbAGO1*^{-/-}.

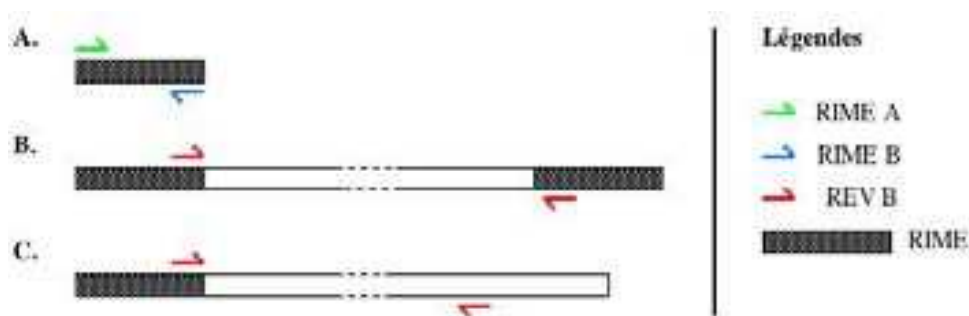


Figure 38

Mode d'amplification des amorces RIME A, RIME et REV B.

A.) Information sur la longueur du polymorphisme par amplification des fragments contenue dans la répétition des éléments. L'amorce REV B s'apparie aux séquences inversées au début et à la fin du rétroélément

(B.) Information sur les variations de position par amplification des éléments d'ADN flanquants entre les éléments. L'amorce REV B s'apparie sur les répétitions homologues ou deux éléments différents.

(C.) Information sur les variations de position par amplification de l'ADN adjacent. L'amorce s'apparie aux répétitions mais peut sous des conditions permissives s'apparier à l'ADN flaqueant.

(adaptée de Terry et al. IJP 01 et Tilley et al. Exp. Parasitology 2003)

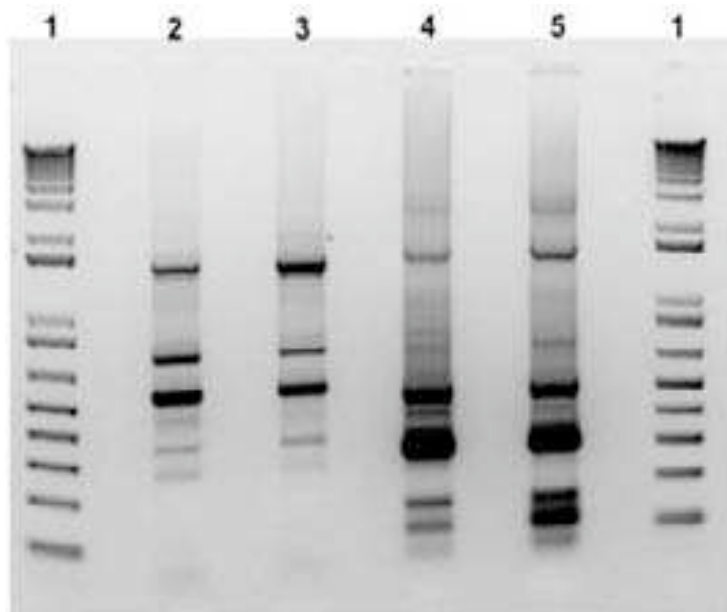


Figure 39

La lignée *TbAGO1-/- ne révèle pas de mouvement des rétroposons RIME dans le génome.**

MGE-PCR analysée sur gel d'agarose 0.8% coloré au bromure d'éthidium. (1) 1kb+ ladder; (2) et (3) Produits d'amplification de l'ADN génomique des lignées sauvages et de *TbAGO1-/-** par les amorces RIME A/B (4) et (5) Produits d'amplification de l'ADN génomique des lignées sauvages et de *TbAGO1-/-** par l'amorce RevB

II.C.2.b.7 Adaptation des cellules *TbAGO1-/-**

Au cours de ces expériences, nous avons constaté que la croissance de la lignée *TbAGO1-/-** s'est progressivement améliorée, pour parvenir à un temps de doublement d'environ 10h alors que celui des cellules *TbAGO1-/-* d'origine est de 16h (Durand-Dubief and Bastin, 2003). Nous avons analysé par immunofluorescence au moyen d'anticorps anti-tubuline et par coloration de l'ADN au DAPI le comportement de ces cellules. En grande majorité, les cellules *TbAGO1-/-** sont à nouveau capables d'assembler un fuseau mitotique normal, se traduisant par une mitose normale. Moins de 5% des cellules *TbAGO1-/-** présentent un fuseau mitotique aberrant au contraire des cellules *TbAGO1-/-* d'origine (près de la moitié de fuseaux aberrants)(Durand-Dubief and Bastin, 2003). Ces résultats suggèrent une adaptation de la lignée *TbAGO1-/-** et une compensation progressive des défauts mitotiques.

Nos observations précédentes ont montré qu'il n'existe pas une forte mobilité des rétroposons *ingi*/RIME dans le génome. Si la surexpression des rétroéléments était responsable des problèmes de croissance, il est plausible qu'elle est à nouveau contrôlée par un autre mécanisme. Nous avons donc analysé l'expression des éléments *ingi* chez les cellules de la lignée *TbAGO1-/-**.

II.C.2.b.8 La lignée *TbAGO1*^{-/-*} surexprime toujours les rétroposons *ingi*

L'analyse par northern blot de l'expression des transcrits *ingi* montre que la lignée *TbAGO1*^{-/-*} n'a pas réprimé la surexpression des rétroposons (**figure 40**). Au contraire, nous observons même une surexpression supérieure des rétroéléments à la lignée *TbAGO1*^{-/-} d'origine qui présentait les problèmes au niveau de la mitose. De plus, des transcrits de taille inférieure sont détectés. Ces résultats démontrent que la lignée *TbAGO1*^{-/-*} s'est adaptée à l'absence de la protéine TbAGO1 pour effectuer à nouveau une mitose normale mais sans réprimer l'expression des rétrotransposons *ingi*. Ce résultat démontre que la surexpression des rétroposons *ingi* et les défauts mitotiques observés chez le mutant *TbAGO1*^{-/-} d'origine ne sont pas directement liés.

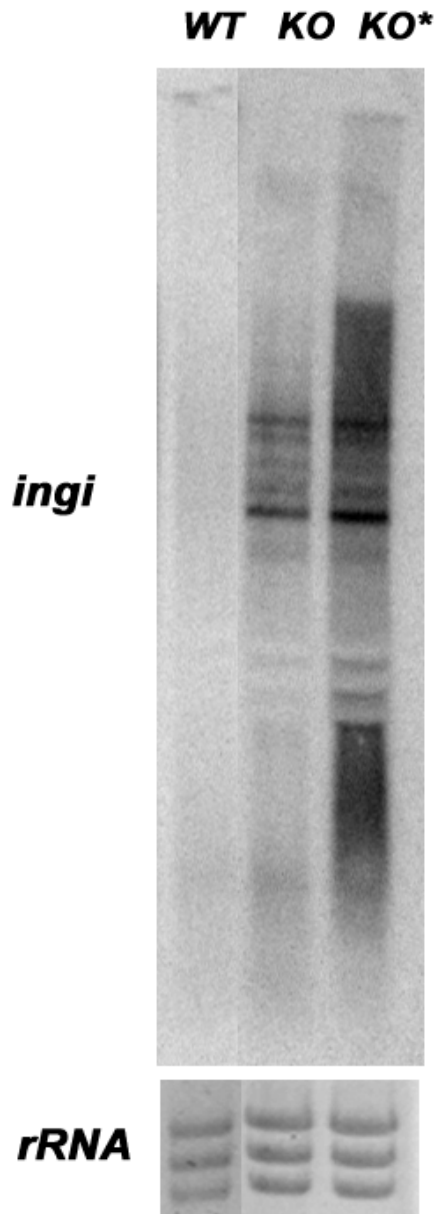


Figure 40

Les mutants *TbAGO1*^{-/-*} surexpriment toujours les rétroposons *ingi*.

Northern blot sur des extraits d'ARN totaux sur les lignées sauvage (*WT*), *TbAGO1*^{-/-} (*KO*) et *TbAGO1*^{-/-*} (*KO**). rRNA : ARN ribosomiques colorés au bromure d'éthidium. Échantillon : 10 μ g d'extraits d'ARN totaux par puits. La sonde *ingi* est faite par random priming et est spécifique de la région +2759-+3598 de la séquence du rétroposon *ingi*.

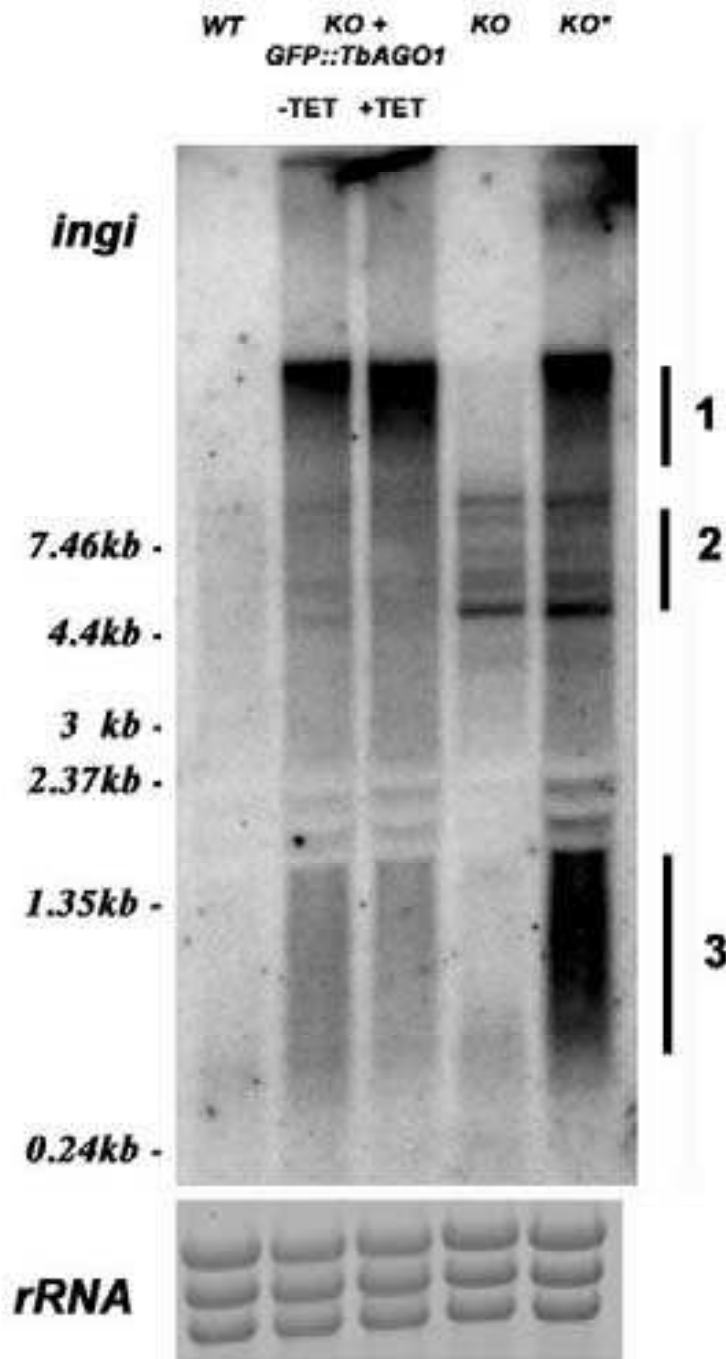


Figure 41

Détection des transcrits *ingi* chez les différentes lignées.

Cellules sauvages (*WT*), cellules *TbAGO1*^{-/-} (*KO*), rRNA: ARN ribosomiques. Northern blot sur des extraits d'ARN totaux sur les lignées 10µg/ puits. La sonde *ingi* est faite par random priming et est spécifique de la région +2759-+3598 de la séquence du rétroposon *ingi*. A gauche de l'image sont indiquées les tailles données par le marqueur.

II.C.2.b.9 Modification du profil d'expression des rétroéléments dépendants de TbAGO1

Nous avons utilisé la lignée inductible *TbAGO1*^{-/-}+*GFP::TbAGO1Ti* (*KO*+*GFP::TbAGO1Ti*) capable d'exprimer en présence de tétracycline la protéine fonctionnelle TbAGO1 couplée à la GFP (Green Fluorescent Protein) en restaurant l'ARNi. En absence de la protéine recombinante, nous observons des défauts mitotiques similaires à la lignée *TbAGO1*^{-/-} originale et une absence de réponse à l'ARNdb (Durand-Dubief and Bastin, 2003). Ces cellules sont cultivées en permanence en présence de tétracycline. Pour cette expérience, les cellules sont désinduites pendant 72h. Cette lignée a été obtenue après transformation du mutant *TbAGO1*^{-/-} d'abord par un plasmide exprimant *GFP::TbAGO1*, puis par un second vecteur exprimant le répresseur TET (en présence de tétracycline). Après lavage de la tétracycline, la quantité de protéine *GFP::TbAGO1* chute et nous avons donc comparé le profil d'expression de transcrits *ingi* dans la lignée *TbAGO1*^{-/-}+*GFP::TbAGO1Ti* cultivée en conditions induites (ARNi fonctionnelle), ou non induites (ARNi inactive), et en parallèle les lignées sauvage, *TbAGO1*^{-/-} d'origine et *TbAGO1*^{-/-} * adaptée à la culture. Nous remarquons d'abord que l'expression de certains transcrits est diminuée lorsque la protéine *GFP::TbAGO1* est exprimée (**figure 41**, bande **2**). Ces mêmes transcrits sont abondants dans les lignées *TbAGO1*^{-/-}. Toutefois, plusieurs transcrits de grande taille ainsi que ceux aux alentours de 1kb sont abondants dans les échantillons de la lignée inductible (avec ou sans *GFP::TbAGO1*) comme dans la lignée *TbAGO1*^{-/-}* (**figure 41**, bandes **1** et **3**).

Curieusement, ces transcrits sont absents de la lignée *TbAGO1*^{-/-} d'origine, ce qui indiquerait des dérives irréversibles dans leur expression. Celles-ci pourraient être dues à des modifications épigénétiques irréversibles (Garnier et al., 2004; Matzke et al., 2004) ou à des modifications au niveau chromosomique (déplacement dans des zones non sensibles à l'ARNi).

Chez la lignée *TbAGO1*^{-/-*}, nous montrons donc que les cellules *TbAGO1*^{-/-} surexpriment des rétroposons *ingi*. En maintenant les cellules *TbAGO1*^{-/-} en culture plusieurs mois, nous avons obtenu la lignée *TbAGO1*^{-/-*} qui surexprime encore les transcrits *ingi* mais n'induit pas de modifications majeures de l'organisation du génome. De plus, les cellules *TbAGO1*^{-/-*} se divisent à nouveau normalement et sont capables de faire un fuseau mitotique normal. Ces résultats démontrent qu'il n'existe pas de relation directe entre la surexpression des rétroéléments *ingi* et les défauts observés lors de la mitose chez la lignée *TbAGO1*^{-/-} d'origine.

Résultats

4^{ème} partie :

Interactions

machinerie ARN*i*

et rétroposons

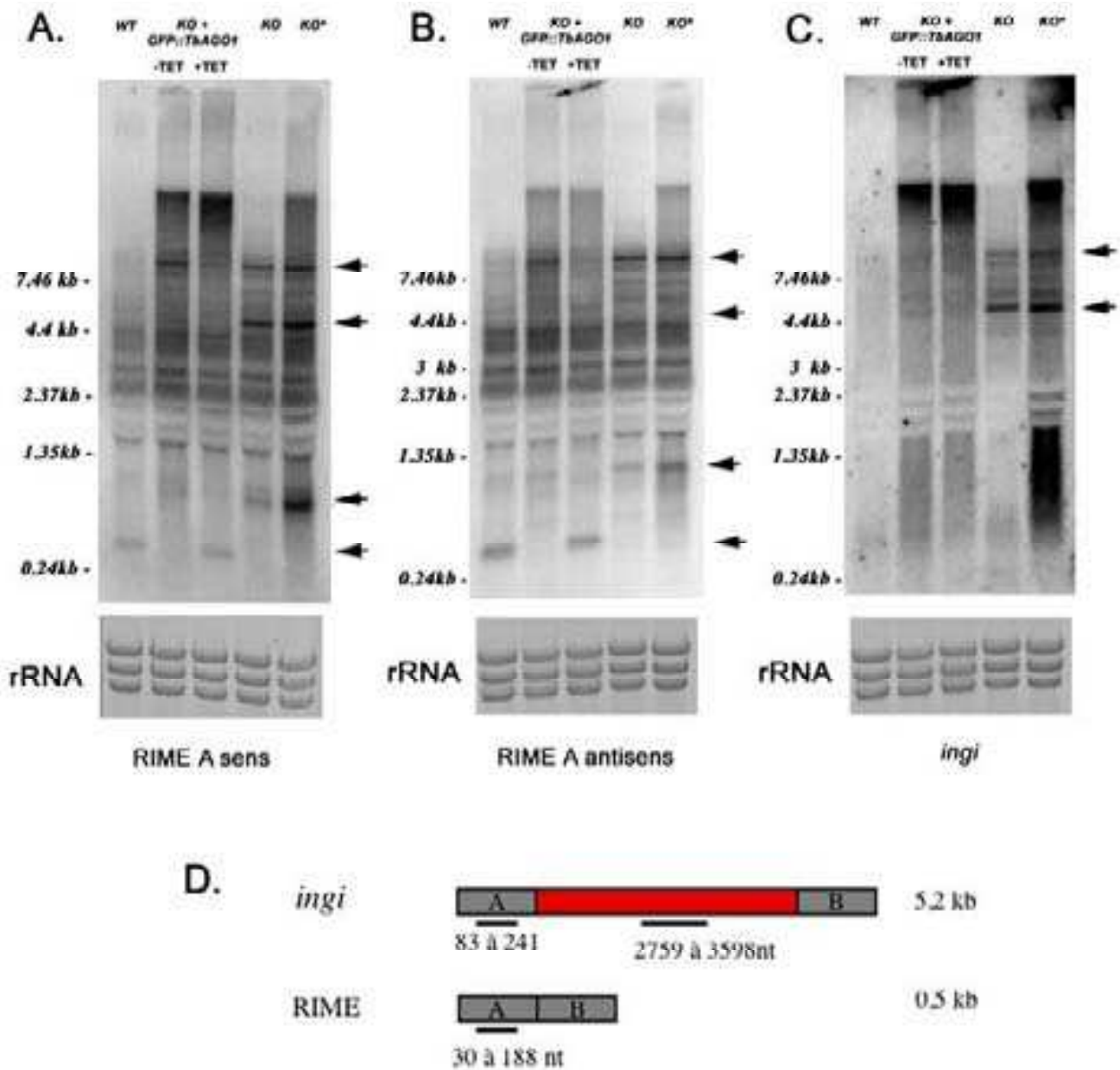


Figure 42 Détection des RIME A et *ingi* par northern blot

A/ Détection des transcrits des RIME A sens B/ Détection des transcrits RIME A antisens. C/ Détection des transcrits *ingi*. D/ Position des sondes spécifiques dans les séquences des rétroposons *ingi* et RIME. 10µg d'ARN totaux par puits. Les sondes sens et antisens RIME A (ADN) ont été synthétisées par la Klenow. La sonde *ingi* a été effectuée par random priming.

II.D Interactions machinerie ARNi et rétroposons

Dans cette partie, nous avons cherché à comprendre comment les rétroposons RIME, *ingi* et SLACS pourraient être régulés par l'ARNi. Pour ce faire, nous avons tenté d'établir les effets de l'ARN interférence sur l'expression génétique.

II.D.1. L'absence de TbAGO1 affecte le profil d'expression des rétroposons RIME

Nos travaux précédents ont montré que l'absence de TbAGO1 chez les lignées *TbAGO1*^{-/-} et *TbAGO1*^{-/-*} génère une surexpression des transcrits *ingi*. Toutefois, ces transcrits présentent des tailles très variables et ne sont pas soumis à des régulations identiques. Vu la diversité de ces éléments (truncations, différentes insertions)(Bringaud et al., 2004), nous avons voulu préciser ces résultats en analysant des éléments RIME, généralement associés au *ingi* (**figure 42 D**). Chez les cellules sauvages, *TbAGO1*^{-/-}, *TbAGO1*^{-/-+GFP::TbAGOITi} induites et non induites, l'analyse révèle une diversité de transcrits ayant une grande gamme de taille (~0,5 à 7,5kb) aussi bien avec la sonde sens que antisens (**figure 42 A et B**). Chez les lignées mutantes, un type de transcrit sens d'environ 0,5kb n'est plus détecté mais est à nouveau exprimé en présence de TbAGO1 chez *TbAGO1*^{-/-+GFP::TbAGOITi} induit (flèche **figure 42 A**). A l'inverse, trois autres classes de transcrits sens d'environ 8kb, 5kb, et 1kb sont détectés chez *TbAGO1*^{-/-}, *TbAGO1*^{-/-*} et plus faiblement chez *TbAGO1*^{-/-+GFP::TbAGOITi} non induites (flèches **figure 42 A**). D'autres transcrits sont également présents et semblent être exprimés de façon similaires à la lignée sauvage et *TbAGO1*^{-/-+GFP::TbAGOITi} induites (**figure 42 A**). La sonde sens de RIME A détecte également une grande population de transcrits antisens dont certains pourraient être communs, d'après leurs tailles et d'autres semblent être spécifiques en fonction de l'activité ARNi (**figure 42 B**). En conclusion, cette expérience démontre que l'expression de certains transcrits RIME A est réprimée en présence du mécanisme ARNi ce qui suggère qu'ils pourraient être des produits de dégradation d'ARN plus grands. De plus, nous pouvons remarquer que le profil de l'ensemble des transcrits de grande taille surexprimé chez les cellules ne faisant pas l'ARNi ressemble au profil des transcrits *ingi* contenant également la séquence RIME A (**figure 42 C**). Une bande « commune » de transcrits d'environ 5 kb pourrait correspondre à la taille attendue de l'élément entier *ingi* (5,2kb).

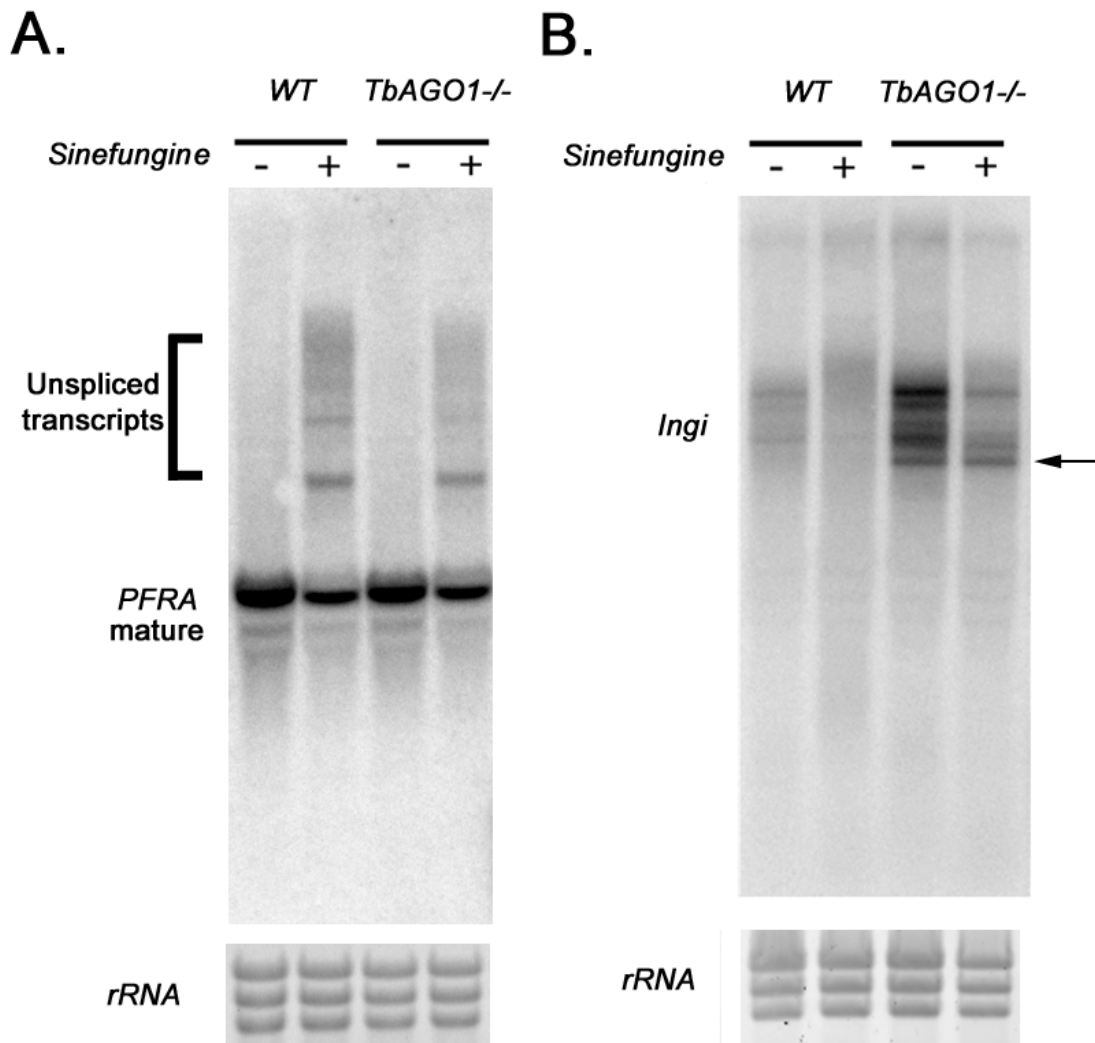


Figure 43

Certains transcrits *ingi* sont peu sensibles à la sinéfungine

- A. Contrôle : Détection des transcrits mature et immature de *PFRA* en présence ou non de sinéfungine.** En présence de sinéfungine, les ARN polycistroniques ne sont plus épissés et s'accumulent dans le noyau, avec une réduction concomitante de l'ARN mature.
- B. Détection des transcrits *ingi* en présence ou non de sinéfungine.** La flèche indique un type de transcrits insensible à la sinéfungine ayant une taille d'environ 5 kb.

Les sondes ont été marquées par la technique de Random priming. Les cellules traitées ont été incubées avec 2µg/ml de sinéfungine dans le milieu de culture pendant 90minutes. Dépôt : 10µg d'ARN totaux par puits.

II.D.2. Les rétroposons *ingi* produisent deux classes de transcrits

Nos résultats précédents illustrent la grande diversité de transcrits *ingi/RIME* qui reflète leur hétérogénéité dans le génome (Bringaud et al., 2004). Ces observations suggèrent que les rétroposons pourraient être soumis à différents types de régulation, peut-être aussi en fonction de leur site d'insertion. Afin d'approfondir cette hypothèse, nous avons analysé les conséquences de la présence d'un inhibiteur du *trans* épissage, la sinéfungine, sur l'expression des transcrits *ingi*.

Chez les cellules sauvages et *TbAGO1*^{-/-}, nous avons d'abord effectué un contrôle pour vérifier l'inhibition du *trans* épissage dans nos cellules en suivant par northern blot l'expression de *PFRA*. En absence de sinéfungine, les deux lignées expriment normalement l'ARNm de *PFRA* et les transcrits d'ARN polycistroniques ne sont pas détectés, vu l'efficacité du *trans* épissage (**figure 43 A**). L'incubation des cellules pendant 90 minutes avec 2µg/ml de sinéfungine induit l'accumulation des pré-ARNm non épissés de *PFRA* chez les deux lignées ; ce phénomène affecte inévitablement la production des ARNm matures de *PFRA*, mais n'affecte pas l'expression d'ARN indépendant du *trans* épissage comme les ARN ribosomiques (**figure 43 A**). Après avoir vérifié l'action de la sinéfungine, nous avons analysé les conséquences de l'inhibition du *trans* épissage sur l'expression des *ingi* des lignées sauvage et *TbAGO1*^{-/-}. Les cellules sauvages non traitées expriment faiblement les transcrits *ingi* et en présence de la sinéfungine leur expression est affectée avec l'apparition d'un « nuage » de transcrits de plus grande taille (**figure 43 B**). Ceci suggère que certains transcrits *ingi* pourraient être épissés. Cette observation est confirmée chez les cellules *TbAGO1*^{-/-}, où la sinéfungine affecte l'expression de la majorité des transcrits *ingi* surexprimés. Cependant, certains transcrits *ingi* d'environ 5kb sont insensibles à la présence de l'inhibiteur (flèche, **figure 43 A**) indiquant qu'ils ne passent pas par la voie de *trans* épissage. Nos résultats suggèrent donc qu'il existe deux classes de transcrit *ingi*. La première classe, sensible à la sinéfungine, serait maturée par *trans* épissage. L'analyse de la disposition des *ingi* dans le génome montre que cette classe de transcrits pourrait correspondre à la transcription de gène/pseudogène ayant intégré ce rétroposon. La seconde famille, de taille d'environ 5kb (flèche **figure 43 B**), serait indépendante de ce mécanisme et pourrait correspondre à l'élément *ingi* intact ne possédant pas de signaux pour le *trans* épissage.

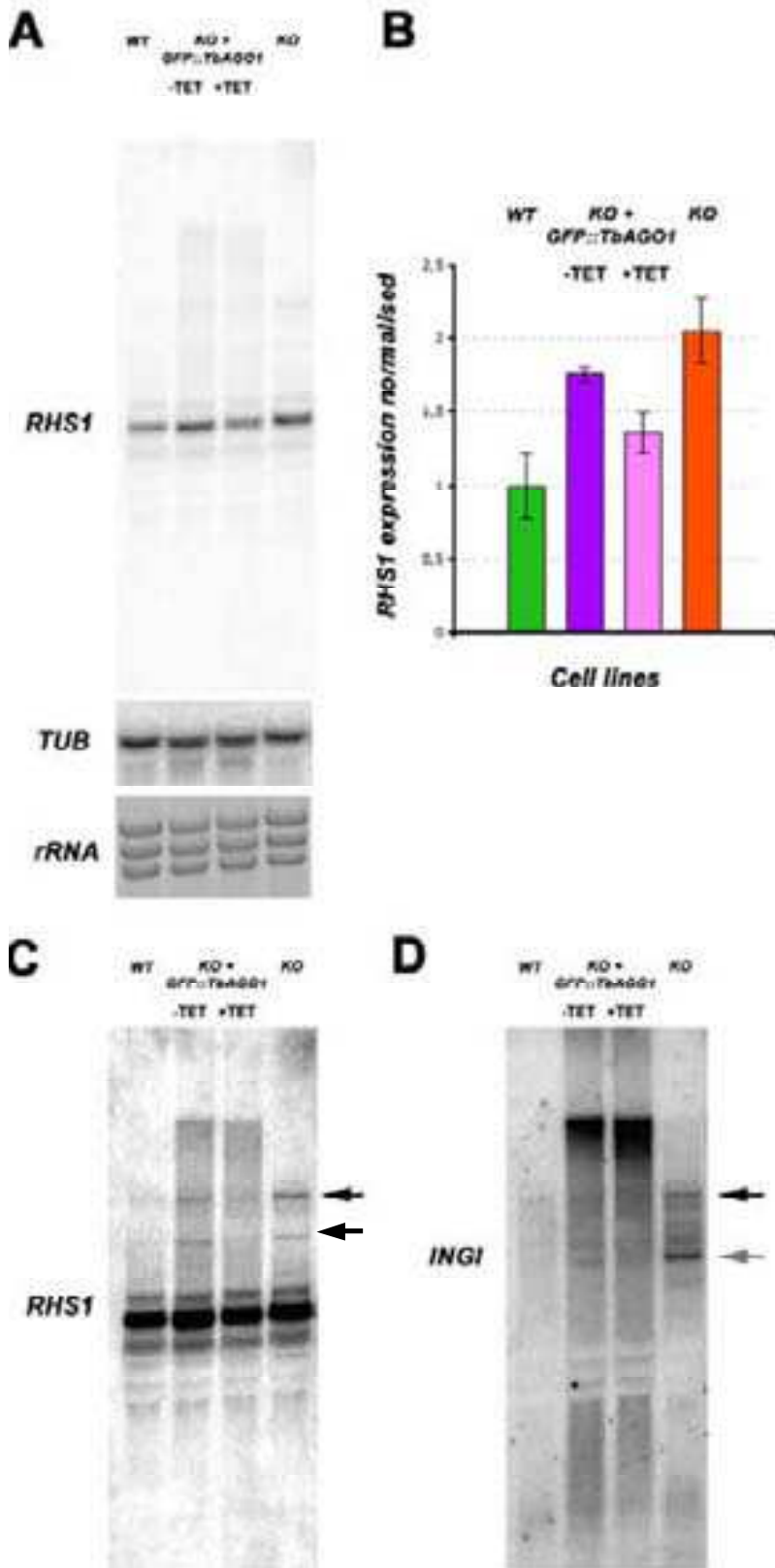


Figure 44

Les transcrits *RHS1* sont surexprimés en absence d'ARNi

A/ Analyse des transcrits *RHS1* par northern blot.

B/ Quantification de l'expression des *RHS1* chez les différentes lignées.

C/ Surexposition de la membrane marquée avec *RHS1*.

D/ Détection des transcrits *ingi* sur la même membrane.

La quantification des mêmes échantillons a été effectuée sur 3 membranes différentes avec le logiciel ImageQuant. Dépôt de 10µg d'ARN totaux par puit. Les sondes ont été marquées par random priming. La sonde *RHS1* marque la séquence codante (+1521 à +2050).

II.D.3. *TbAGO1* contrôle l'expression des gènes *RHS1*

Les *RHS* sont une grande famille de gènes qui est divisée en six groupes, de *RHS1* à *RHS6*. Les gènes *RHS1*, au nombre de 28 copies par génome haploïde chez *T. brucei*, possèdent fréquemment les éléments *ingi*/RIME insérés dans leurs séquences formant ainsi des pseudogènes (Bringaud et al., 2002). Vu les régulations auxquelles sont soumises les rétroéléments, nous avons donc analysé l'expression du gène *RHS1* par northern blot.

La lignée sauvage exprime des transcrits de *RHS1* correspondant à la taille attendue d'environ 3kb (**figure 44 A**)(Bringaud et al., 2002). Cependant, les cellules *TbAGO1*^{-/-}, montrent une augmentation sensible de l'abondance des transcrits de *RHS1* par rapport à la lignée sauvage suggérant que l'ARNi régule l'expression de ces transcrits.

Pour établir la spécificité de ces résultats, nous avons utilisé la lignée inductible *TbAGO1*^{-/-}+*GFP::TbAGO1Ti*. Les cellules *TbAGO1*^{-/-}+*GFP::TbAGO1Ti* induites expriment les ARNm *RHS1* au même niveau que la lignée sauvage. Par contre, en absence de tétracycline (ARNi non fonctionnelle), les cellules *TbAGO1*^{-/-}+*GFP::TbAGO1Ti* présentent un niveau d'ARNm *RHS1* équivalent au *TbAGO1*^{-/-} (**figure 44 A**). La normalisation des transcrits *RHS1* par l'ARNm du gène codant l'alpha tubuline montre qu'en absence de *TbAGO1*, la quantité des ARNm de *RHS1* est environ deux fois supérieure, par rapport aux cellules exprimant la protéine *TbAGO1* normale ou chimérique (**figure 44 A**).

L'exposition prolongée de la membrane hybridée avec la sonde *RHS1* révèle d'autres transcrits *RHS1* de grande taille (environ 4,5 et 8kb) pouvant correspondre à des pseudogènes *RHS1* ayant intégré des fragments complets ou incomplets de *ingi* ou plusieurs RIME (Bringaud et al., 2002)(**figure 44 C et D**). Il est troublant d'observer que certaines bandes présentent une mobilité semblable à celle détectée par la sonde *ingi* (ou RIME A, **figure 42**)

En conclusion, ces résultats démontrent que la présence de la protéine *TbAGO1* contrôle l'abondance des ARNm *RHS1*. Le mode exact de cette régulation demeure inconnu mais la présence fréquente des *ingi*/RIME insérés ou localisés au niveau des gènes *RHS1* dans le génome, suggère l'implication des *ingi*/RIME contrôlés par ARNi dans le contrôle de l'expression des ARNm *RHS1*.

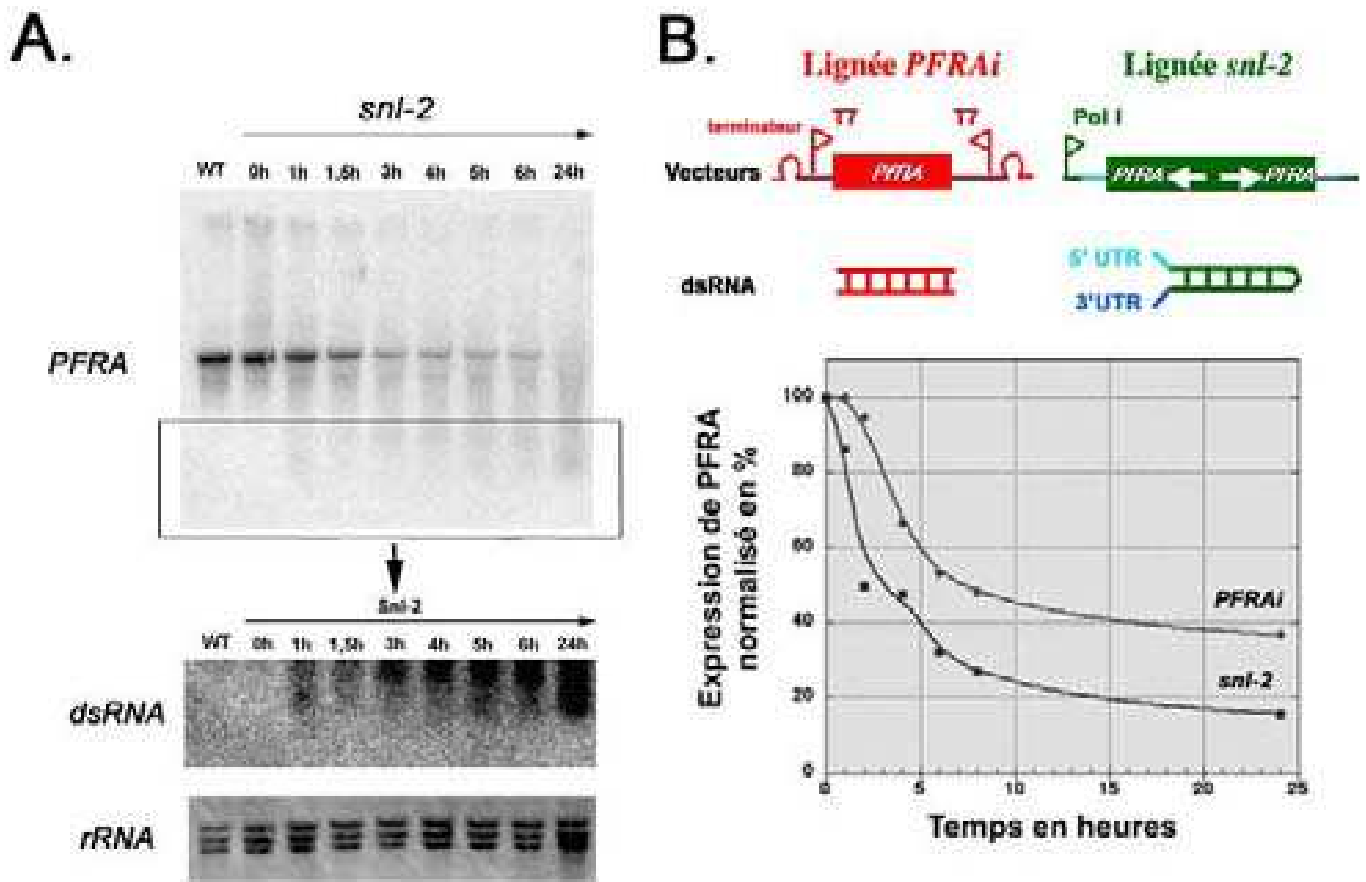


Figure 45

Cinétique de dégradation des ARNm de *PFRA* chez les lignées *snl-2* et *PFRAi*

A/ Détection des transcrits *PFRA* chez *snl-2* (exprimant l'ARNdb de *PFRA* en épingle à cheveux avec les signaux d'épissage, SL et polyA), non induites et induites analysés à différents temps. B/ Quantification de l'expression de l'ARNm de *PFRA* chez les lignées *snl-2* et *PFRAi*.

Induction à la tétracycline (1µg/ml) dans le milieu de culture. Pour la quantification, la membrane marquée par la sonde *PFRA*, a été réhybridée avec une sonde spécifique de l'alpha-tubuline (voir Durand-Dubief et al. 2003). L'expérience a été reproduite deux fois. Dépôt : 5µg d'extraits ARN totaux par puit.

II.D.4. Extinction par ARN interférence dans le noyau

L'ARNdb et la machinerie ARNi sont impliqués dans la formation d'hétérochromatine chez plusieurs organismes, soit par modification des histones (Hall et al., 2003a; Volpe et al., 2002) soit par méthylation de l'ADN. Les modifications épigénétiques provoquent l'arrêt de la transcription ('Transcriptional gene Silencing', TGS) (Matzke et al., 2004; Schramke and Allshire, 2003). Chez la levure, l'expression d'ARNdb en épingle à cheveux induit la formation d'hétérochromatine au niveau de l'ADN (Schramke and Allshire, 2003).

Chez le trypanosome, l'ARN interférence pourrait induire un mécanisme similaire dans le noyau, cependant l'absence d'intron et de marqueur de l'hétérochromatine connu limite la caractérisation d'un tel phénomène. L'existence de cette voie d'extinction a déjà été suggérée par expression d'ARNdb de petits ARN nucléolaires (Liang et al., 2003b), et elle est suggérée sur les rétroposons *ingi* et SLACS (Shi et al., 2004). Afin de déterminer l'existence d'un mécanisme d'extinction par ARNi dans le noyau chez *T. brucei*, nous avons donc poursuivi cette étude.

Nous avons d'abord étudié les deux lignées *PFRAi* et *snl-2* exprimant de façon inductible l'ARNdb du gène marqueur *PFRA* (Bastin et al., 2000; Durand-Dubief and Bastin, 2003). En présence de tétracycline, les lignées *PFRAi* et *snl-2* induites expriment respectivement de l'ARNdb inter-, ou intramoléculaire de *PFRA* et dégradent les ARNm matures de *PFRA*. Seul l'ARNdb produit par la lignée *snl-2* possède les signaux de *trans* épissage et est épissé correctement (Résultats partie ARNi et génomique fonctionnelle)(Durand-Dubief et al., 2003). La cinétique de dégradation de l'ARNm de *PFRA* par l'ARNdb chez la lignée *snl-2*, après induction à la tétracycline, montre que l'ARNm de *PFRA* est progressivement dégradé au cours du temps en produisant des fragments d'ARN de *PFRA* (**figure 45 A**).

Chez les deux lignées induites, la vitesse d'extinction de l'ARNm de *PFRA* est différente avec une dégradation plus efficace et plus rapide chez *snl-2* (15% ARNm résiduel) que chez *PFRAi* (~30% résiduel)(**figure 45 B**).

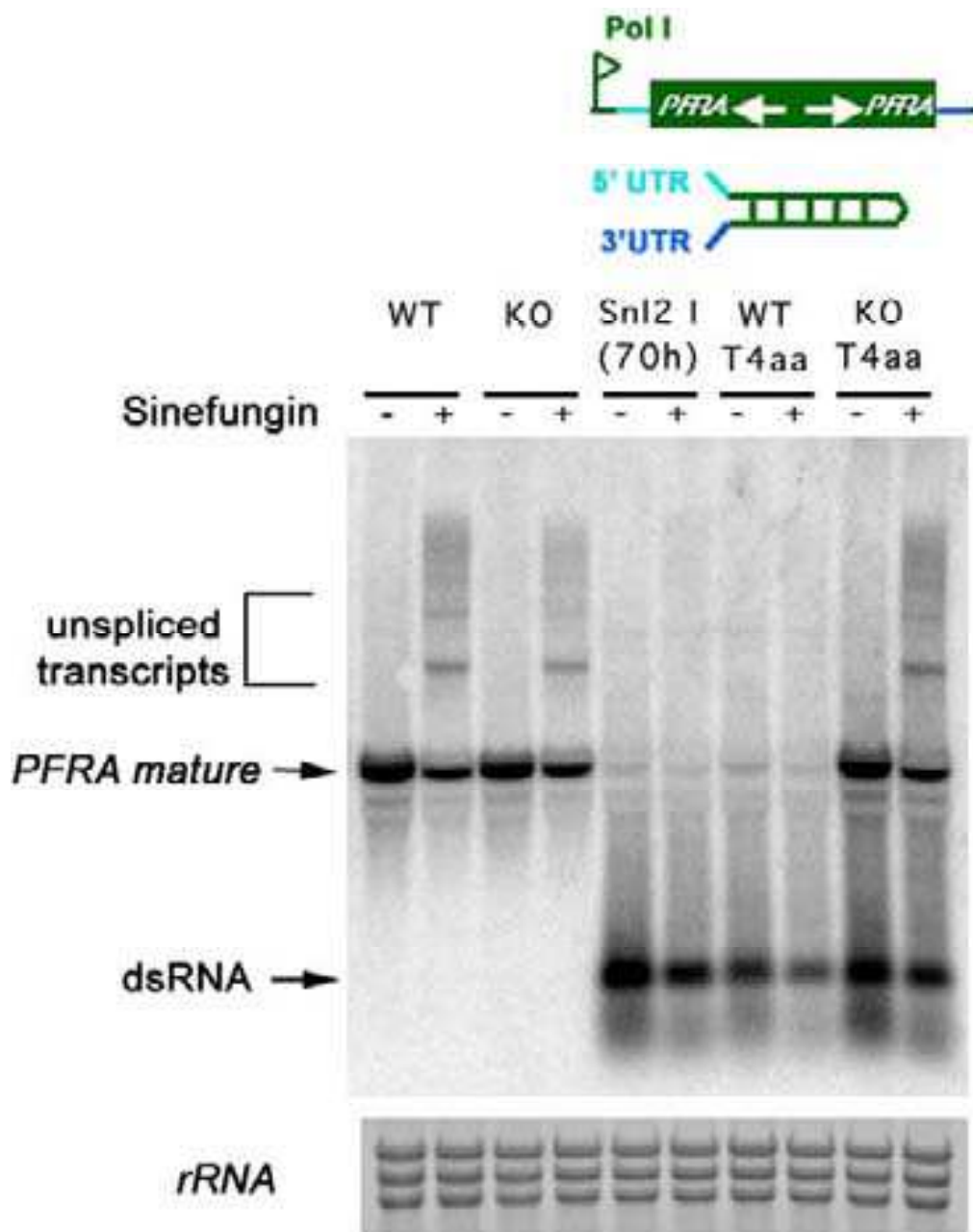


Figure 45

L'ARNdb induit un mécanisme d'extinction dans le noyau

Northern blot avec hybridation de la sonde *PFRA* des lignées sauvage (WT), *TbAGO1*^{-/-}(KO), *snl2* induite, *WTT4aa* et *KOT4aa* ont été analysées en présence ou non de sinéfungine. Les ARNm matures et leurs précurseurs non épissés sont visibles « unspliced transcripts ». Les cellules traitées ont été incubées avec 2µg/ml de sinéfungine dans le milieu de culture pendant 90minutes avant extraction d'ARN. Dépôt : 10µg d'ARN totaux par puits. La sonde *PFRA* a été marquée par la technique de « random priming ».

L'expression d'ARNdb intra- ou intermoléculaire conduit donc à une extinction efficace sur un temps court d'induction mais ne suffit pas pour dégrader la totalité des ARNm de *PFRA* endogène. Nous avons dès lors, induit plus longtemps à la tétracycline la lignée *snl-2* (70h) et avons généré des lignées sauvages et *TbAGO1*^{-/-} capables de produire constitutivement l'ARNdb intramoléculaire de *PFRA* (comme la lignée inductible *snl-2*, voir annexes)(Bastin et al., 2000).

Nous avons ensuite analysé l'expression des ARNm matures et immatures de *PFRA* dans nos lignées sauvage, *TbAGO1*^{-/-}, *snl-2* induites à 70h, *TbAGO1*^{-/-}+*T4αα*, *WT*+*T4αα* en présence ou non de sinéfungine (**figure 45**). Sans inhibiteur, les cellules sauvages et *TbAGO1*^{-/-} expriment normalement l'ARNm de *PFRA*, alors que traités à la sinéfungine les pré-ARNm non épissés s'accumulent et la proportion d'ARNm mature est réduite. Chez les cellules *snl-2* induites pendant 70h et *WT*+*T4αα*, produisant de l'ARNdb de *PFRA*, nous détectons encore une faible quantité l'ARNm mature de *PFRA* et nous observons l'apparition de fragments d'ARN de *PFRA* correspondant à une taille de d'environ 300 bases. En présence de sinéfungine, chez les lignées *snl-2* induites pendant 70h et *WT*+*T4αα*, les pré-ARNm polycistroniques ne sont plus détectés et démontrent que l'ARNdb induit un mécanisme d'extinction dans le noyau.

Dans la lignée *TbAGO1*^{-/-}+*T4αα* et en présence de sinéfungine, la quantité de précurseurs et la quantité d'ARNm mature de *PFRA* n'est pas affectée, démontrant que la protéine *TbAGO1* est indispensable à ce mécanisme d'extinction. D'autre part chez ce mutant, nos résultats montrent que les petits fragments d'environ 300pb ne proviennent pas de la dégradation de l'ARNm de *PFRA* mais est produit par le clivage de l'ARNdb, d'une taille de 1800pb transcrit constitutivement par le plasmide p*T4αα*. Ce résultat supplémentaire montre que *TbAGO1* n'est pas requis pour le clivage de l'ARNdb.

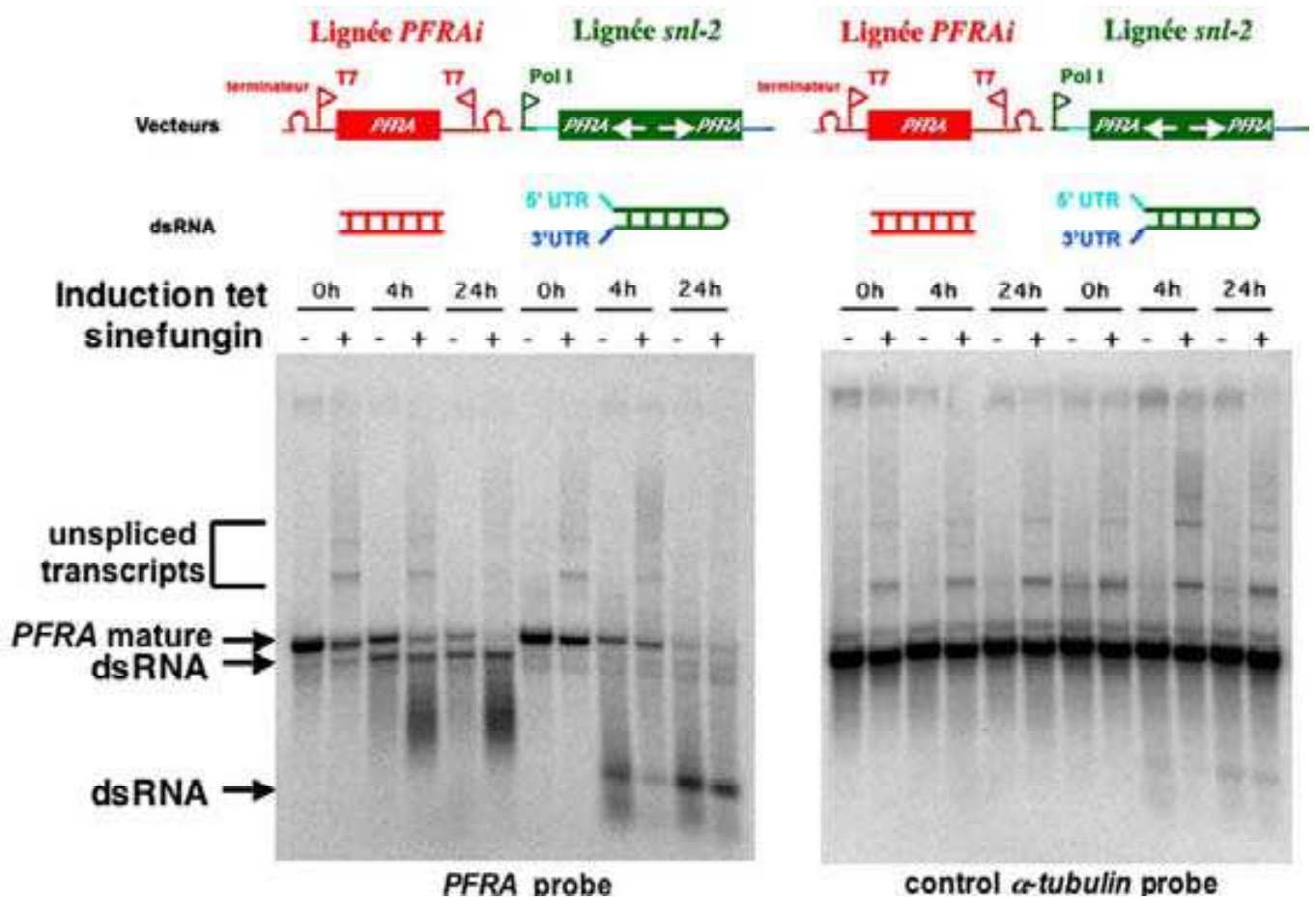


Figure 46

Extinction transcriptionnelle et post-transcriptionnelle médiées par différents types d'ARN double brin

Les lignées ont été induites à la tétracycline pendant les durées indiquées, puis exposées à la sinéfungine. À droite, hybridation à l'aide de la sonde *PFRA*. À gauche, réhybridation sur la même membrane, avec une sonde reconnaissant l'alpha-tubuline. Les ARNm matures et leurs précurseurs non épissés sont visibles. Les sondes ont été marquées par la technique de « random priming. » Les cellules traitées ont été incubées avec 2 μ g/ml de sinéfungine dans le milieu de culture pendant 90minutes avant extraction d'ARN. Dépôt : 10 μ g d'ARN totaux par puits

En conclusion, la présence d'ARNdb entraîne la disparition des ARNm matures, mais aussi de leurs précurseurs non épissés. Ce résultat est en contradiction avec les données de Ngo *et al.* (Ngo et al., 1998), qui ont démontré qu'après électroporation d'ARNdb dans la cellule, seuls les transcrits matures sont dégradés, sans modification de précurseurs non-épissés. Cette contradiction pourrait s'expliquer par la nature des ARNdb utilisés (transitoire-stable). Nos données suggèrent que soit, les préARNm sont aussi ciblés par ARNi directement dans le noyau, soit ils ne sont plus produits (extinction transcriptionnelle ou TGS).

Pour clarifier, nous avons suivi les conséquences de l'expression d'ARNdb de *PFRA* au cours du temps. En présence de tétracycline, les lignées *PFRAi* et *snl-2* induites expriment respectivement de l'ARNdb inter-, ou intramoléculaire de *PFRA* et dégradent les ARNm matures de *PFRA* (**figure 46**). Les cellules *PFRAi* et *snl-2* non induites expriment l'ARNm de *PFRA*, alors qu'après traitement à la sinéfungine, les pré-ARNm non épissés s'accumulent aux dépens de la production d'ARNm matures de *PFRA* des lignées *PFRAi* et *snl-2* non induites. Quatre heures après induction à la tétracycline, les lignées non traitées présentent une réduction visible de l'ARNm mature de *PFRA*. Le traitement à la sinéfungine au même stade ne montre pas de réduction apparente de la quantité d'ARNm polycistronique. Cette observation confirme donc l'expérience de Ngo *et al.* 1998 et démontre qu'à ce stade, l'extinction passe bien par un mécanisme post-transcriptionnel dans le cytoplasme (PTGS)(Ngo et al., 1998). Par contre, après une induction prolongée à la tétracycline pendant 24h et en présence de la sinéfungine, les ARN polycistroniques de *PFRA* ne sont plus détectés. Cette différence pourrait correspondre à un processus plus lent, par exemple lié à la rentrée de petits ARNdb dans le noyau.

Ces résultats signifient que soit l'ARNi dégrade rapidement le pré-ARN dans le noyau soit il existe une voie d'extinction transcriptionnelle.

Si les résultats obtenus au niveau de l'expression des gènes endogènes de *PFRA* sont comparables dans les deux lignées, il n'en va pas de même quant au devenir de l'ARN double brin. Dans le cas de la lignée *PFRAi*, les ARN sens et antisens sont produits par l'ARN polymérase T7 et sont indépendants du *trans* épissage car ces transcrits ne possèdent pas de séquence ni pour l'addition du splice leader, ni pour l'addition de la queue polyA. Ce type de transcrits n'est normalement pas (ou peu efficacement) exporté du noyau. L'expression de ces ARN n'est que peu ou pas réduite par la sinéfungine (**figure 46**). Par contre chez la lignée *snl2*, l'ARNdb intramoléculaire en épingle à cheveux est flanqué de séquences UTR permettant le *trans* épissage en 5' et la polyadénylation en 3'. Dans ce cas, l'addition de sinéfungine montre une baisse de la quantité du fragment de cet ARNdb à 4h et à 24h.

Une deuxième différence s'observe au niveau de la taille des ARNdb. Celle-ci est presque identique (intra- ou intermoléculaire) : ARNdb d'environ 1700-1800 pb ; toutefois dans le cas de *snl-2*, la présence de grands ARNdb est indétectable et seuls sont détectés des ARN de petite taille (environ 300pb) (**figure 46**) suggérant un clivage spécifique induit probablement par une activité de type Dicer dans le cytoplasme.

Nous remarquons également que les transgènes produisant respectivement les ARNdb par les promoteurs T7 (ARN polymérase T7) et procycline (ARN polymérase I) sont toujours transcrits et détectés, même après plusieurs générations. Ces résultats démontrent donc que les deux transgènes échappent à l'extinction transcriptionnelle par ARNi puisqu'ils sont toujours exprimés. En conclusion, ces données démontrent qu'il existe deux voies d'extinction par ARNi chez *T. brucei* et indiquent donc qu'en présence d'ARNdb, le locus *PFRA* endogène (transcrit par l'ARN polymérase II) serait soumis à une voie d'extinction transcriptionnelle.

Nous avons également analysé l'expression des gènes flanquants en amont et en aval du locus *PFRA* chez la lignée *snl-2* induites et non induites. Il s'agit de gènes codant respectivement pour TRP11 polII (GenedB 5H5.740) et la sous-unité ADN polymérase alpha (GeneDb4A8.580) situé à 10kb du premier gène et dernier gène de *PFRA*. Dans les deux cas, aucune réduction significative de leur expression n'a été détectée, ce qui démontre une absence de propagation dans le cas d'une extinction transcriptionnelle (données non montrées).

II.D.5. Conséquences d'expression d'ARN non épissés sur l'expression des rétroéléments

Les expériences précédentes ont rappelé l'importance des conditions d'expression de l'ARNdb de *PFRA*. En règle générale, les transcrits non épissés ne sont pas correctement exportés vers le cytoplasme et pourraient s'accumuler dans le noyau. Nous avons donc analysé les conséquences de l'accumulation de ce type d'ARN sur les transcrits des rétroéléments *ingi*/SLACS. Plusieurs lignées exprimant de l'ARNdb non épissés (voir partie ARNi et génomique fonctionnelle) ont été analysées.

Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si la présence d'ARNdb supplémentaire modifiait l'expression des *ingi*. C'est effectivement le cas des lignées *PFRAi* et *pZJM-Mdp2* où l'expression d'ARNdb intermoléculaire (non épissé) entraîne une augmentation de l'abondance des rétroposons *ingi* (**figure 47 A**). Ceci a été reproduit chez d'autres lignées induites qui expriment de l'ARNdb (des gènes *IFT88*, *DHC1b*, *Absalon S.* et *Bastin P.*, données non publiées). En résumé, la présence d'ARNdb intermoléculaire non-épissé génère la surexpression des rétroposons *ingi* sans toutefois avoir d'effet particulier au niveau de la croissance et de la mitose (à l'exception de la lignée *pZJM-Mdp2*). La surexpression des transcrits *ingi* n'est cependant pas observée dans la lignée *snl-2* induite qui exprime de l'ARNdb intramoléculaire et épissé correctement. Ce résultat suggère donc que l'augmentation de l'expression des transposons *ingi* n'est pas due à la présence d'ARNdb en général, mais plutôt à la présence d'ARN non épissés résidant dans le noyau.

Est-ce que ce phénomène pourrait se produire si de l'ARN d'*ingi* lui-même était exprimé dans ces conditions ? Nous avons donc généré une lignée dans les mêmes conditions que ci-dessus en transformant le vecteur *pZJM* contenant un fragment codant de 839 nt du rétroposon *ingi* (+2759 à +3598). En présence de tétracycline, de l'ARN à la taille attendue est détecté et non dégradé (**figure 47 A**). Toutefois, nous n'observons pas ici de surexpression des transcrits *ingi*. Ces résultats permettent aussi de déduire que si les rétroéléments *ingi* sont soumis à un mécanisme d'extinction transcriptionnelle, le transgène transcrit par un promoteur T7 échappe à cette régulation.

Nous avons également généré une lignée capable d'exprimer dans les mêmes conditions un fragment (609nt, +1701 à +2309) du rétroposon site-spécifique SLACS. L'induction à la tétracycline produit la bande de taille attendue avec la sonde SLACS, mais

ne déclenche pas non plus de surexpression des *ingi*. Curieusement, c'est en condition non induites qu'on observe une surexpression des rétroposons *ingi* et SLACS (**figure 47 A et B**). Cette surexpression pourrait être due au contexte d'intégration du vecteur dans la cellule. Malgré cela, les cellules induites et non induites ont une croissance identique soulignant une nouvelle fois l'absence de toxicité suite à la surexpression de ces transcrits. Enfin, toutes ces expériences démontrent que les transcrits non épissés produits par l'ARN polymérase T7 sont résistants à l'ARNi.

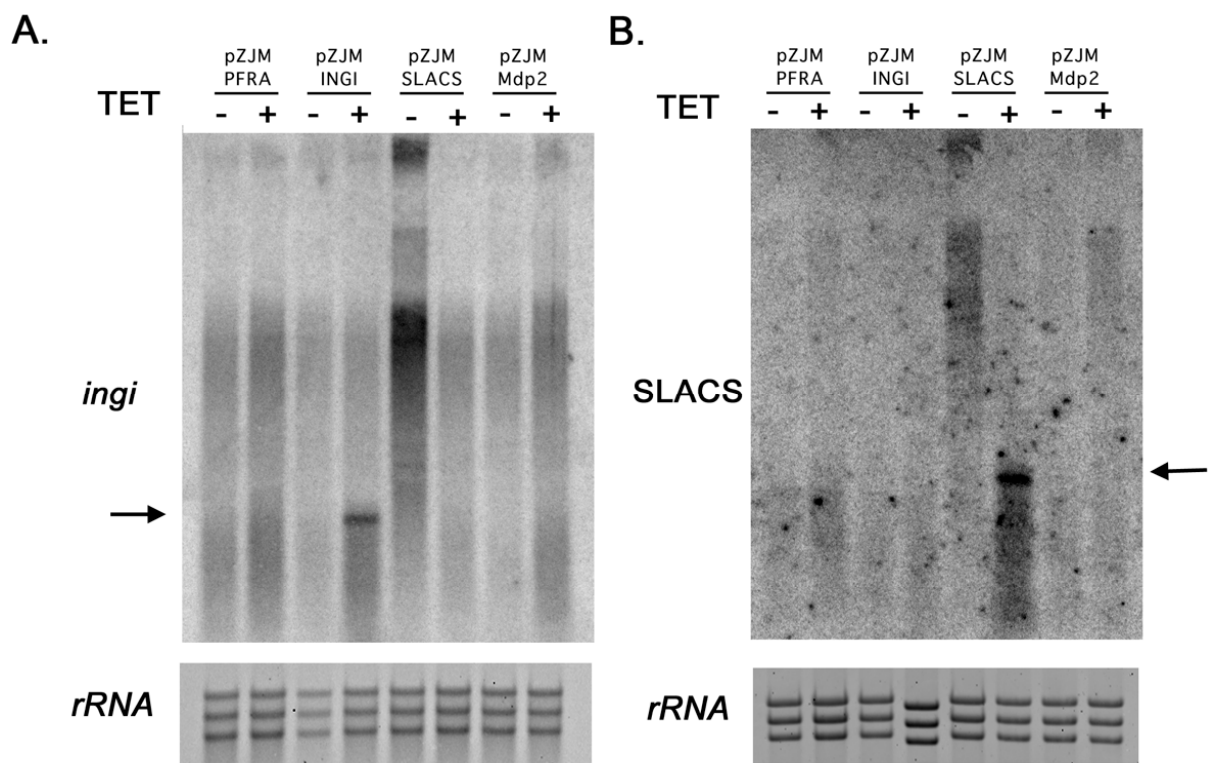


Figure 47

Expression d'ARNdb et conséquence sur le profil des transcrits de rétroéléments

A/ Détection des transcrits *ingi* chez les lignées induites et non induites.

B/ Détection des transcrits SLACS chez les lignées induites et non induites.

Les lignées induites ont été incubées avec 1µg/ml de tétracycline pendant 48h. Les sondes spécifiques de *ingi* et de SLACS correspondent à la séquence des transgènes respectifs et ont été marquées par « random priming ». L'expérience a été reproduite deux fois. Dépôt : 10µg d'extraits ARN totaux par puits.

Dans le génome du trypanosome, les rétroposons SLACS sont intégrés dans le même sens que les répétitions des tandems ARN splice leader (1379nt) qui couvrent environ 35kb sur le chromosome IX (**figure 48 A**). La surexpression de SLACS observée ci-dessus pourrait-elle donc affecter la transcription des séquences flanquantes ? Nous avons dès lors analysé la transcription des tandems du splice leader sur nos différentes lignées. Seule la lignée pZJM-SLACS non induite qui surexprime les transcrits des rétroposons SLACS montre une modification de ces éléments, avec l'accumulation d'ARN de grande taille (**figure 48 B**). Cette surexpression est spécifique des rétroéléments et n'affecte pas la transcription du contrôle tubuline (**figure 48 C**).

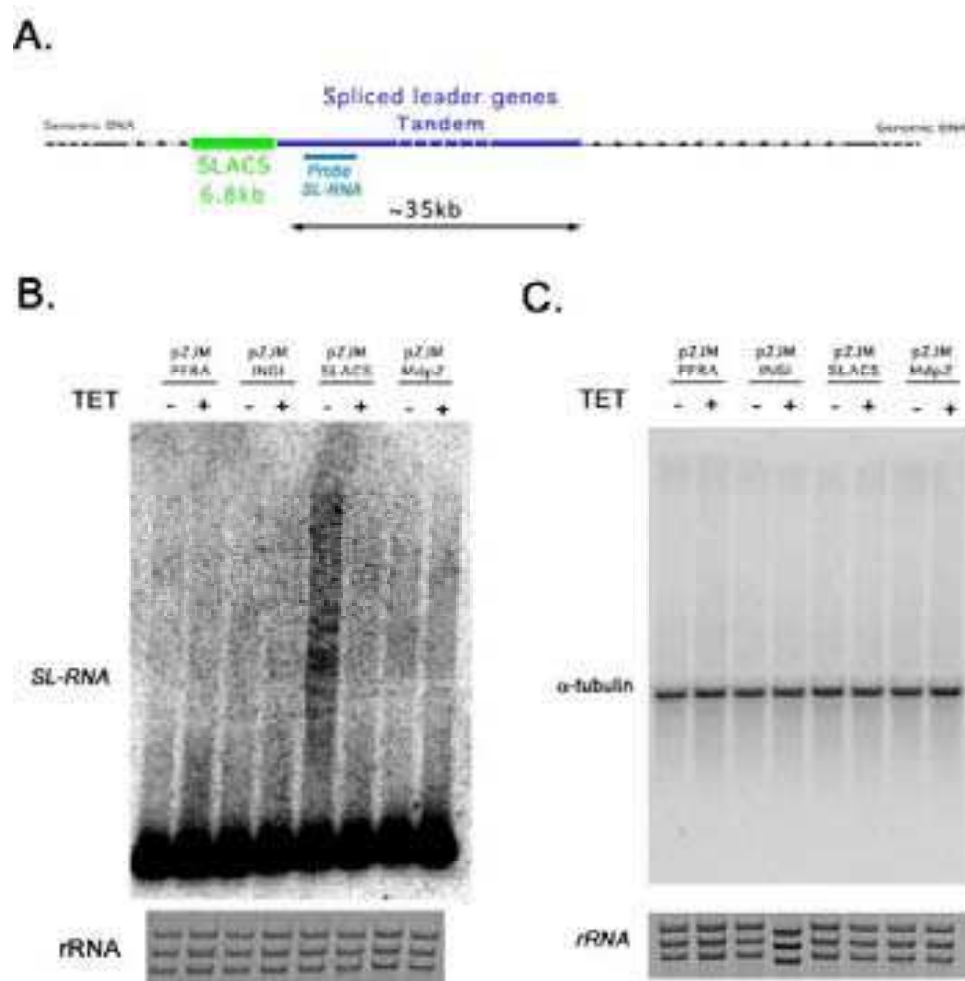


Figure 48 Les lignées pZJM-SLACS induites surexpriment des transcrits SL-ARN

A/ Représentation schématique du tandem SL-ARN du chromosome IX. La position de la sonde employée pour le northern est indiquée **B/ Détection des transcrits de tandem de 1,3 kb des SL-ARN chez les lignées induites et non induites.** **C/ Détection de l'alpha - tubuline (contrôle).** Les lignées induites ont été incubées avec 1 μ g/ml de tétracycline pendant 48h. Les sondes spécifiques ont été marquées par « random priming ». L'expérience a été reproduite deux fois. Dépôt : 10 μ g d'extraits ARN totaux par puits.

Pour comprendre quelles pourraient être les causes de ces dé-régulations, nous avons construit des vecteurs permettant l'expression inductible de l'ARN sens et antisens d'un fragment de SLACS (+1701-2309nt, le même insert que dans pZJM-SLACS) flanqué de séquences non traduites permettant l'addition du splice leader et de la queue polyA. Ce plasmide doté du promoteur procycline (ARNpol I) est intégré dans le même site de la même lignée hôte (lignée 29-13)(voir matériels et méthodes et annexe). La lignée pLewSLACSSens induite exprime le fragment ARN sens de SLACS (**figure 49 A**) alors que la lignée pLewSLACSantisens induite le fragment ARN antisens de SLACS mais à un niveau plus faible.

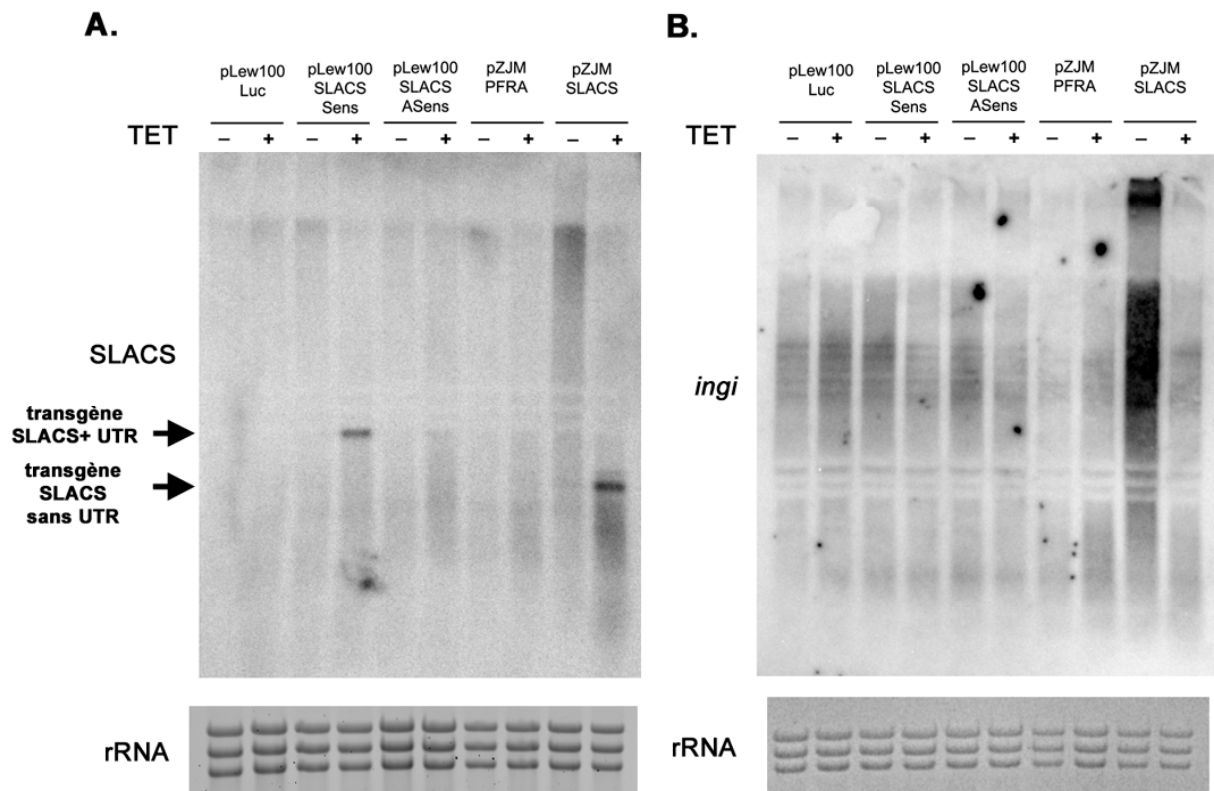


Figure 49 : Les lignées pLEWSLACS surexpriment les rétroposons *ingi*

A/ Détection des transcrits SLACS chez les lignées pZJM et pLew100SLACS, induites et non induites. B/ Détection des transcrits *ingi* chez les lignées pZJM et pLEW 100, induites et non induites.

Les lignées induites ont été incubées avec 1µg/ml de tétracycline pendant 48h. Les sondes spécifiques de *ingi* et de SLACS correspondent aux transgènes respectives pZJM-INGI et pZJM SLACS et ont été marqué par random priming . L'expérience a été reproduite deux fois. Dépôt : 10µg d'extraits ARN totaux par puits.

Par contre, aucune surexpression d'ARN de SLACS endogène n'est détectée, au contraire du pZJM-SLACS. L'expression d'ARN de fragment SLACS proprement épissés n'a donc pas les mêmes conséquences. L'analyse du profil des transcrits *ingi* chez les cellules pLewSLACSSens et pLewSLACSAntisens montre une surexpression des transcrits *ingi* une fois de plus en condition non induites (**figure 49 B**). Cependant, cette surexpression n'est pas aussi intense que celle observée chez pZJM-SLACS. Ce phénomène nouveau pourrait suggérer que les rétroposons SLACS soient impliqués dans la régulation du rétroposon *ingi*.

Discussion

III. DISCUSSION

III.A ARNi et génomique fonctionnelle

L'ARN interférence est devenue un formidable outil pour la génomique fonctionnelle des protozoaires jusqu'aux mammifères. Chez le trypanosome, c'est la méthode privilégiée pour étudier la fonction des gènes (Durand-Dubief et al., 2003; Kohl et al., 2003b; Morris et al., 2002; Motyka et al., 2004; Wang et al., 2000).

Une interprétation correcte des phénotypes ne peut être effectuée que sous la garantie que seul le gène ciblé est éteint. Pour tenter de définir les conditions de spécificité de l'ARNi chez le trypanosome (où de longs ARNdb sont utilisés), nous avons exprimé des ARNdb présentant des degrés d'homologie variable avec la cible et examiné les conséquences sur l'expression des ARN, des protéines et sur le phénotype aussi bien au niveau individuel et qu'au niveau de la population (Durand-Dubief et al., 2003). Ces travaux ont démontré qu'il faut éviter d'avoir plus de 80% d'identité entre l'ARNdb et les gènes voisins de la cible. Ils ont également démontré que l'expression d'ARNdb intramoléculaire est recommandée pour obtenir une extinction maximale de transcrits. En effet, ceci s'avère indispensable pour visualiser certains phénotypes (Robinson et al. , Schneider et al, communications personnelles)

Ces données sont capitales pour la génomique fonctionnelle et ont été exploitées et incorporées pour la réalisation d'un logiciel destiné aux utilisateurs de l'ARNi : RNAit (Redmond et al., 2003)(RNAit : <http://www.trypanofan.org/software/RNAit.html>). Ce logiciel permet de trouver des régions du gène spécifiques pour effectuer l'ARNi sans risquer d'affecter d'autres gènes de séquence proche et fournit également des amorces optimales pour l'amplification. Le logiciel RNAit est utilisé pour le projet de génomique fonctionnelle qui vise à éteindre individuellement tous les gènes du chromosome I chez *T. brucei* (Functional analysis of *Trypanosoma brucei* Chromosome I by RNA interference, Subramaniam, C., Veazy, et al. Parasitology Meeting Woods Hole 2003).

Toutefois, malgré l'extraordinaire facilité à effectuer l'extinction des gènes par ARNi, ce système ne permet pas des études fonctionnelles sophistiquées comme la complémentation de « knockout » *via* l'expression de protéines tronquées par exemple (le gène complémantant serait soumis à l'ARNi). Ceci est gênant, sachant que l'expression de protéines recombinantes pose des problèmes de compétition avec la protéine endogène (Bastin et al., 1999). Ces difficultés peuvent être résolues par l'expression inductible de protéines tronquées dans une lignée délétée des copies endogènes (knockout)(Lorenz et al., 1998), cependant ce type d'étude nécessite la mobilisation de moyens coûteux en temps et en énergie.

Pour résoudre ces problèmes, nous avons donc mis au point deux nouvelles stratégies reposant sur la complémentation par un gène résistant à l'ARNi. Tout d'abord, on cible par ARNi exclusivement les régions non traduites (UTR) du gène endogène, puis on exprime un transgène flanqué d'autres UTR, ce qui assure une complémentation fonctionnelle (Rusconi et al. 2005 BMC Biotech 2005, sous presse)(Durand-Dubief & Bastin, données non publiées). De plus, nous avons démontré que l'ARNi ciblant les séquences non traduites ne génère pas de propagation du signal sur la séquence codante, au contraire de ce qui est observé chez *C. elegans* (Sijen et al., 2001). La seconde approche utilise le gène orthologue une espèce, qui est suffisamment différent pour être résistant à l'ARNi mais dont la protéine est assez conservée pour permettre une complémentation.

Ce système de complémentation n'est pas uniquement utile pour des organismes où l'ARNi n'est pas fonctionnelle comme chez *Leishmania* et *T. cruzi* mais également pour des modèles où l'ARNi fonctionne mais est difficilement applicable. Citons comme exemple, le cas de l'étude de protéines flagellaires chez l'homme où plusieurs gènes sont suspectés d'être impliqués dans des maladies génétiques. Au laboratoire, nous étudions la fonctionnalité de gènes humains codant pour des protéines flagellaires chez les mutants correspondants du trypanosome (Branche C. et Bastin P. article en préparation). En conclusion, ces travaux ont largement contribué au développement de la génomique fonctionnelle par ARNi.

III.B Composantes de l'ARNi

Plusieurs approches ont été utilisées pour identifier les composantes de la machinerie ARNi. L'approche génétique par génération de mutants incapables d'effectuer l'ARNi a été particulièrement efficace chez *C. elegans*, *A. thaliana*, *N. crassa* et *C. reinhardtii*. Malheureusement, cette technique ne peut pas être utilisée chez *T. brucei* qui est un organisme diploïde où la méiose est un phénomène rare et mal compris (Jenni et al., 1986). L'approche biochimique par purification de complexes conservant l'activité ARNi a donné de très bon résultats chez la drosophile mais souvent très variables et pas toujours reproductibles (Sontheimer, 2005). Cette approche a été réalisée chez *T. brucei* et a permis d'isoler un complexe de 70kDa contenant des siARN associés aux ribosomes, évoquant un lien avec la traduction (Djikeng et al., 2003). Une activité de clivage d'ARN cible n'a toutefois pas pu être démontrée et la masse du complexe est en désaccord avec la taille de la protéine TbAGO1 (~98kDa). Une association entre la machinerie ARNi et les polyribosomes a été également évoquée chez la drosophile (Hammond et al., 2000; Kennerdell et al., 2002). Cependant, d'autres études suggèrent que la traduction de l'ARN cible n'est pas indispensable à l'ARNi (Gu and Rossi, 2005). Dans la fraction polyribosomique, des ARN de petite taille ont été clonés et séquencés chez *T. brucei*. Ces petits ARN sont de taille hétérogène avec une longueur moyenne de 25 nucléotides. Lorsqu'ils sont isolés à partir d'une lignée exprimant de l'ARNdb intramoléculaire d'actine, des petits ARNs de 21-26 nt correspondant à la séquence de l'actine sont retrouvés, suggérant donc une fragmentation des grands ARNdb par un mécanisme similaire aux autres espèces (Djikeng et al., 2001). Il faut préciser que les siARN de l'actine représentent seulement 1-2% des petits ARN isolés, la majorité des ARN de petite taille provenant des rétroposons *ingi* et SLACS.

Toutefois, la transfection par électroporation de siARN synthétisés chimiquement ou générés par clivage de longs ARNdb (*via* Dicer ou la ribonucléase III de *E. coli*) n'induit pas l'ARNi (Durand-Dubief et Bastin, données non publiées). Il est possible que la chimie des siARN endogènes soit différente chez *T. brucei* ou plus étonnant encore que les siARN ne rentrent pas dans les cellules lors de l'électroporation. Une hypothèse plus raisonnable serait que les siARN ont besoin d'intermédiaire pour rentrer efficacement dans le complexe RISC, comme c'est le cas chez *C. elegans* et la drosophile qui font respectivement intervenir les protéines RDE-4 et R2D2 (Liu et al., 2003; Tomari et al.,

2004). Ces protéines s'associent à Dicer et ont un domaine de liaison aux ARNdb qui est utilisé pour lier les siARN générés par la ribonucléase. L'ensemble participe à la construction de ce complexe RISC, avec un rôle spécifique pour R2D2/RDE-4, dans le transfert des siARN à une protéine argonaute (Liu et al., 2003; Tomari et al., 2004). Dans le cas de la drosophile, R2D2 permet l'orientation du siARN en fonction de ses propriétés thermodynamiques, pour sélectionner lequel des deux brins est compétent pour incorporer le complexe et dégrader l'ARNm cible (Tomari et al., 2004).

En ce qui concerne le trypanosome, la comparaison des génomes a été la méthode la plus efficace pour identifier des gènes candidats potentiellement impliqués dans l'ARNi, permettant l'identification du gène codant pour la protéine TbAGO1. Il est probable qu'une ribonucléase III soit impliquée dans l'ARNi chez *T. brucei* puisque l'ARNdb est clivé en siARN (Djikeng et al., 2001). Pourtant, si le génome du protozoaire code pour plusieurs ribonucléases III, aucune ne possède les signatures caractéristiques de Dicer et la plupart d'entre elles seraient impliquées dans l'édition des ARN de la mitochondrie (Panigrahi et al., 2003). Nous avons recherché l'implication dans l'ARNi de l'une d'elles, mais nous n'avons pas eu de résultats concluants. Le fait que Dicer n'ait pas été identifié pourrait provenir d'un séquençage incomplet du génome, mais il n'est pas exclu que Dicer soit en réalité une protéine multimérique, ou encore composée de motifs protéiques différents. C'est le cas chez *Dictyostelium* où l'enzyme effectuant le rôle de Dicer possède des motifs additionnels de la RdRP (Martens et al., 2002). De même, chez *S. pombe*, Dicer ne possède pas de domaine PAZ et un domaine C-terminal plus court (Provost et al., 2002).

Dans le cas de la famille Argonaute, deux gènes homologues ont été identifiés chez *T. brucei* (Durand-Dubief and Bastin, 2003). Le premier encode la protéine TbAGO1, possédant les domaines distinctifs PAZ et PIWI caractéristique de cette famille, alors que le second code pour TbPWI1 qui ne possède que le domaine PIWI conservé.

Cette famille a connu une expansion considérable au cours de l'évolution : un gène chez *S. pombe*, deux chez *N. crassa*, 5 chez *D. melanogaster*, 8 chez *Tetrahymena*, 10 chez l'homme et *A. thaliana* et 27 chez *C. elegans* (Agrawal et al., 2003; Ullu et al., 2004). Il semble que ces gènes soient absents chez les espèces n'effectuant pas l'ARNi, comme *S. cerevisiae*. Cependant, tous les gènes argonautes ne sont pas impliqués dans l'ARNi. Par exemple, chez l'homme un seul des membres est essentiel pour l'ARNi (Liu et al., 2004a;

Meister et al., 2004). Une autre situation est celle de la protéine rde1 chez *C. elegans* ce qui suggère que les autres membres pourraient participer à d'autres mécanismes encore méconnus (Tabara et al., 1999).

Chez *T. brucei*, TbAGO1 est essentielle à l'ARNi (Durand-Dubief and Bastin, 2003; Shi et al., 2004b) et pourrait être intégrée dans un complexe RISC à définir (Djikeng et al., 2003). La fonction du motif RGG répété de TbAGO1 a été caractérisée partiellement, il serait essentiel pour l'activité ARNi mais pas pour la fixation des siARN. Ce rôle est probablement assuré par le motif PAZ. Le domaine PIWI de TbAGO1 serait requis pour l'activité de clivage de l'ARN cible puisque la mutation d'une arginine en position 735 (R735) affecte cette fonction (Shi et al., 2004c). Cependant une des aspartates du domaine PIWI présumé essentielle à l'activité de clivage des Argonautes n'est pas conservée (Durand-Dubief et Bastin, observations non publiées). La protéine TbAGO1 est localisée en périphérie du noyau et semble être majoritairement cytoplasmique (Durand-Dubief and Bastin, 2003; Shi et al., 2004b).

La protéine TbPWI1, ne semble pas être directement impliquée dans l'ARNi. Cette protéine argonaute ne possède pas de domaine PAZ reconnaissable, mais est dotée d'un domaine PIWI conservé contenant les aspartates qui pourraient (selon le modèle de Liu)(Liu et al., 2004a) permettre le clivage de l'ARN cible. L'inactivation de TbPWI1 ne modifie pas l'activité ARNi, au contraire de TbAGO1. De même, nous avons aussi produit une lignée mutante permettant l'inactivation de TbPWI1, mais les lignées 29-13 posent des problèmes pour tester l'activité ARNi en condition transitoire. Assez étrangement, l'électroporation d'ARNdb est très peu efficace à générer l'ARNi dans cette lignée et ses dérivées. Ces observations ont été reproduites dans d'autres laboratoires et sont inexplicables (Ullu E., communication personnelle). Toutefois, la croissance cellulaire et la mitose ne sont pas affectées dans ces cellules. La protéine recombinante TbPWI1 est localisée en périphérie du noyau et est majoritairement cytoplasmique (Durand-Dubief and Bastin, 2003). D'autres homologues de TbPWI1 sont également retrouvés dans les génomes de *Leishmania* et *T. cruzi* qui ne font pas l'ARNi. Leur forte homologie indique que leur fonction encore inconnue pourrait être commune aux trois organismes.

Chez les métazoaires, certaines protéines Argonaute sont spécialisées dans la voie des microARN et participent également à un complexe de type RISC (Liu et al., 2004a; Meister et al., 2004; Okamura et al., 2004; Sontheimer and Carthew, 2004). Or, nous remarquons que TbAGO1 est plus proche de DmAGO2, spécialisé dans la voie des siARN chez la drosophile. D'autre part, TbPWI1 pourrait être un homologue de DmAGO1, impliqué dans la voie des microARN. Toutefois, aucun microARN n'a été identifié chez *T. brucei* ni chez d'autres protozoaires. Ces observations pourraient suggérer une fonction spécifique de cette protéine avec d'autres petits ARN régulateurs qui restent à découvrir.

Des homologues d'autres gènes impliqués dans l'ARNi ont été recherchés dans le génome de *T. brucei*. De nombreuses ARN hélicases sont présentes, cependant leur grand nombre (>40) et l'absence de motifs caractéristiques de celles impliquées dans l'ARNi ne nous ont pas permis d'identifier une hélicase spécifique. Nous avons également recherché la présence d'autres protéines interagissant avec le complexe RISC comme FMRX, R2D2 et Vasa, mais nous n'avons pas trouvé de candidats probants. Toutefois, nous avons identifié deux homologues presque identiques de la protéine Mdp2, coexprimée avec AGO lors de la méiose chez les ciliés (Fetzer et al., 2002). Ces gènes sont bien exprimés au stade procyclique, nous avons donc généré des lignées inductibles ARNi ciblant ces deux transcrits. Cependant, l'inactivation par ARNi génère un effet pléiotropique fatal aux cellules qui rend difficile l'analyse de leur implication dans l'ARNi.

En conclusion, chez *T. brucei* plusieurs candidats potentiellement impliqués dans l'ARNi ont été identifiés, toutefois TbAGO1 est le seul dont l'importance a été démontrée. L'implication de TbAGO1 chez l'organisme le plus ancien où l'ARNi a été démontrée confirme le rôle central de la famille argonaute dans les mécanismes d'extinction par ARN.

III.C ARNi et mitose

En l'absence de TbAGO1, *T. brucei* n'effectue pas correctement la mitose, comme cela a été observé chez plusieurs mutants incapables d'effectuer l'ARNi (*Dicer*, *Rdp*, *Ago*) chez *S. pombe* (Provost et al., 2002; Hall et al., 2002; Volpe et al., 2003), un des mutants AGO chez *C. elegans* (Mello C., Keystone meeting 2004), un des mutants *dicer* chez *Tetrahymena* (Mochizuki and Gorovsky, 2005) et un mutant *Dicer* chez les mammifères (Fukagawa et al., 2004). L'analyse des mutants incapables d'ARNi chez la levure *S. pombe* a permis d'établir un modèle de son implication au niveau de l'extinction transcriptionnelle par formation d'hétérochromatine. Les répétitions centromériques sont transcrites en ARN sens et antisens, formant de l'ARNdb alors pris en charge et clivé par *Dicer* en petits ARNdb. Les siARN sont intégrés par un complexe RITS (pour RNA-induced initiation of transcriptional silencing) pour induire la formation de l'hétérochromatine centromérique (Hall et al., 2002; Volpe et al., 2002; Verdel et al. 2004), permettant ainsi la formation des kinétochores. Cette structure permet alors l'ancrage et la stabilisation des microtubules du fuseau nécessaire à la mitose (Cleveland et al., 2003). Les mutants sont caractérisés par des défauts d'assemblage du fuseau mitotique et par des migrations anormales de chromosomes (Hall et al., 2003a; Provost et al., 2002).

Chez *T. brucei*, les mécanismes de ségrégation des chromosomes sont peu connus. Ceci est dû au fait que les chromosomes ne condensent pas ou peu (**figure 50**) et qu'il n'existe pas de centromères reconnaissables. De plus, les marqueurs classiques de l'hétérochromatine ne sont pas présents, ce qui rend difficile l'analyse de ce processus (Ersfeld et al., 1999; Ogbadoyi et al., 2000). Il est établi que les grands chromosomes et les minichromosomes sont ségrégés *via* les microtubules du fuseau (Ersfeld et al., 1997), et que les minichromosomes migrent en premiers aux pôles. Toutefois, le mécanisme d'ancrage et de migration n'est pas toujours connu. De plus, il n'existe pas de méthylation au niveau de l'ADN, et bien que les histones soient présentes, elles révèlent des différences parfois singulières. C'est le cas de l'histone H3 qui ne possède pas la lysine en position 9 pourtant très conservée chez les autres eucaryotes alors que la méthyltransférase responsable de la méthylation sur la lysine 9 (marqueur de l'hétérochromatine) *Clr4* est absente. Nos expériences indiquent l'existence d'un mécanisme d'extinction transcriptionnelle, induit par la présence de l'ARNdb et dépendant de TbAGO1 (voie partie ARNi et rétroposons).

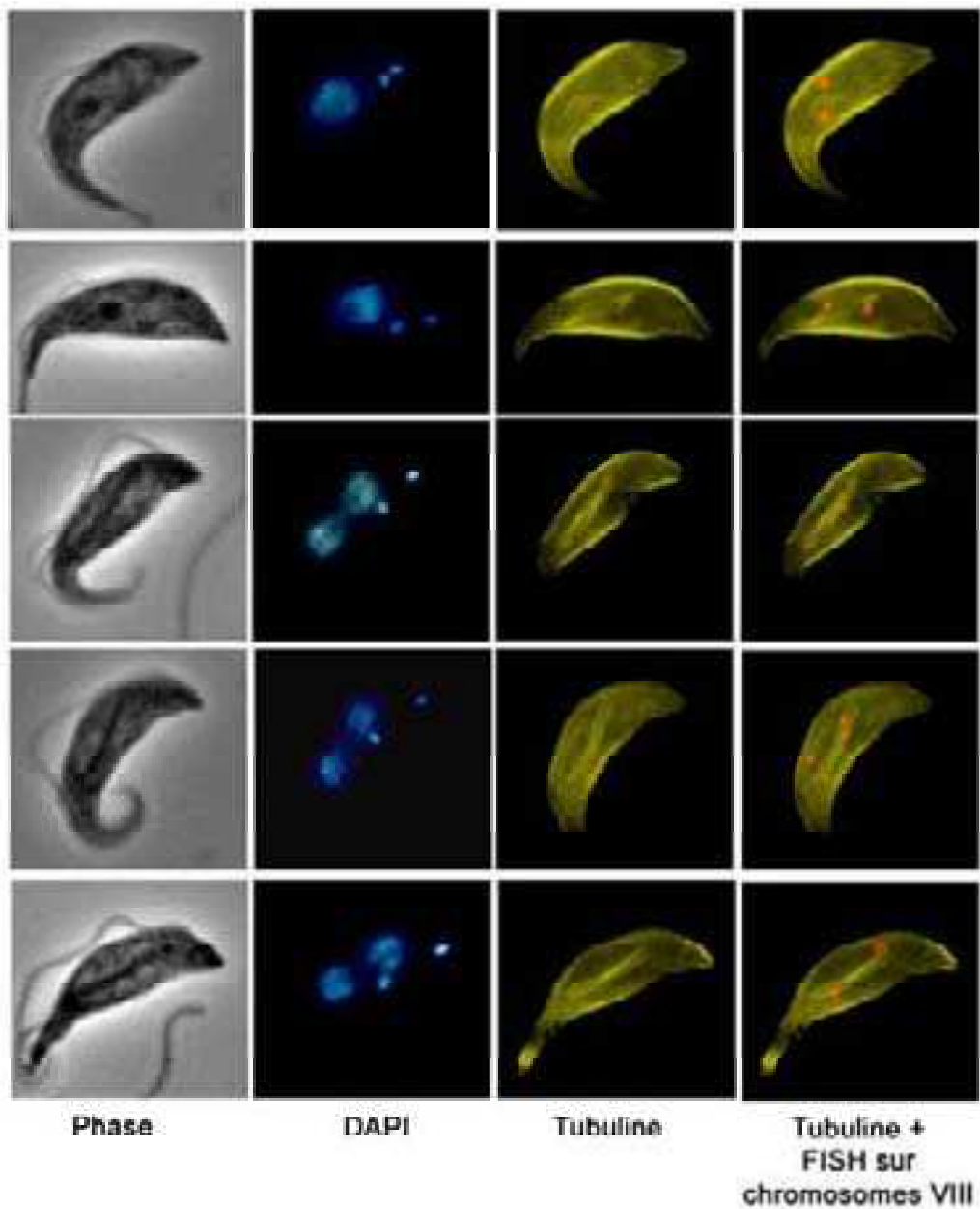


Figure 50

Les chromosomes ne condensent pas lors de la mitose chez *T. brucei*

Détection de la tubuline par l'anticorps monoclonal KMX reconnaissant la tubuline du corset cellulaire (qui n'est pas dépolymérisé à la mitose) et le fuseau chez des cellules sauvages fixées au paraformaldéhyde. Les chromosomes VIII sont marqués par une sonde reconnaissant le tandem d'ARN ribosomique 5S.

Ces données suggèrent donc un phénomène équivalent à celui observé chez la levure à fission et chez les plantes (Mette et al., 2000; Schramke and Allshire, 2003) où la présence d'ARNdb entraîne des modifications de la chromatine de séquence correspondante.

Les problèmes de croissance et de formation du fuseau probablement induits par un défaut de l'hétérochromatine n'ont pas été observés chez les mutants *Ytat1.1TbAGO1*^{-/-} et suggère donc une adaptation plus rapide de cette souche comme le montre les résultats obtenus avec notre lignée *427TbAGO1*^{-/-} maintenue plusieurs mois en culture (*TbAGO1*^{-/-*}). En effet, de récents travaux montrent que l'électroporation répétée d'ARNdb de la tubuline dans la souche *Ytat1.1* génère plusieurs lignées incapables de faire l'ARNi. Ces dernières présentent une croissance ralentie mais avec des phénotypes moins flagrants que notre lignée *427TbAGO1*^{-/-} (Shi et al., 2004a). Chez ces lignées, la protéine TbAGO1 est exprimée normalement et ne présente aucune mutation. Malgré cela, il n'y a plus d'ARNi et on observe également une surexpression des ARN des rétroposons *ingi*/SLACS (Shi et al., 2004a). Ceci démontre que ces effets sont bien dues à la perte de l'ARNi et pas un autre aspect lié à TbAGO1.

L'absence de l'ARNi chez *T. cruzi* et de *Leishmania* reste, toutefois, mystérieuse et indique qu'il existe d'autres mécanismes impliqués dans la modification de l'hétérochromatine comme le suggère également l'adaptation de notre mutant *TbAGO*^{-/-*}. Il est probable que ces organismes aient suivi une voie différente car les contraintes de leur cycle de vie sont différentes. En effet, chez *T. brucei*, les centromères ne sont pas connus mais de récents travaux suggèrent qu'ils pourraient être différents de ceux de *T. cruzi* (Obado et al., 2005). Mais, le fait que *T. brucei* puisse vivre (en culture) sans ARNi montre que ces organismes auraient pu aussi s'adapter.

Nous avons recherché d'autres situations où l'ARNi n'était pas fonctionnelle. Les comparaisons du nombre et de la taille des chromosomes chez des espèces proches effectuant ou non l'ARNi sont troublantes (**figure 51**). Dans le cas des levures où les centromères sont bien connus, *S. pombe* possède des centromères de plusieurs dizaines de kilobases alors que *S. cerevisiae* possèdent des centromères d'une centaine de bases. Le faible nombre de chromosomes chez *S. pombe* pourrait être dû à la formation d'une grande région d'hétérochromatine par ARNi préservant des « cassures » chromosomiques.

	Organismes	Nbre de chromosomes (tailles)	Gènes AGO	Activité ARNi
Apicomplexes	<i>Toxoplasma</i>	12 (1,8 à 6,5Mb)	+	?
	<i>Plasmodium</i>	14 (0,7 à 3,2 Mb)	-	?
Levures	<i>S. pombe</i>	3 (2,5 à 1 Mb)	+	+
	<i>S. cerevisiae</i>	16 (0,23 à 1Mb)	-	-
Trypanosomatidés	<i>T. brucei</i>	11 (1-5,2 Mb)	+	+
	<i>T. cruzi</i>	~56 (0,6 à 3,5Mb)	-	-
	<i>Leishmania</i>	36 (0,3 à 2,8 Mb)	-	-

Figure 51

Comparaison du nombre et de la taille des chromosomes chez des espèces proches effectuant ou non l'ARNi

Cette hypothèse pourrait s'étoffer avec *Leishmania* et *T. cruzi* qui ne font pas l'ARNi et présentent un nombre très élevé de chromosomes de plus petite taille en comparaison avec *T. brucei*. Chez ces deux espèces, le nombre de chromosomes devrait être encore plus élevé car il semble que certains aient fusionné à l'aide d'un type de rétrosons dégénéré SIRE situé au point de fusion de ces chromosomes (Ghedin et al., 2004). Ces observations suggèrent que pour éviter une fragmentation plus importante des chromosomes suite à l'absence de l'ARNi, ces deux espèces se sont adaptées en utilisant des séquences à haut degré de recombinaison.

En conclusion, l'ARNi participerait mais ne serait pas essentielle à l'association des chromosomes au fuseau mitotique, probablement *via* des modifications de chromatine encore méconnues.

III.D ARNi et transposons

Dans le génome de *T. brucei*, on dénombre près de 140 copies de *ingi* et 380 copies de RIME (**figure 52**) constituant environ 6% du génome haploïde (Bringaud et al., 2002; Murphy et al., 1987; Wickstead et al., 2003b). Les *ingi*/RIME, localisés dans les grands chromosomes, sont fréquemment associés à des familles de gènes répétés incluant les gènes pour les ARN ribosomiques, les répétitions des gènes de l'alpha et la beta-tubuline et la famille de gènes *RHS* (Bringaud et al., 2002). Les *ingi*/RIME et les gènes/pseudogènes *RHS* sont localisés préférentiellement proches des extrémités des chromosomes en amont de sites d'expression potentiels B-ES (exprimant les VSG)(Bringaud et al., 2002). Les gènes *RHS1*, au nombre de 28 copies par génome haploïde chez *T. brucei*, sont fréquemment interrompus par des éléments *ingi*/RIME, insérés au niveau d'un site spécifique dans la séquence codante, formant ainsi des pseudogènes (Bringaud et al., 2002).

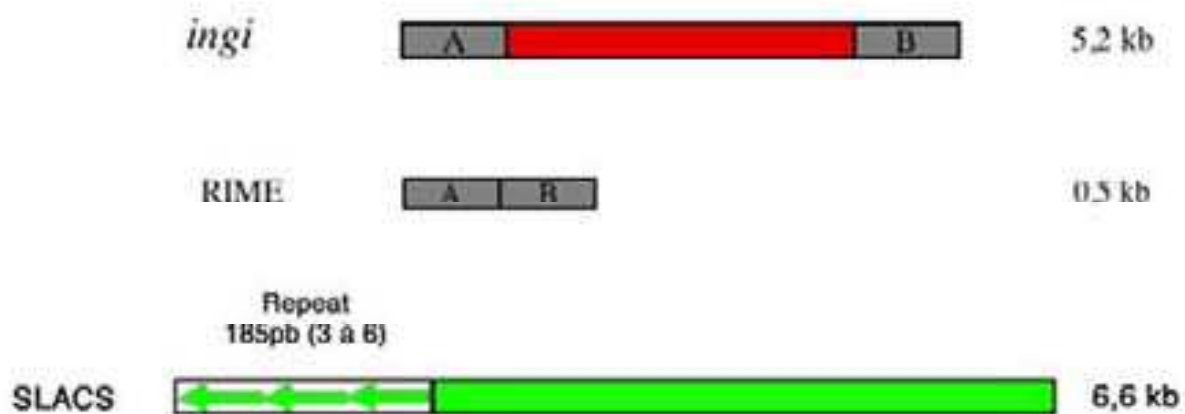


Figure 52

Représentation schématique des rétrotransposons SLACS, *ingi* et RIME

Le rétroposon site-spécifique SLACS (**figure 52**) est au nombre d'une dizaine de copies intactes exclusivement insérées dans les tandems SL-ARN du chromosome IX de *T. brucei* (Aksoy et al., 1990). Les rétroposons *ingi* et *SLACS* produisent respectivement 18% et 13% des siARN clonés, suggérant qu'ils sont sujets à un contrôle par l'ARNi (Djikeng et al., 2001). Dans notre lignée *TbAGO1*^{-/-}, l'absence du mécanisme ARNi conduit à l'augmentation de l'abondance de transcrits des rétroposons *ingi/SLACS*. Toutefois, ceci ne résulte pas en une mobilité accrue des rétroposons *ingi/RIME* dans le génome, à l'opposé d'autres éléments transposables chez les mutants ARNi de *Chlamydomonas* et de *C. elegans* (Ketting et al., 1999; Sijen and Plasterk, 2003; Wu-Scharf et al., 2000).

Le mode de transcription des rétroposons chez *T. brucei* n'est pas connu. Dans le cas du rétroposon *ingi*, ces éléments pourraient être transcrits de façon autonome par un promoteur interne (Vassella et al., 1996), cependant, aucune activité de ce type n'a pu être démontrée (Garcia-Salcedo et al., 2003). Dans le génome, une proportion importante des rétroposons *ingi/RIME* est insérée dans les gènes *RHS* et pourrait exploiter la transcription continue de ceux-ci par l'ARN polymérase II, avant d'être *trans* épissés.

Notre analyse avec la sinéfungine (inhibiteur du *trans* épissage) démontre au moins deux classes de transcrits *ingi*, l'une dépendant du mécanisme de *trans* épissage et l'autre indépendante de ce mécanisme. Ces rétroéléments pourraient donc être soumis à différents types de régulation dans le génome selon leur mode de transcription. Dans ce sens, plusieurs données suggèrent en effet, que les rétroposons *ingi* sont régulés transcriptionnellement. L'analyse par transcription *in situ* montre qu'un rétroélément *ingi* localisé près des VSG d'un site d'expression métacyclique n'est pas exprimé (Donelson, 1995). Par ailleurs, l'absence de *TbAGO1* augmente de 2 à 3 fois la transcription des rétroéléments *ingi/SLACS* (Shi et al., 2004b) appuyant l'hypothèse d'une extinction transcriptionnelle dépendante de l'ARNi. Des lignées YTAT de *T. brucei* déficientes en ARNi ont été obtenues après un régime de sélection par électroporation d'ARNdb de la tubuline conduisant à un phénotype létal. Les lignées ne présentent pas de mutations de *TbAGO1* suggérant qu'un autre aspect de l'ARNi est affecté. De plus, elles surexpriment les éléments *ingi/SLACS* ce qui démontre qu'ils sont bien contrôlés par ARNi (Shi et al., 2004a). Ce modèle pourrait expliquer l'irréversibilité apparente de la surexpression de certains transcrits *ingi* dans la lignée inductible *TbAGO1*^{-/-}+*GFP::TbAGO1*^{ITi} en présence de *TbAGO1* ou encore après culture prolongée du knockout *TbAGO1*^{-/-}.

Ce phénomène singulier s'accorderait avec une transmission épigénétique *via* une modification de la chromatine comme c'est le cas chez la paramécie où l'addition d'ARNdb des séquences IES provoque un mécanisme d'élimination de ces séquences, processus maintenu de manière stable au cours des générations même après que l'ARNdb ne soit plus dispensé (Garnier et al., 2004). Chez *S. pombe*, l'ARNi participerait à la formation d'hétérochromatine, mais ne serait pas nécessaire à son maintien (Hall et al., 2002), notre hypothèse propose donc qu'une modification induite dans la chromatine puisse se maintenir durant les générations même après restauration du mécanisme.

Par contre, d'autres transcrits sont soumis à une régulation clairement différente et totalement dépendante d'AGO1. C'est le cas des cellules *TbAGO1-/-+GFP::TbAGO1Ti* qui en présence de l'activité ARNi régule à nouveau les mêmes transcrits *ingi* surexprimés que chez la lignée *TbAGO1-/-*. La présence d'une régulation post-transcriptionnelle est d'autant plus flagrante pour les RIME et les gènes *RHS1* qui, en présence de l'activité ARNi, retrouvent un profil d'expression sauvage. Ces résultats suggèrent qu'il existe au moins deux types d'extinction : transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, pour réguler l'expression des transposons *ingi*/RIME mais avec des règles différentes pour chacun d'entre eux. La présence de deux classes de transcrits *ingi*, l'une dépendante et l'autre indépendante du *trans* épissage implique que leur localisation pourrait être différente. Les transcrits épissés sont activement exportés dans le cytoplasme, les autres s'accumuleraient dans le noyau. Ces données sont à mettre en parallèle avec la comparaison de lignées exprimant de l'ARNdb intramoléculaire (*snl-2*) ou inter-moléculaire (*PFRAi*) de *PFRA*. Dans le cas de la lignée *PFRAi*, les ARN sens et antisens produits par la polymérase ARN T7 ne possèdent pas de séquence pour le *trans* épissage et le polyA et sont insensibles à la sinéfungine. Par contre, chez la lignée *snl2*, l'ARNdb en épingle à cheveux est flanqué de signaux pour le *trans* épissage en 5' et la polyadénylation en 3'. Dans ce cas, l'inhibition du *trans* épissage induit une diminution importante de son expression.

La présence d'une quantité importante de ces deux types d'ARN de *PFRA* (chez *PFRA*i et *snl-2*) soulève une question essentielle au niveau de l'extinction transcriptionnelle induites par ARNdb. En effet, on s'attendrait à ce que le transgène soit fortement réprimé, comme cela est observé chez d'autres espèces (Mette et al., 2000), mais ce n'est pas le cas. L'explication pourrait provenir de la nature des transgènes qui sont produits soit par ARN polymérase T7 soit par l'ARN polymérase I du promoteur procycline. Si une modification de la chromatine a bien lieu, il est possible que celle-ci interfère avec la transcription par l'ARN polymérase II, mais pas avec l'activité de l'ARN polymérase I ou de la polymérase T7 (**figure 54**). Il faut rappeler que chez *T. brucei*, deux types de gène codant peuvent être transcrits par l'ARN polymérase I : la procycline et les VSG (Clayton, 2002). Ce n'est pas le cas chez *T. cruzi*, ni chez *Leishmania* où aucun cas de ce type de transcription n'a été observé. Une autre explication pourrait provenir du site d'intégration des transgènes qui sont tous situés dans le locus des ARN ribosomiques. Cette région est associée au nucléole et pourrait ne pas être sensible à la modification responsable de l'extinction transcriptionnelle.

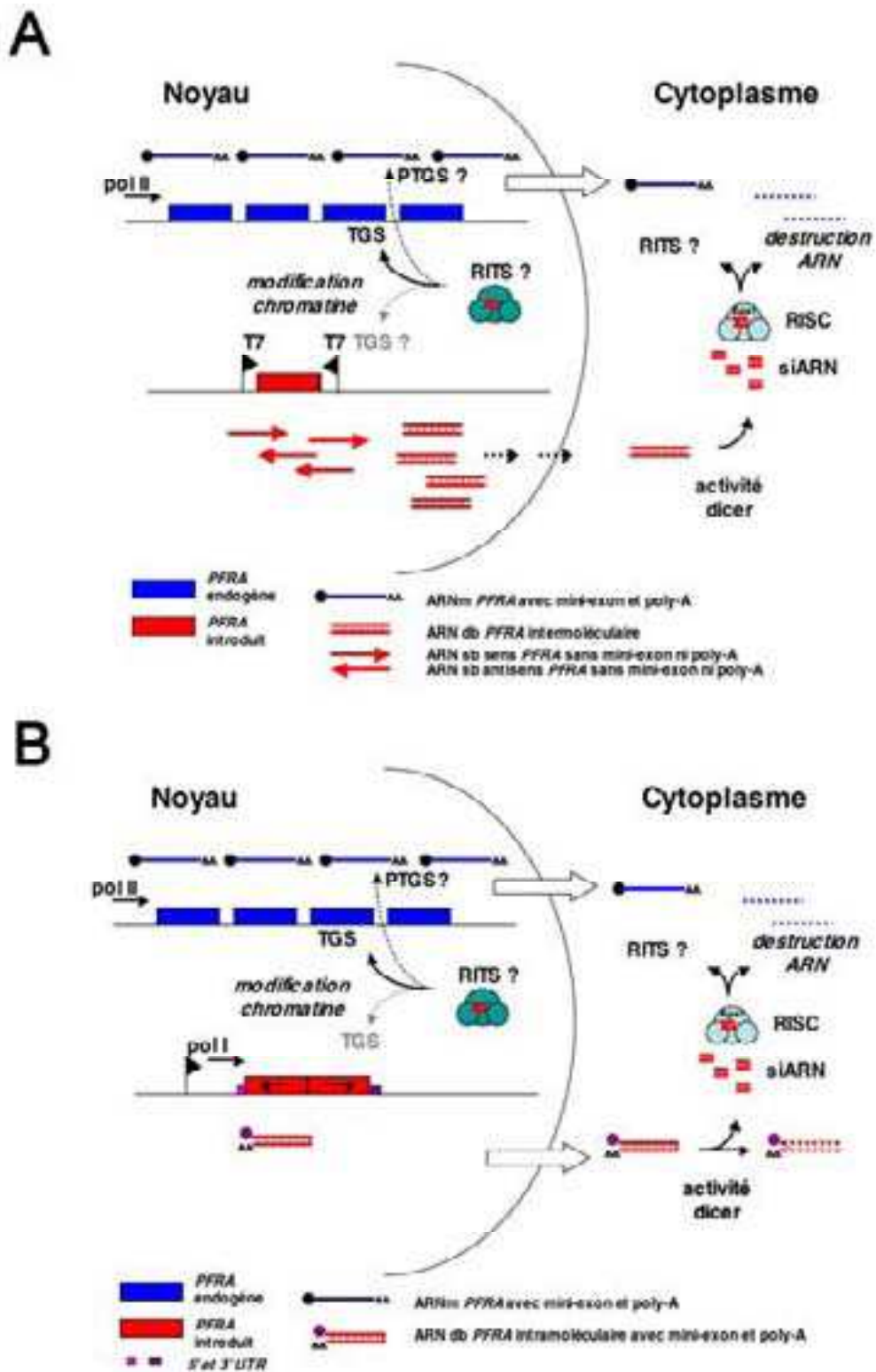


Figure 54

Modèle d'expression des transgènes échappant à l'extinction transcriptionnelle par ARNi

A/ Lignée PFRAi. Les ARN transcrits par la polymérase T7 n'ont pas de signaux de *trans* épissage. La plupart de ces ARN restent « bloqués » dans le noyau, une petite proportion va dans le cytoplasme pour déclencher l'ARNi post-transcriptionnelle. Les siARN sont ensuite exportés dans le noyau pour éteindre par la voie transcriptionnelle le locus endogène, peut être via un complexe spécifique (RITS). **B/ Lignée snl-2.** Les ARN transcrits par la polymérase I sont *trans* épissés et sont efficacement exportés vers le cytoplasme pour déclencher l'ARNi post-transcriptionnelle. Les siARN sont ensuite importés dans le noyau pour l'extinction voie transcriptionnelle le locus endogène.

La surexpression des rétroposons *ingi* chez les lignées pZJM induites (à l'exception de la lignée pZJM-SLACS et pZJM-*ingi* (voir plus loin) pourraient provenir du fait que ces ARNdb ne sont probablement pas correctement exportés et rentreraient en compétition avec les rétroposons *ingi*. Toutefois, ces ARNdb produits par le pZJM ne rentreraient pas en compétition avec les RIME qui ne semble pas être surexprimés en présence d'ARNdb produit par ce vecteur. Cette surexpression n'est pas observée dans la lignée *snl2* induite indiquant qu'elle n'est pas due à la présence d'ARNdb en général.

Une autre hypothèse expliquant ce phénomène pourrait être le site d'intégration de ces vecteurs. Avant le séquençage du génome, le site d'intégration en amont du promoteur de l'ARN ribosomique (ARN pol I) était considéré comme unique dans le chromosome I (Wirtz and Clayton, 1995). Depuis, ont été mis en évidence de multiples sites potentiels d'intégration situés dans plusieurs chromosomes (**figure 55 A**). Nous avons remarqué la présence de séquences de 159 nucléotides en amont des sites potentiels d'intégration. Ces séquences de 159 nt sont très conservées et sont quasiment identiques à RIME A (**figure 55 C**). Elles sont disposées en orientation inverse de la transcription des ARN ribosomiques. Chez le mutant *TbAGO1*^{-/-}, les transposons *ingi*/*SLACS* et RIME sont surexprimés. Curieusement, chez les lignées exprimant de l'ARNdb intermoléculaire, il n'apparaît pas de surexpression évidente de RIME. Il est toutefois possible que la surexpression des transcrits *ingi* contenant également RIME A, soit affectée en réalité par une perturbation de la transcription dans ces sites d'intégration par la présence du promoteur exogène (**figure 55 B**).

Le cas de la lignée pZJM-SLACS, reste un phénomène mystérieux mais particulièrement intéressant car la surexpression dramatique des *ingi* et de SLACS ne se produit qu'en absence d'ARNdb. Nous avons remarqué que l'expression des rétroposons dans cette lignée est environ dix fois supérieures à *TbAGO1*^{-/-}. Cependant, à l'inverse des lignées *TbAGO1*^{-/-}, la surexpression des transcrits *ingi*/*SLACS* est totalement réversible puisqu'en présence d'ARNdb de SLACS, les transcrits des deux rétroéléments retournent à un niveau normal. De plus, les lignées pLEW-SLACS^{sens} et pLEW-SLACS^{antisens} semblent reproduire ce phénomène mais à un niveau moins alarmant. L'analyse de l'expression des tandems de SL-ARN dans lequel sont insérés les SLACS endogènes chez la lignée pZJM-SLACS non induite, montre également une surexpression avec l'apparition de transcrits plus longs. Il se pourrait donc que la perturbation des rétroposons entraîne une anomalie globale dans la transcription, cependant, nos contrôles d'expression de la tubuline et des ARN ribosomiques sont normaux et l'absence de phénotype cellulaire visible (croissance, division et mitose) en culture contredisent cette hypothèse.

Les éléments mobiles sont souvent considérés comme des éléments parasites du génome, cependant SLACS fait partie de la famille des plus anciens rétroposons apparue dans la branche eucaryote. D'autre part, à l'exception de *Leishmania* où ces rétroposons sont absents, cette famille de rétroposons est intégrée exclusivement dans les tandems de SL-RNA, suggère que ces rétroéléments site spécifique pourraient participer à une régulation de l'expression des SL-ARN.

Nous avons montré que les gènes *RHS1* sont surexprimés (comme les rétrotransposons SLACS, *ingi* et RIME) dans la lignée *TbAGO1*^{-/-}. Les gènes *RHS1* possèdent fréquemment les éléments *ingi*/RIME dans leur séquence codante formant ainsi des pseudogènes accolés aux copies intacts *RHS1* (Bringaud et al., 2002). L'existence de régulation des gènes par les transposons a été prouvée chez le blé avec le transposon à LTR Wis 2-1A (Liu et al., 2004b). Chez *A. thaliana*, l'élément transposable FLC-Ler est capable de former de l'hétérochromatine avec la présence de siARN (Liu et al., 2004b). Chez *S. pombe*, seuls les gènes proches des rétrotransposons à LTR sont réprimés par ARNi (Schramke and Allshire, 2003).

Il est probable que les transcrits *RHS1* de grandes tailles (~9kb), seulement détectés dans les lignées incompetentes pour l'ARNi, correspondent à des pseudogènes contenant les éléments *ingi* ou plusieurs RIME, ce que nous vérifierons prochainement par RT-PCR. Dans ce cas, ces pseudogènes feraient partie de la classe des transcrits *ingi* dépendant de la voie du *trans* épissage. Les ARN issus de ces pseudogènes pourraient contenir la séquence du rétroélément (habituellement en orientation sens) et iraient dans le cytoplasme pour subir la voie de dégradation post-transcriptionnelle, produisant des siARN de *ingi*. Ces siARN pourraient être pris en charge par un complexe de type RITS pour éteindre transcriptionnellement les séquences homologues de *RHS1* et *ingi*. Nos analyses par northern blot nous permettent de spéculer en posant l'hypothèse que chez la lignée *TbAGO1*^{-/-}, la population de transcrits de grande taille (~9kb) *ingi*, *RHS1*, RIME A sens et RIME A antisens soient en réalité les mêmes, ce que nous vérifierons également après la rédaction de ce manuscrit. Cela suggérerait donc que la régulation des *ingi* s'effectue de manière coordonnée avec les gènes *RHS*. Le nombre abondant de copies *RHS* serait pour contrebalancer l'effet d'une extinction transcriptionnelle par ARNi. Toujours en spéculant, la présence commune des *ingi*/RIME près des sites VSG B-ES est également troublante (Bringaud et al., 2002) car si la présence du promoteur ARN pol I est nécessaire à la transcription des VSG, elle n'est pas suffisante pour réguler l'activité de ces gènes. Chez la forme sanguine du trypanosome, un seul site est exprimé à la fois, les autres étant transcriptionnellement inactif (Navarro and Gull, 2001), il n'est donc pas exclu que ces gènes/pseudogènes puissent jouer un rôle dans l'extinction transcriptionnelle des sites VSG.

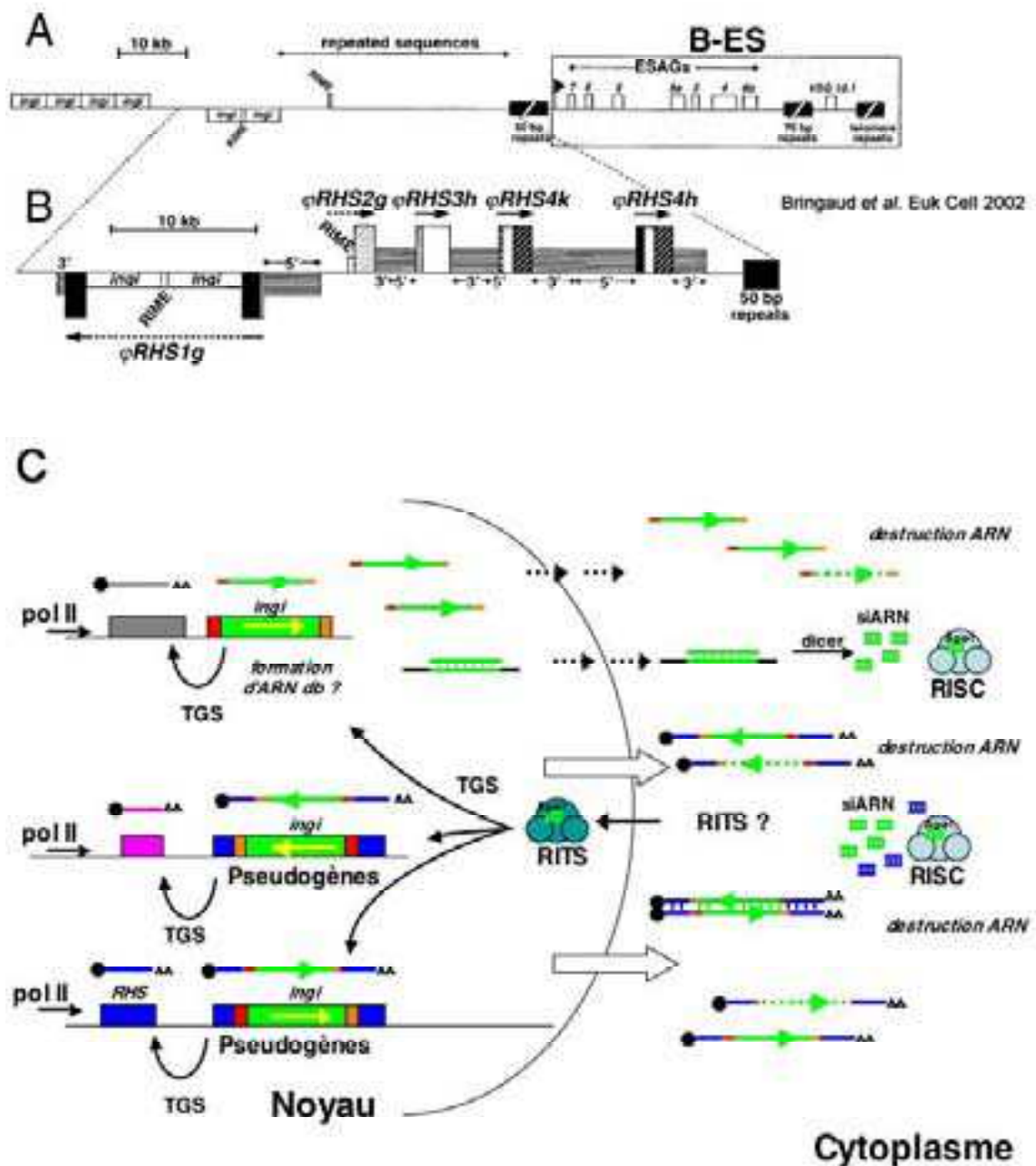


Figure 56 Modèle théorique de la régulation des *RHS* et *ingi* par ARNi

A/ B/ Disposition des pseudogène gènes *RHS* dans le clone BAC-26P8 contenant le site B-ES du *VSG 10.1*. La carte du site B-ES du *VSG 10.1* montre l'orientation des pseudogènes *RHS*. Le sens théorique de la transcription serait de gauche à droite (Bringaud et al. 2002).

C/ Représentation schématique et théorique de la régulation par ARNi des *RHS1* et *ingi*.

III.E Conclusion

En conclusion, nos travaux démontrent que l'expression d'ARN double brin peut entraîner des phénomènes d'extinction à deux niveaux : transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Apparemment, seuls les gènes endogènes sont affectés, alors que les transgènes, exprimés par des ARN polymérases différentes (ARN polymérase T7 ou l'ARN polymérase I) continuent à être transcrits. Si une modification de la chromatine a lieu, il est possible que celle-ci interfère avec la transcription par l'ARN polymérase II, mais pas avec l'activité de l'ARN polymérase I ou de la polymérase T7. Ces deux modes d'extinction sont probablement étroitement impliqués avec le contrôle de l'expression des rétroposons et des gènes associés.

A l'avenir, il sera intéressant d'évaluer la participation éventuelle de ces phénomènes d'extinction par ARN dans le contrôle de la variation antigénique, processus sophistiqué par lequel un seul locus est exprimé parmi 20 candidats de séquence proche.

Matériels &

Méthodes

IV. MATERIELS & METHODES

IV.A Matériels

IV.A.1. Lignées cellulaires

IV.A.1.a La souche *T. brucei* 427 procyclique

La lignée sauvage 427, cultivée au laboratoire, est originaire d'Ouganda (Afrique de l'Est). Cette lignée est cultivée sous la forme procyclique au laboratoire. L'utilisation de la lignée 427 est particulièrement répandue car elle a été utilisée pour l'étude de la variation antigénique, la biochimie du trypanosome et la biologie cellulaire. La souche 427 a été la première lignée de *T. brucei* à avoir été cultivée sous la forme procyclique dans un milieu de culture semi-défini (cf. The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* stock 427 Melville et al. MBP 2000).

IV.A.1.b La lignée procyclique 29-13

La lignée 29-13 est dérivée de la souche 427 procyclique (Wirtz et al. MBP 99). Cette lignée a été successivement transformée de façon stable par le p*Lew13*, codant pour la polymérase du phage T7 auquel on a ajouté un signal de localisation nucléaire et le gène de résistance à la G418 (NEO^R), puis par le p*Lew29* codant la protéine Tet répresseur et le gène de résistance à l'hygromycine (HYG^R). Cette lignée est compétente pour exprimer entre autres, l'insert contenu dans le vecteur plasmidique inducible pZJM (NEO^R) exprimant l'ARNdb (Wang et al. 1998).

IV.A.1.c La lignée *snl-2*.

La lignée *snl2* a été produite par Philippe Bastin dans le laboratoire de Keith Gull à Manchester. Cette lignée transcrit, par le promoteur endogène de la procycline (PARP) et inductible à la tétracycline, l'ARNdb en épingle à cheveux, correspondant au gène codant pour la protéine de la fibre paraflagellaire *PFRA*.

IV.A.2. Le vecteur *pZJM*

Ce vecteur a été construit au laboratoire de Paul Englund. Ce vecteur peut s'intégrer de façon stable par recombinaison homologue chez *T. brucei*. L'intégration est ciblée dans la région intergénique des ARN ribosomiques (voir annexes).

IV.B Méthodes

IV.B.1. Culture cellulaire

Les cellules procycliques sont maintenues à des concentrations cellulaires comprises entre $0.5 \cdot 10^6$ et $15 \cdot 10^6$ cellules/ml. La culture de ces parasites est maintenue dans un milieu semi-défini le SDM-79 avec 10% de sérum de veau foétale décomplémenté et de l'hémine. Les cellules sont maintenues dans des flasques hermétiques à 27°C.

IV.B.2. Transfection par électroporation

Les techniques classiques de transfection (PEI, Lipofectamine...) en plus de toxicité cellulaire fonctionnent mal chez la forme procyclique. La meilleure méthode reste de loin l'électroporation.

IV.B.2.a Stable

10^7 à 10^8 cellules procycliques, sont lavées trois fois dans du Cytomix (120 mM KCl/ 0,15 mM CaCl_2 / 10 mM K_2HPO_4 / 25 mM Hepes (pH7.6) / 2 mM EDTA/ 5 mM MgCl_2) et resuspendues dans 500 μl de Cytomix à 4°C. Pour minimiser les possibilités de dégradation, 10 μg ADN de plasmide linéarisé et stérile sont ajoutés au cellules juste avant l'électroporation. Les cellules sont électroporées par un choc électrique en utilisant l'électroporateur Bio-Rad Gene Pulser set à 1,5 kV / 25 μF dans des cuvettes de 0,4 cm immédiatement transférées dans un milieu de culture frais.

IV.B.2.b Transitoire

Pour les transfactions transitoires, les conditions sont identiques au protocole de transfection stable à l'exception que 20 μg ARNdb sont ajoutés au cellules juste avant l'électroporation. Les cellules sont électroporées par deux chocs électriques à 10 sec d'intervalles en utilisant l'électroporateur Bio-Rad Gene Pulser set à 1,5 kV / 25 μF dans des cuvettes de 0,4 cm et immédiatement transférées dans un milieu de culture frais.

IV.B.3. Western Blot

IV.B.3.a Préparation des échantillons protéiques

Les cellules, à une concentration comprise entre 0.6 et 1.0 10^{+7} cellules, sont collectées par centrifugation et lavées au PBS 1x. Les culots sont resuspendus et bouillis immédiatement dans une solution de Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH6,8 / 2% SDS/ 10% glycérol/ bleue de bromophénol) préchauffé à 70°C avec 20% de β -mercaptoéthanol.

IV.B.3.b Migration, transfert sur membranes et détection

20 μ g d'extraits totaux de protéines sont chargées et séparées sur gel 8% SDS-PAGE (22 cm) et électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose avec 20% méthanol à 4°C. Les membranes sont ensuite colorées à l'encre de chine, rincées, et saturées pour la nuit dans du PBS 1x contenant 5% de lait déshydraté écrémé et 0.05% Nonidet P-40 à 4°C. Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires, lavées 5 fois au PBS1x 0,1% Nonidet-P40 puis incubées avec un anticorps secondaire anti-souris/lapin couplée à la peroxydase. Les membranes sont relavées 5 fois au PBS 1x/ 0,1% Nonidet-P40 et révélées à l'ECL+ (Amersham) sur papier photo (Kodak) ou par le scanner à fluorescence Typhoon (Amersham).

IV.B.4. Immunofluorescence

IV.B.4.a Généralités

Le mode de fixation dépend des besoins spécifiques de l'utilisateur mais aussi du caractère de l'anticorps (IgG ou IgM) ainsi que de l'antigène ciblé. Plusieurs paramètres sont donc à prendre en compte par l'expérimentateur.

IV.B.4.b Fixation au méthanol

Les cellules sont lavées au PBS 1x, déposées puis séchées sur des lames de verre traités à la poly-L-lysine. La fixation est effectuée au méthanol absolu à -20°C pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite réhydratées au PBS 1x pendant 30 minutes puis incubées avec l'anticorps primaire pendant 30 à 45 minutes en chambre humide. Après trois lavages de 10 minutes au PBS 1x, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire anti-souris/lapin conjugué à la isothiocyanate fluorescéine (FITC) ou rhodamine et lavées à nouveau trois fois au PBS 1x. Les lames sont ensuite incubées 2 minutes avec 2µg/ml de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), lavées 10 minutes dans du PBS1x et montées avec des lamelles et du milieu de montage.

IV.B.4.c Fixation au formaldéhyde

Les cellules sont lavées au PBS1x, fixées au PBS1x/ paraformaldéhyde 4% et déposées immédiatement sur des lames de verre traités à la poly-L-lysine pendant 10 minutes. Les lames sont lavées deux fois au PBS 1x pendant 5 minutes et incubées pendant 30 minutes au PBS1x/ Nonidet P-40 à 0,1%. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire pendant 30 à 45 minutes en chambre humide. Après trois lavages de 10 minutes au PBS1x/ Tween-20 à 0,1%, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire anti-souris/lapin conjugué à la isothiocyanate fluorescéine (FITC)- ou rhodamine et lavées à nouveau trois fois au PBS1x/Tween-20 à 0,1%. Les lames sont ensuite incubées 2 minutes avec 2µg/ml de DAPI lavées 10 minutes dans du PBS1x et montées.

IV.B.4.d Fluorescence Assay Cell Sorting (FACS)

Les cellules vivantes sont lavées au PBS et passées au FACS (Becton Dickinson FACScalibur). Les données sont analysées par le logiciel CellQuest Version 3.3.

IV.B.5. Southern Blot

L'ADN total est extrait par le TELT (50 mM Tris-HCl, pH 8, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 49% Triton X-100) (Medina-Acosta, E., et al. MBP 1993) et quantifié par spectrophotométrie. Après digestion par des enzymes de restrictions appropriées, 20 μ g d'ADN génomique est déposé sur un gel à 0,8 % d'agarose TAE 1x. Après coloration du gel et décoloration à l'eau distillée, le gel d'agarose est déposé sous agitation 30 minutes dans une solution dénaturante de 0,5M NaOH et de 1,5 M de NaCl. Les échantillons du gel sont ensuite transférés la nuit par capillarité sur une membrane de nylon HybondN+ (Amersham) membrane. La membrane est ensuite lavée avec 2x SSC, préhybridée avec du RapidHyb buffer (Amersham) à 65°C pendant 30 min et hybridé avec une sonde radioactive à 65°C. La membrane est lavée deux fois 5 minutes dans du 2x SSC et une fois pendant 20 minutes avec du 2x SSC, 0.1% SDS à 65°C. Le signal radioactif est détecté par analyse au Typhoon® 9410 (Amersham) analysis et quantifié en utilisant le logiciel ImageQuant 5.2 2 (Molecular Dynamics).

IV.B.6. Northern Blot

Les ARN totaux sont extraits par la méthode du Trizol® (Life Technologies) suivant les instructions du fabricant. La concentration et la pureté des ARN est déterminé par spectrophotomètre à 260 nm et la qualité est confirmé par gel d'agarose dénaturant.

Les échantillons d'ARN sont chargées dans un gel d'agarose dénaturant Mops-Acétate-EDTA / 1% formaldéhyde. Après migration, le gel est coloré 15 minutes dans de l'eau MilliQ par le bromure d'éthidium (BET) puis lavé pendant 1 à 2 h. La qualité des ARN est analysé sur une table UVB à 312nm. Le gel est ensuite équilibré dans un tampon 15x SSC et transféré pour la nuit sur membrane de nylon N+-Hybond® nylon membranes (Amersham) par capillarité. La membrane est ensuite rincée au 2xSSC puis préhybridé

dans du Rapid-Hyb® buffer (Amersham) et hybridé par une sonde d'ADN radioactive dans la même solution à 65°C pour la nuit. La membrane est ensuite rincée 5 minutes dans du 2x SSC à 50°C et lavées 15 minutes dans du 2x SSC/ 0,1% SDS puis 15 minutes 1x SSC/ 0.1% SDS à 60°C. Les signaux radioactifs sont visualisés par analyse au Typhoon® 9410 (Molecular Dynamics) et quantifiés par le logiciel Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics).

IV.B.7. Fluorescence in situ hybridisation (FISH)

IV.B.7.a Principe

Le principe de la technique du FISH consiste à hybrider des sondes spécifiques fluorescentes sur des chromosomes/locus ou ARN *in situ* dans les cellules. Ces dernières sont fixées préalablement au paraformaldéhyde pour préserver la structure de la cellule en trois dimensions. La difficulté de la technique réside essentiellement dans la préservation de la structure cellulaire, le choix et la spécificité des sondes introduites.

En général, l'hybridation n'est faite qu'à l'aide d'une sonde spécifique mais pour répondre à certaines questions d'ordre biologique, plusieurs sondes marquées avec des fluorophore différents peuvent être introduites dans la cellule. La limitation de ce FISH « multicolore » réside dans le nombre de fluorophore disponible et les filtres de lumières disponibles sur le microscope.

IV.B.7.b FISH avec une sonde Peptide Nucléique Acide (PNA)

Le protocole de fixation des cellules au paraformaldéhyde est le même que celui décrit précédemment pour l'immunofluorescence. Pour éliminer les ARN pouvant gêner l'hybridation, les lames sont ensuite traitées avec 70µg/ml of RNase DNase-free dans le tampon approprié (Tris-HCL 100mM pH7.2/ 1mM NaCl/ 0.05 % Triton X100). On incube 30 minutes at 37°C. On lave et on équilibre 3 fois 5 minutes avec une solution 10 mM Tris pH 7.2. On ajoute sur la lame 10 µl de la solution d'hybridation contenant 70% de formamide, 2µl Cy3-(C3TA2)3 de sonde télomérique PNA (Stock 0.6µg/µl ; Oswel DNA service), 1% de solution bloquante (Roche) dans 10 mM Final Tris pH7.2. Une lamelle (20 x 20mm) est apposée sur les cellules et sellée par de la colle à photo Rubber Sement (photo glue). L'ADN est dénaturé doucement par chauffage pendant 3 minutes à 80°C sur un appareil *in situ* (Hybaid). Les lames sont incubées pendant 16h à 27°C, les lames sont

lavées et agitées vigoureusement avec 70% formamide/10 mM Tris pH 7.2 (2 x 15 min) et 0.05 M Tris 0.15 M NaCl pH 7.5 containing 0.05% Tween-20 (3 x 5 min) à température ambiante. Les lames sont ensuite traitées au DAPI montées avec du milieu de montage VectaShield®, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) et sellées.

IV.B.7.c FISH avec une sonde ADN

Le protocole de fixation des cellules au paraformaldéhyde est le même que celui décrit précédemment pour l'immunofluorescence. Pour éliminer les ARN pouvant gêner l'hybridation, les lames sont ensuite traitées et incubées à 30 minutes à 37°C avec 70 µg/ml of RNase DNase-free dans le tampon approprié (Tris 100mM pH7.2/ 1mM NaCl/ 0.05 % Triton X-100). Les lames sont lavées trois fois 5 minutes avec du SSC 2X. On ajoute sur la lame 10 µl de la solution d'hybridation (50% de formamide/ 200ng de sonde spécifique marqué par random priming/ 1 µg/µl d'ADN de sperme de harreng soniqué, 10% de sulfate de Dextran dans du 2x SSPE final).

Une lamelle (20 x 20mm) est apposée sur les cellules et sellée par de la colle à photo Rubber Sement. L'ADN est dénaturé doucement par chauffage pendant 5-10 minutes à une température comprise entre 80 et 90°C. Les lames sont ensuite incubées pendant 16h à 37°C, les lames sont lavées avec 50% formamide/ 2x SSC à 37°C pendant 30 minutes, lavées ensuite par du 2xSSC à 50°C pendant 10min puis par du 0.2x SSC à 50°C pendant 1 heure.

Les cellules sont ensuite traitées au DAPI et montées comme précédemment décrit.

IV.B.7.d IF & ADN-FISH

Le protocole de fixation au paraformaldéhyde est identique à celui décrit ci-dessus et est suivi des incubations avec les anticorps primaires et secondaires. Les cellules sont ensuite « post-fixées » au 1x PBS/ 3% paraformaldéhyde et traitées ensuite en suivant le protocole FISH-ADN classique.

Bibliographie

V. BIBLIOGRAPHIE

- Agabian, N. (1990) Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*, **61**, 1157-1160.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. and Mukherjee, S.K. (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 657-685.
- Aksoy, S., Williams, S., Chang, S. and Richards, F.F. (1990) SLACS retrotransposon from Trypanosoma brucei gambiense is similar to mammalian LINEs. *Nucleic Acids Res*, **18**, 785-792.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., Sung, G.H., Spatafora, J.W. and Carrington, J.C. (2004) Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in Arabidopsis thaliana. *Nat Genet*, **36**, 1282-1290.
- Alsford, S., Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K. (2001) Diversity and dynamics of the minichromosomal karyotype in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol*, **113**, 79-88.
- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, **431**, 350-355.
- Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T. and Jewell, D. (2003) MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in C. elegans. *Curr Biol*, **13**, 807-818.
- An, D.S., Xie, Y., Mao, S.H., Morizono, K., Kung, S.K. and Chen, I.S. (2003) Efficient lentiviral vectors for short hairpin RNA delivery into human cells. *Hum Gene Ther*, **14**, 1207-1212.
- Aravin, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.V., Vagin, V.V., Rozovsky, Y.M. and Gvozdev, V.A. (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the D. melanogaster germline. *Curr Biol*, **11**, 1017-1027.
- Aslund, L., Carlsson, L., Henriksson, J., Rydaker, M., Toro, G.C., Galanti, N. and Pettersson, U. (1994) A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in Trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol*, **65**, 317-330.
- Aufsatz, W., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2002) RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99 Suppl 4**, 16499-16506.
- Aza-Blanc, P., Cooper, C.L., Wagner, K., Batalov, S., Deveraux, Q.L. and Cooke, M.P. (2003) Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol Cell*, **12**, 627-637.
- Banerjee, D. and Slack, F. (2002) Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *Bioessays*, **24**, 119-129.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- Bastin, P., Ellis, K., Kohl, L. and Gull, K. (2000) Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J Cell Sci*, **113 (Pt 18)**, 3321-3328.
- Bastin, P., Galvani, A. and Sperling, L. (2001) Genetic interference in protozoa. *Res Microbiol*, **152**, 123-129.
- Bastin, P., MacRae, T.H., Francis, S.B., Matthews, K.R. and Gull, K. (1999) Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Mol Cell Biol*, **19**, 8191-8200.

- Bastin, P., Sherwin, T. and Gull, K. (1998) Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature*, **391**, 548.
- Baulcombe, D.C. (1996) Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *Plant Cell*, **8**, 1833-1844.
- Beclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P. and Vaucheret, H. (2002) A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr Biol*, **12**, 684-688.
- Berberof, M., Pays, A., Lips, S., Tebabi, P. and Pays, E. (1996) Characterization of a transcription terminator of the procyclin PARP A unit of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **16**, 914-924.
- Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P. and Allshire, R.C. (2001) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*, **294**, 2539-2542.
- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, R.L. and Bernards, R. (2004) A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, **428**, 431-437.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Bhattacharya, S., Bakre, A. and Bhattacharya, A. (2002) Mobile genetic elements in protozoan parasites. *J Genet*, **81**, 73-86.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U. and Filipowicz, W., (2001) Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **25**, 14428-33.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. and Barik, S. (2005) Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*, **11**, 50-55.
- Blumenthal, T. and Gleason, K.S. (2003) *Caenorhabditis elegans* operons: form and function. *Nat Rev Genet*, **4**, 112-120.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. and Benning, C. (1998) AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *Embo J*, **17**, 170-180.
- Borst, P. (1991) Molecular genetics of antigenic variation. *Immunol Today*, **12**, A29-33.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, **113**, 25-36.
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L. and Iggo, R. (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*, **34**, 263-264.
- Bringaud, F., Biteau, N., Melville, S.E., Hez, S., El-Sayed, N.M., Leech, V., Berriman, M., Hall, N., Donelson, J.E. and Baltz, T. (2002) A new, expressed multigene family containing a hot spot for insertion of retroelements is associated with polymorphic subtelomeric regions of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, **1**, 137-151.
- Bringaud, F., Biteau, N., Zuiderwijk, E., Berriman, M., El-Sayed, N.M., Ghedin, E., Melville, S.E., Hall, N. and Baltz, T. (2004) The *ingi* and *RIME* non-LTR retrotransposons are not randomly distributed in the genome of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biol Evol*, **21**, 520-528.

- 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.
- Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M., Dirac, A.M. and Bernards, R. (2003) Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*, **424**, 797-801.
- Burri, M., Schlimme, W., Betschart, B., Kampf, U., Schaller, J. and Hecker, H. (1993) Biochemical and functional characterization of histone H1-like proteins in procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol Res*, **79**, 649-659.
- Burri, M., Schlimme, W., Betschart, B., Lindner, H., Kampf, U., Schaller, J. and Hecker, H. (1995) Partial amino acid sequence and functional aspects of histone H1 proteins in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol Cell*, **83**, 23-31.
- Calin, G.A., Liu, C.G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., Dell'Aquila, M.L., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T.J., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C.M. (2004) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11755-11760.
- Carmell, M.A. and Hannon, G.J. (2004) RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 214-218.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. and Hannon, G.J. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, **16**, 2733-2742.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. and Cogoni, C. (2000) Gene silencing in worms and fungi. *Nature*, **404**, 245.
- Catez, F., Yang, H., Tracey, K.J., Reeves, R., Misteli, T. and Bustin, M. (2004) Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol Cell Biol*, **24**, 4321-4328.
- Caudy, A.A., Myers, M., Hannon, G.J. and Hammond, S.M. (2002) Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*, **16**, 2491-2496.
- Cavalier-Smith, T. (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev*, **57**, 953-994.
- Cerutti, L., Mian, N. and Bateman, A. (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci*, **25**, 481-482.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. and Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, **303**, 83-86.
- Clayton, C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J*, **21**, 1881-1888.
- Cleveland, D.W., Mao, Y. and Sullivan, K.F. (2003) Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, **112**, 407-421.
- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U. and Macino, G. (1996) Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo J*, **15**, 3153-3163.
- Cogoni, C. and Macino, G. (1997) Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10233-10238.

- Cogoni, C. and Macino, G. (1999) Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, **399**, 166-169.
- Cogoni, C. and Macino, G. (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 638-643.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. and Baulcombe, D.C. (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Embo J*, **20**, 2069-2078.
- DaRocha, W.D., Otsu, K., Teixeira, S.M. and Donelson, J.E. (2004) Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, **133**, 175-186.
- Deflorin, J., Rudolf, M., Seebeck, T., (1994) The major components of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* are two similar, but distinct proteins which are encoded by two different gene loci. *J Biol Chem.*, **46**, 28745-51.
- Depicker, A. and Montagu, M.V. (1997) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 373-382.
- Dernburg, A.F. and Karpen, G.H. (2002) A chromosome RNAissance. *Cell*, **111**, 159-162.
- Ding, B., Itaya, A. and Qi, Y. (2003) Symplasmic protein and RNA traffic: regulatory points and regulatory factors. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 596-602.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., Shen, S. and Ullu, E. (2003) An siRNA ribonucleoprotein is found associated with polyribosomes in *Trypanosoma brucei*. *Rna*, **9**, 802-808.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C. and Ullu, E. (2001) RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *Rna*, **7**, 1522-1530.
- Donelson, J.E. (1995) Mechanisms of antigenic variation in *Borrelia hermsii* and African trypanosomes. *J Biol Chem*, **270**, 7783-7786.
- Donelson, J.E. (1996) Genome research and evolution in trypanosomes. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 699-703.
- Dooner, H.K. and Nelson, O.E. (1977) Genetic control of UDPglucose:flavonol 3-O-glucosyltransferase in the endosperm of maize. *Biochem Genet*, **15**, 509-519.
- Dougherty, W.G. and Parks, T.D. (1995) Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 399-405.
- Downey, N. and Donelson, J.E. (1999) Expression of foreign proteins in *Trypanosoma congolense*. *Mol Biochem Parasitol*, **104**, 39-53.
- Dunbar, D.A., Chen, A.A., Wormsley, S. and Baserga, S.J. (2000) The genes for small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* are organized in clusters and are transcribed as a polycistronic RNA. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2855-2861.
- Durand-Dubief, M. and Bastin, P. (2003) TbAGO1, an Argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Biol*, **1**, 2.

- Durand-Dubief, M., Kohl, L. and Bastin, P. (2003) Efficiency and specificity of RNA interference generated by intra- and intermolecular double stranded RNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **129**, 11-21.
- el-Sayed, N.M. and Donelson, J.E. (1997) A survey of the *Trypanosoma brucei rhodesiense* genome using shotgun sequencing. *Mol Biochem Parasitol*, **84**, 167-178.
- El-Sayed, N.M., Ghedin, E., Song, J., MacLeod, A., Bringaud, F., Larkin, C., Wanless, D., Peterson, J., Hou, L., Taylor, S., Tweedie, A., Biteau, N., Khalak, H.G., Lin, X., Mason, T., Hannick, L., Caler, E., Blandin, G., Bartholomeu, D., Simpson, A.J., Kaul, S., Zhao, H., Pai, G., Van Aken, S., Utterback, T., Haas, B., Koo, H.L., Umayam, L., Suh, B., Gerrard, C., Leech, V., Qi, R., Zhou, S., Schwartz, D., Feldblyum, T., Salzberg, S., Tait, A., Turner, C.M., Ullu, E., White, O., Melville, S., Adams, M.D., Fraser, C.M. and Donelson, J.E. (2003) The sequence and analysis of *Trypanosoma brucei* chromosome II. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4856-4863.
- El-Sayed, N.M., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S.E. and Donelson, J.E. (2000) The African trypanosome genome. *Int J Parasitol*, **30**, 329-345.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001a) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188-200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J*, **20**, 6877-6888.
- Elgin, S.C. and Workman, J.L. (2002) Chromosome and expression mechanisms: a year dominated by histone modifications, transitory and remembered. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 127-129.
- Englund, P.T., Hajduk, S.L. and Marini, J.C. (1982) The molecular biology of trypanosomes. *Annu Rev Biochem*, **51**, 695-726.
- Erondu, N.E. and Donelson, J.E. (1992) Differential expression of two mRNAs from a single gene encoding an HMG1-like DNA binding protein of African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*, **51**, 111-118.
- Ersfeld, K., Docherty, R., Alsford, S. and Gull, K. (1996) A fluorescence in situ hybridisation study of the regulation of histone mRNA levels during the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **81**, 201-209.
- Ersfeld, K. and Gull, K. (1997) Partitioning of large and minichromosomes in *Trypanosoma brucei*. *Science*, **276**, 611-614.
- Ersfeld, K., Melville, S.E. and Gull, K. (1999) Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today*, **15**, 58-63.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. and Vaucheret, H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11650-11654.
- 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**, 2021-2028.
- Feinberg, E.H. and Hunter, C.P. (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, **301**, 1545-1547.
- Ferguson, M.A. (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*, **112** (Pt 17), 2799-2809.

- Ferguson, M.L., Torri, A.F., Perez-Morga, D., Ward, D.C. and Englund, P.T. (1994) Kinetoplast DNA replication: mechanistic differences between *Trypanosoma brucei* and *Crithidia fasciculata*. *J Cell Biol*, **126**, 631-639.
- Fetzer, C.P., Hogan, D.J. and Lipps, H.J. (2002) A PIWI homolog is one of the proteins expressed exclusively during macronuclear development in the ciliate *Stylonychia lemnae*. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4380-4386.
- Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M. and Gill, S.S. (2000) A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*, **245**, 213-221.
- Finnegan, D.J. (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet*, **5**, 103-107.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Flavell, R.B. (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3490-3496.
- Forde, R.M. (1902) Some Clinical Notes on a European Patient whose Blood a *Trypanosoma* was Observed. *J of Trop Med*, **5**, 261-262.
- Fortin, K.R., Nicholson, R.H. and Nicholson, A.W. (2002) Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. *BMC Genomics*, **3**, 26.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J. (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, **408**, 325-330.
- Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T. and Oshimura, M. (2004) Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat Cell Biol*, **6**, 784-791.
- Galvani, A. and Sperling, L. (2001) Transgene-mediated post-transcriptional gene silencing is inhibited by 3' non-coding sequences in *Paramecium*. *Nucleic Acids Res*, **29**, 4387-4394.
- Garcia-Salcedo, J.A., Gijon, P., Amiguet-Vercher, A. and Pays, E. (2003) Searching for promoter activity in RIME/Ingi retrotransposons from *Trypanosoma brucei*: binding of a nuclear protein to their 5' extremity. *Exp Parasitol*, **104**, 140-148.
- Garnier, O., Serrano, V., Duharcourt, S. and Meyer, E. (2004) RNA-mediated programming of developmental genome rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. *Mol Cell Biol*, **24**, 7370-7379.
- Ghedini, E., Bringaud, F., Peterson, J., Myler, P., Berriman, M., Ivens, A., Andersson, B., Bontempi, E., Eisen, J., Angiuoli, S., Wanless, D., Von Arx, A., Murphy, L., Lennard, N., Salzberg, S., Adams, M.D., White, O., Hall, N., Stuart, K., Fraser, C.M. and El-Sayed, N.M. (2004) Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*, **134**, 183-191.
- Gibson, W., Garside, L. and Bailey, M. (1992) Trisomy and chromosome size changes in hybrid trypanosomes from a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. b. brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **51**, 189-199.
- Gilinger, G. and Bellofatto, V. (2001) Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1556-1564.
- Grewal, S.I. and Moazed, D. (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*, **301**, 798-802.

- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**, 349-352.
- Gruter, E. and Betschart, B. (2001) Isolation, characterisation and organisation of histone H1 genes in African trypanosomes. *Parasitol Res*, **87**, 977-984.
- Gu, S. and Rossi, J.J. (2005) Uncoupling of RNAi from active translation in mammalian cells. *Rna*, **11**, 38-44.
- Gull, K. (1999) The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol*, **53**, 629-655.
- Gull, K., Alsford, S. and Ersfeld, K. (1998) Segregation of minichromosomes in trypanosomes: implications for mitotic mechanisms. *Trends Microbiol*, **6**, 319-323.
- Gunzl, A., Ullu, E., Dorner, M., Fragoso, S.P., Hoffmann, K.F., Milner, J.D., Morita, Y., Nguu, E.K., Vanacova, S., Wunsch, S., Dare, A.O., Kwon, H. and Tschudi, C. (1997) Transcription of the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. *Mol Biochem Parasitol*, **85**, 67-76.
- Guo, S. and Kempthues, K.J. (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, **81**, 611-620.
- Hall, I.M., Noma, K. and Grewal, S.I. (2003a) RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 193-198.
- Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A. and Grewal, S.I. (2002) Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*, **297**, 2232-2237.
- Hall, N., Berriman, M., Lennard, N.J., Harris, B.R., Hertz-Fowler, C., Bart-Delabesse, E.N., Gerrard, C.S., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bowman, S., Bray-Allen, S.P., Bringaud, F., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R., Doggett, J., Fraser, A., Gruter, E., Hall, S., Harper, A.D., Kay, M.P., Leech, V., Mayes, R., Price, C., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Reitter, C., Rutherford, K., Sasse, J., Sharp, S., Shownkeen, R., MacLeod, A., Taylor, S., Tweedie, A., Turner, C.M., Tait, A., Gull, K., Barrell, B. and Melville, S.E. (2003b) The DNA sequence of chromosome I of an African trypanosome: gene content, chromosome organisation, recombination and polymorphism. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4864-4873.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J*, **21**, 4671-4679.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293-296.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. and Hannon, G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**, 1146-1150.
- Hansen, K.R., Burns, G., Mata, J., Volpe, T.A., Martienssen, R.A., Bahler, J. and Thon, G. (2005) Global effects on gene expression in fission yeast by silencing and RNA interference machineries. *Mol Cell Biol*, **25**, 590-601.
- Hartmann, C., Hotz, H.R., McAndrew, M. and Clayton, C. (1998) Effect of multiple downstream splice sites on polyadenylation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **93**, 149-152.
- Hasan, G., Turner, M.J. and Cordingley, J.S. (1984) Complete nucleotide sequence of an unusual mobile element from *trypanosoma brucei*. *Cell*, **37**, 333-341.

- He, L. and Hannon, G.J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, **5**, 522-531.
- Hope, M., MacLeod, A., Leech, V., Melville, S., Sasse, J., Tait, A. and Turner, C.M. (1999) Analysis of ploidy (in megabase chromosomes) in *Trypanosoma brucei* after genetic exchange. *Mol Biochem Parasitol*, **104**, 1-9.
- Horn, D. (2001) Nuclear gene transcription and chromatin in *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol*, **31**, 1157-1165.
- Horn, D. and Cross, G.A. (1995) A developmentally regulated position effect at a telomeric locus in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, **83**, 555-561.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T. and Zamore, P.D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, **293**, 834-838.
- Ishizuka, A., Siomi, M.C. and Siomi, H. (2002) A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev*, **16**, 2497-2508.
- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. and Linsley, P.S. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, **21**, 635-637.
- Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betschart, B., Le Page, R.W., Wells, J.M., Tait, A., Paindavoine, P., Pays, E. and Steinert, M. (1986) Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, **322**, 173-175.
- Jensen, S., Gassama, M.P. and Heidmann, T. (1999) Cosuppression of I transposon activity in *Drosophila* by I-containing sense and antisense transgenes. *Genetics*, **153**, 1767-1774.
- Jones, L., Hamilton, A.J., Voinnet, O., Thomas, C.L., Maule, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell*, **11**, 2291-2301.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, **421**, 231-237.
- Kanmogne, G.D., Bailey, M. and Gibson, W.C. (1997) Wide variation in DNA content among isolates of *Trypanosoma brucei* ssp. *Acta Trop*, **63**, 75-87.
- Kawasaki, H. and Taira, K. (2004) Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*, **431**, 211-217.
- Kazazian, H.H., Jr. (1998) Mobile elements and disease. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 343-350.
- Kazazian, H.H., Jr. (2000) Genetics. L1 retrotransposons shape the mammalian genome. *Science*, **289**, 1152-1153.
- Kennerdell, J.R. and Carthew, R.W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, **95**, 1017-1026.
- Kennerdell, J.R., Yamaguchi, S. and Carthew, R.W. (2002) RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes Dev*, **16**, 1884-1889.
- Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G. and Plasterk, R.H. (1999) Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, **99**, 133-141.

- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209-216.
- Kimmel, B.E., ole-MoiYoi, O.K. and Young, J.R. (1987) Ingi, a 5.2-kb dispersed sequence element from *Trypanosoma brucei* that carries half of a smaller mobile element at either end and has homology with mammalian LINES. *Mol Cell Biol*, **7**, 1465-1475.
- Kinghorn A., Y.W. (1912) One the Transmission of Human Trypanosomes by *Glossina morsitans*, and on the Occurrence of Human Trypanosomes in Game. *Ann Trop Med Parasitol*, **6**, 1-23.
- Knight, S.W. and Bass, B.L. (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **293**, 2269-2271.
- Kohl, L., Robinson, D. and Bastin, P. (2003a) [The flagellum: from cell motility to morphogenesis]. *J Soc Biol*, **197**, 379-387.
- Kohl, L., Robinson, D. and Bastin, P. (2003b) Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *Embo J*, **22**, 5336-5346.
- LaCount, D.J., Bruse, S., Hill, K.L. and Donelson, J.E. (2000) Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. *Mol Biochem Parasitol*, **111**, 67-76.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., and Tuschl T. (2001) An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 853-858.
- Lamontagne, B., Ghazal, G., Lebars, I., Yoshizawa, S., Fourmy, D. and Elela, S.A. (2003) Sequence dependence of substrate recognition and cleavage by yeast RNase III. *J Mol Biol*, **327**, 985-1000.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415-419.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W. (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, **117**, 69-81.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V., (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-54.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Burge, C.B. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, **115**, 787-798.
- Liang, X.H., Haritan, A., Uliel, S. and Michaeli, S. (2003a) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*, **2**, 830-840.
- Liang, X.H., Liu, Q. and Michaeli, S. (2003b) Small nucleolar RNA interference induced by antisense or double-stranded RNA in trypanosomatids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7521-7526.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, **433**, 769-73.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. and Dougherty, W.G. (1993) Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *Plant Cell*, **5**, 1749-1759.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. and Sattler, M. (2003) Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, **426**, 465-469.

- Lingel, A., Simon, B., Izaurre, E. and Sattler, M. (2004) Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 576-577.
- Lippman, Z. and Martienssen, R. (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, **431**, 364-370.
- Lips, S., Revelard, P. and Pays, E. (1993) Identification of a new expression site-associated gene in the complete 30.5 kb sequence from the AnTat 1.3A variant surface protein gene expression site of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **62**, 135-137.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004a) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437-1441.
- Liu, J., He, Y., Amasino, R. and Chen, X. (2004b) siRNAs targeting an intronic transposon in the regulation of natural flowering behavior in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **18**, 2873-2878.
- Liu, L., Liang, X.H., Uziel, S., Unger, R., Ullu, E. and Michaeli, S. (2002) RNA interference of signal peptide-binding protein SRP54 elicits deleterious effects and protein sorting defects in trypanosomes. *J Biol Chem*, **277**, 47348-47357.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P. and Wang, X. (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, **301**, 1921-1925.
- Liu, Y., Mochizuki, K. and Gorovsky, M.A. (2004c) Histone H3 lysine 9 methylation is required for DNA elimination in developing macronuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1679-1684.
- Lohmann, J.U., Endl, I. and Bosch, T.C. (1999) Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev Biol*, **214**, 211-214.
- Lorenz, P., Maier, A.G., Baumgart, E., Erdmann, R. and Clayton, C. (1998) Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex11p. *Embo J*, **17**, 3542-3555.
- Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L. and Baulcombe, D.C. (2003) High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *Embo J*, **22**, 5690-5699.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. and Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **303**, 95-98.
- Ma, J.B., Ye, K. and Patel, D.J. (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, **429**, 318-322.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T.L., Postlethwait, P. and Nellen, W. (2002) RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol Biol Cell*, **13**, 445-453.
- Maslov, D.A., Podlipaev, S.A. and Lukes, J. (2001) Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **96**, 397-402.
- Maslov, D.A., Yasuhira, S. and Simpson, L. (1999) Phylogenetic affinities of *Diplonema* within the Euglenozoa as inferred from the SSU rRNA gene and partial COI protein sequences. *Protist*, **150**, 33-42.
- Matthews, K.R. (1999) Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today*, **15**, 76-80.

- Matthews, K.R., Sherwin, T. and Gull, K. (1995) Mitochondrial genome repositioning during the differentiation of the African trypanosome between life cycle forms is microtubule mediated. *J Cell Sci*, **108** (Pt 6), 2231-2239.
- Matthews, K.R., (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei* *J Cell Sci.*, **118**:283-90.
- Matzke, A.J. and Matzke, M.A. (1995) trans-inactivation of homologous sequences in *Nicotiana tabacum*. *Curr Top Microbiol Immunol*, **197**, 1-14.
- Matzke, M., Aufsatz, W., Kanno, T., Daxinger, L., Papp, I., Mette, M.F. and Matzke, A.J. (2004) Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 129-141.
- McCaffrey, A.P. and Kay, M.A. (2002) A story of mice and men. *Gene Ther*, **9**, 1563.
- McCaffrey, A.P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F.H., Xu, H., Wieland, S.F., Marion, P.L. and Kay, M.A. (2003) Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*, **21**, 639-644.
- McNally, K.P. and Agabian, N. (1992) *Trypanosoma brucei* spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. *Mol Cell Biol*, **12**, 4844-4851.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, **15**, 185-197.
- Melville, S.E., Gerrard, C.S. and Blackwell, J.M. (1999) Multiple causes of size variation in the diploid megabase chromosomes of African trypanosomes. *Chromosome Res*, **7**, 191-203.
- Melville, S.E., Leech, V., Gerrard, C.S., Tait, A. and Blackwell, J.M. (1998) The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* and the assignment of chromosome markers. *Mol Biochem Parasitol*, **94**, 155-173.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. and Matzke, A.J. (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J*, **19**, 5194-5201.
- Metzlaff, M., O'Dell, M., Cluster, P.D. and Flavell, R.B. (1997) RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell*, **88**, 845-854.
- Mizrokhi, L.J., Georgieva, S.G. and Ilyin, Y.V. (1988) jockey, a mobile *Drosophila* element similar to mammalian LINEs, is transcribed from the internal promoter by RNA polymerase II. *Cell*, **54**, 685-691.
- Mochizuki, K., Fine, N.A., Fujisawa, T. and Gorovsky, M.A. (2002) Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell*, **110**, 689-699.
- Mochizuki, K. and Gorovsky, M.A. (2004a) Conjugation-specific small RNAs in *Tetrahymena* have predicted properties of scan (scn) RNAs involved in genome rearrangement. *Genes Dev*, **18**, 2068-2073.
- Mochizuki, K. and Gorovsky, M.A. (2004b) Small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 181-187.
- Mochizuki, K. and Gorovsky, M.A. (2005) A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase. *Genes Dev*, **19**, 77-89.
- Morel, J.B., Mourrain, P., Beclin, C. and Vaucheret, H. (2000) DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, **10**, 1591-1594.

- Morris, J.C., Wang, Z., Drew, M.E. and Englund, P.T. (2002) Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library. *Embo J*, **21**, 4429-4438.
- Motyka, S.A. and Englund, P.T. (2004) RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 362-368.
- Motyka, S.A., Zhao, Z., Gull, K. and Englund, P.T. (2004) Integration of pZJM library plasmids into unexpected locations in the *Trypanosoma brucei* genome. *Mol Biochem Parasitol*, **134**, 163-167.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A. and Vaucheret, H. (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, **101**, 533-542.
- Murchison, E.P. and Hannon, G.J. (2004) miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 223-229.
- Murphy, N.B., Pays, A., Tebabi, P., Coquelet, H., Guyaux, M., Steinert, M. and Pays, E. (1987) *Trypanosoma brucei* repeated element with unusual structural and transcriptional properties. *J Mol Biol*, **195**, 855-871.
- Myler, P.J., Audleman, L., deVos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A. and Stuart, K. (1999) *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2902-2906.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
- Navarro, M. and Gull, K. (2001) A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, **414**, 759-763.
- Nelson, C. L., Lee, P. L., Earl, G. W. Bartel D. P. (2001) An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 858-862.
- Ngo, 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.
- Noma, K., Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Zofall, M., Jia, S., Moazed, D. and Grewal, S.I. (2004) RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet*, **36**, 1174-1180.
- Obado, S.O., Taylor, M.C., Wilkinson, S.R., Bromley, E.V. and Kelly, J.M. (2005) Functional mapping of a trypanosome centromere by chromosome fragmentation identifies a 16-kb GC-rich transcriptional "strand-switch" domain as a major feature. *Genome Res*, **15**, 36-43.
- Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T. and Gull, K. (2000) Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma*, **108**, 501-513.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. and Siomi, M.C. (2004) Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev*, **18**, 1655-1666.
- Paddison, P.J., Silva, J.M., Conklin, D.S., Schlabach, M., Li, M., Aruleba, S., Balija, V., O'Shaughnessy, A., Gnoj, L., Scobie, K., Chang, K., Westbrook, T., Cleary, M., Sachidanandam, R., McCombie, W.R., Elledge, S.J. and Hannon, G.J. (2004) A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature*, **428**, 427-431.

- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. and Birchler, J.A. (2002) RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol Cell*, **9**, 315-327.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M. and Vaucheret, H. (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *Embo J*, **16**, 4738-4745.
- Pandolfini, T., Molesini, B., Avesani, L., Spena, A. and Polverari, A. (2003) Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the roIC promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. *BMC Biotechnol*, **3**, 7.
- Panigrahi, A.K., Schnauffer, A., Ernst, N.L., Wang, B., Carmean, N., Salavati, R. and Stuart, K. (2003) Identification of novel components of *Trypanosoma brucei* editosomes. *Rna*, **9**, 484-492.
- Partridge, J.F., Scott, K.S., Bannister, A.J., Kouzarides, T. and Allshire, R.C. (2002) cis-acting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site. *Curr Biol*, **12**, 1652-1660.
- Pays, E. and Nolan, D.P. (1998) Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **91**, 3-36.
- Pays, E., Tebabi, P., Pays, A., Coquelet, H., Revelard, P., Salmon, D. and Steinert, M. (1989) The genes and transcripts of an antigen gene expression site from *T. brucei*. *Cell*, **57**, 835-45.
- Pedram, M. and Donelson, J.E. (1999) The anatomy and transcription of a monocistronic expression site for a metacyclic variant surface glycoprotein gene in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, **274**, 16876-16883.
- Ploubidou, A., Robinson, D.R., Docherty, R.C., Ogbadoyi, E.O. and Gull, K. (1999) Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. *J Cell Sci*, **112** (Pt 24), 4641-4650.
- Provost, P., Silverstein, R.A., Dishart, D., Walfridsson, J., Djupedal, I., Kniola, B., Wright, A., Samuelsson, B., Radmark, O. and Ekwall, K. (2002) Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16648-16653.
- Ragab, A. and Travers, A. (2003) HMG-D and histone H1 alter the local accessibility of nucleosomal DNA. *Nucleic Acids Res*, **31**, 7083-7089.
- Rand, T.A., Ginalski, K., Grishin, N.V. and Wang, X. (2004) Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14385-14389.
- Redmond, S., Vadivelu, J. and Field, M.C. (2003) RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **128**, 115-118.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, **16**, 1616-1626.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, **110**, 513-520.
- Robertson, H.D., Webster, R.E. and Zinder, N.D. (1968) Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **243**, 82-91.
- 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, K.A. and Beverley, S.M. (2003) Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, **128**, 217-228.
- Rocak, S. and Linder, P. (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 232-241.
- Rosalind, C., Lee and Ambros V., (2001) Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, **294**, 862-864.
- Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., Bouvier, F., Camara, B. and Giuliano, G. (2000) Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J*, **24**, 413-419.
- Rudenko, G., Blundell, P.A., Dirks-Mulder, A., Kieft, R. and Borst, P. (1995) A ribosomal DNA promoter replacing the promoter of a telomeric VSG gene expression site can be efficiently switched on and off in *T. brucei*. *Cell*, **83**, 547-553.
- Rudenko, G., Chaves, I., Dirks-Mulder, A. and Borst, P. (1998) Selection for activation of a new variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei* can result in deletion of the old one. *Mol Biochem Parasitol*, **95**, 97-109.
- Ruiz, F., Vayssie, L., Klotz, C., Sperling, L. and Madeddu, L. (1998) Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell*, **9**, 931-943.
- Rusconi, F., Durand-Dubief, M. and Bastin, P. (2005) Functional complementation of RNA interference mutants in trypanosomes. *BMC Biotechnol.*, **5**, 6.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A. and Sanger, H.L. (1993) RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *J Biol Chem*, **268**, 11858-11867.
- Schiebel, W., Pelissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sanger, H.L. and Wassenegger, M. (1998) Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell*, **10**, 2087-2101.
- Schneider, A., Martin, J. and Agabian, N. (1994) A nuclear encoded tRNA of *Trypanosoma brucei* is imported into mitochondria. *Mol Cell Biol*, **14**, 2317-2322.
- Schramke, V. and Allshire, R. (2003) Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science*, **301**, 1069-1074.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199-208.
- Sherwin, T., and Gull, K., (1989) The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **323**, 573-88.
- Shi, H., Chamond, N., Tschudi, C. and Ullu, E. (2004a) Selection and characterization of RNA interference-deficient trypanosomes impaired in target mRNA degradation. *Eukaryot Cell*, **3**, 1445-1453.
- Shi, H., Djikeng, A., Tschudi, C. and Ullu, E. (2004b) Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Mol Cell Biol*, **24**, 420-427.
- Shi, H., Ullu, E. and Tschudi, C. (2004c) Function of the Trypanosome Argonaute 1 protein in RNA interference requires the N-terminal RGG domain and arginine 735 in the Piwi domain. *J Biol Chem*, **279**, 49889-49893.

- Sigova, A., Rhind, N. and Zamore, P.D. (2004) A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev*, **18**, 2359-2367.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. and Fire, A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, **107**, 465-476.
- Sijen, T. and Plasterk, R.H. (2003) Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature*, **426**, 310-314.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. and Williams, B.R. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, **5**, 834-839.
- Sledz, C.A. and Williams, B.R. (2004) RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans*, **32**, 952-956.
- Smardon, A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N. and Maine, E.M. (2000) EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol*, **10**, 169-178.
- Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P. and Lieberman, J. (2003a) RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, **9**, 347-351.
- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2003b) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*, **10**, 1026-1032.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**, 1434-1437.
- Sontheimer, E.J. (2005) Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 127-138.
- Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W. (2004) Molecular biology. Argonaute journeys into the heart of RISC. *Science*, **305**, 1409-1410.
- Soto, M., Requena, J.M., Morales, G. and Alonso, C. (1994) The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta*, **1219**, 533-535.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. and Vornlocher, H.P. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, **432**, 173-178.
- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2003) Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol*, **1**, E60.
- Stephens JWW, F.H. (1910) On the Peculiar Morphology of a Trypanosome from a Case of Sleeping Sickness and the Possibility of its being a New Species (*T. rhodesiense*). *Proc R Soc Lond*, **83**, 22-33.
- Stuart, K., Allen, T.E., Kable, M.L. and Lawson, S. (1997) Kinetoplastid RNA editing: complexes and catalysts. *Curr Opin Chem Biol*, **1**, 340-346.
- Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H. and Schultz, R.M. (2000) Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*, **127**, 4147-4156.

- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. and Mello, C.C. (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, **99**, 123-132.
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H. and Mello, C.C. (2002) The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*, **109**, 861-871.
- Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W. and Hobman, T.C. (2004) Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep*, **5**, 189-194.
- Tait, A., Turner, C.M., Le Page, R.W. and Wells, J.M. (1989) Genetic evidence that metacyclic forms of *Trypanosoma brucei* are diploid. *Mol Biochem Parasitol*, **37**, 247-255.
- Taverna, S.D., Coyne, R.S. and Allis, C.D. (2002) Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell*, **110**, 701-711.
- Terry, R.S., Smith, J.E., Duncanson, P. and Hide, G. (2001) MGE-PCR: a novel approach to the analysis of *Toxoplasma gondii* strain differentiation using mobile genetic elements. *Int J Parasitol*, **31**, 155-161.
- Tewari, M. and Vidal, M. (2003) RNAi on the apoptosis TRAIL: the mammalian cell genetic screen comes of age. *Dev Cell*, **5**, 534-535.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F., Okihara, K.L., Sijen, T. and Plasterk, R.H. (2002a) RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science*, **295**, 694-697.
- Tijsterman, M., Okihara, K.L., Thijssen, K. and Plasterk, R.H. (2002b) PPW-1, a PAZ/PIWI protein required for efficient germline RNAi, is defective in a natural isolate of *C. elegans*. *Curr Biol*, **12**, 1535-1540.
- Tilley, A., Welburn, S.C., Fevre, E.M., Feil, E.J. and Hide, G. (2003) *Trypanosoma brucei*: trypanosome strain typing using PCR analysis of mobile genetic elements (MGE-PCR). *Exp Parasitol*, **104**, 26-32.
- Timmons, L., Court, D.L. and Fire, A. (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, **263**, 103-112.
- Timmons, L. and Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, **395**, 854.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. and Zamore, P.D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, **306**, 1377-1380.
- Toro, G.C. and Galanti, N. (1990) *Trypanosoma cruzi* histones. Further characterization and comparison with higher eukaryotes. *Biochem Int*, **21**, 481-490.
- Toro, G.C., Wernstedt, C., Medina, C., Jaramillo, N., Hellman, U. and Galanti, N. (1992) Extremely divergent histone H4 sequence from *Trypanosoma cruzi*: evolutionary implications. *J Cell Biochem*, **49**, 266-271.
- Turner, C.M., Melville, S.E. and Tait, A. (1997) A proposal for karyotype nomenclature in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today*, **13**, 5-6.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. and Sharp, P.A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, **13**, 3191-3197.
- 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 U S A*, **88**, 10074-10078.

- Ullu, E., Tschudi, C. and Chakraborty, T. (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol*, **6**, 509-519.
- Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C. (2002) Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell*, **14**, 857-867.
- Van der Ploeg, L.H., Cornelissen, A.W., Michels, P.A. and Borst, P. (1984) Chromosome rearrangements in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, **39**, 213-221.
- Van der Ploeg, L.H., Smith, C.L., Polvere, R.I. and Gottesdiener, K.M. (1989) Improved separation of chromosome-sized DNA from *Trypanosoma brucei*, stock 427-60. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3217-3227.
- Vanhamme, L. and Pays, E. (1995) Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev*, **59**, 223-240.
- Vanhamme, L. and Pays, E. (2004) The trypanosome lytic factor of human serum and the molecular basis of sleeping sickness. *Int J Parasitol*, **34**, 887-898.
- Vassella, E., Roditi, I. and Braun, R. (1996) Heterogeneous transcripts of RIME/ingi retroposons in *Trypanosoma brucei* are unspliced. *Mol Biochem Parasitol*, **82**, 131-135.
- Vastenhouw, N.L., Fischer, S.E., Robert, V.J., Thijssen, K.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. and Plasterk, R.H. (2003) A genome-wide screen identifies 27 genes involved in transposon silencing in *C. elegans*. *Curr Biol*, **13**, 1311-1316.
- Vastenhouw, N.L. and Plasterk, R.H. (2004) RNAi protects the *Caenorhabditis elegans* germline against transposition. *Trends Genet*, **20**, 314-319.
- Vaucheret, H., Beclin, C. and Fagard, M. (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci*, **114**, 3083-3091.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I. and Moazed, D. (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, **303**, 672-676.
- Vickerman, K. (1969) The fine structure of *Trypanosoma congolense* in its bloodstream phase. *J Protozool*, **16**, 54-69.
- Volpe, T., Schramke, V., Hamilton, G.L., White, S.A., Teng, G., Martienssen, R.A. and Allshire, R.C. (2003) RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res*, **11**, 137-146.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.
- 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.
- Wargelius, A., Ellingsen, S. and Fjose, A. (1999) Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 156-161.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Sanger, H.L. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, **76**, 567-576.
- Wassenegger, M. and Pelissier, T. (1998) A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol Biol*, **37**, 349-362.

- Waterhouse, P.M., Graham, M.W. and Wang, M.B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13959-13964.
- Waterhouse, P.M. and Helliwell, C.A. (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet*, **4**, 29-38.
- Weiden, M., Osheim, Y.N., Beyer, A.L. and Van der Ploeg, L.H. (1991) Chromosome structure: DNA nucleotide sequence elements of a subset of the minichromosomes of the protozoan *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **11**, 3823-3834.
- Wianny, F. and Zernicka-Goetz, M. (2000) Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, **2**, 70-75.
- Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K. (2003a) The mitotic stability of the minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **132**, 97-100.
- Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K. (2003b) Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 360-375, table of contents.
- 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.
- Williams, R.W. and Rubin, G.M. (2002) ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6889-6894.
- Winston, W.M., Molodowitch, C. and Hunter, C.P. (2002) Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, **295**, 2456-2459.
- Wirtz, E. and Clayton, C. (1995) Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science*, **268**, 1179-1183.
- Wu-Scharf, D., Jeong, B., Zhang, C. and Cerutti, H. (2000) Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science*, **290**, 1159-1162.
- Xiong, Y. and Eickbush, T.H. (1988) Similarity of reverse transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns. *Mol Biol Evol*, **5**, 675-690.
- Xu, Y., Liu, L., Lopez-Estrano, C. and Michaeli, S. (2001) Expression studies on clustered trypanosomatid box C/D small nucleolar RNAs. *J Biol Chem*, **276**, 14289-14298.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L. and Zhou, M.M. (2003) Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, **426**, 468-474.
- Yao, M.C., Fuller, P. and Xi, X. (2003) Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense. *Science*, **300**, 1581-1584.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J. and Lucas, W.J. (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, **16**, 1979-2000.
- Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin, G.M., Mulligan, J. and Schellenberg, G.D. (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, **272**, 258-262.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.

- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. and Filipowicz, W. (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, **118**, 57-68.
- Zhang, W., Yang, H., Kong, X., Mohapatra, S., Juan-Vergara, H.S., Hellermann, G., Behera, S., Singam, R., Lockey, R.F. and Mohapatra, S.S. (2005) Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med*, **11**, 56-62.
- Zhou, J., Yao, J. and Joshi, H.C. (2002) Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci*, **115**, 3547-3555.
- Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716-719.
- Zomerdijk, J.C., Kieft, R. and Borst, P. (1992) A ribosomal RNA gene promoter at the telomere of a mini-chromosome in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*, **20**, 2725-2734.

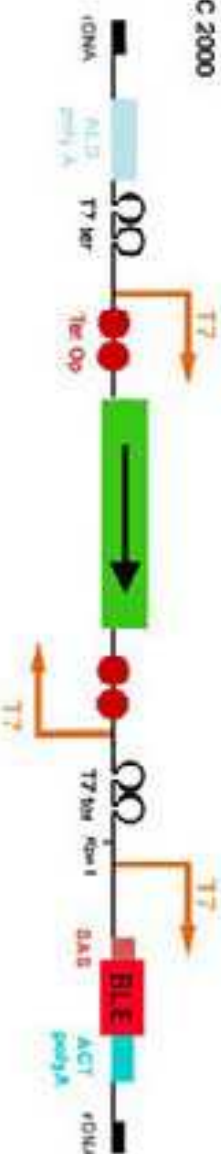
Annexes

VI. ANNEXES

Vecteurs plasmidiques

PZJM

Wang et al. JBC 2000



Lignées cellulaires

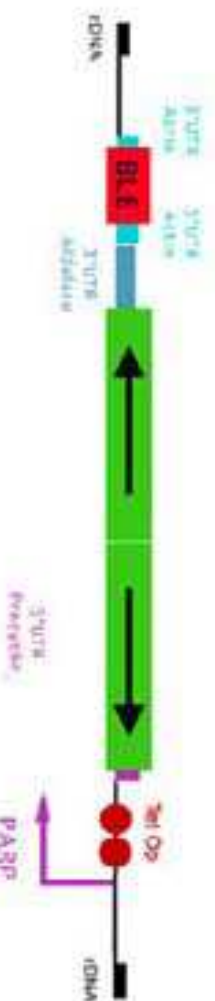
PFRAl
 PZJM-PFRC
 PZJM-RBN
 PZJM-PAR2
 PZJM-Mdp2
 PZJM-SLACS
 PZJM-*ingi*
 PZJM-TbAGO1
 PZJM-TbPW11

Lignées d'origine

29-13

PT4αα (*snl-2*)

Bestin et al. JCS 2000

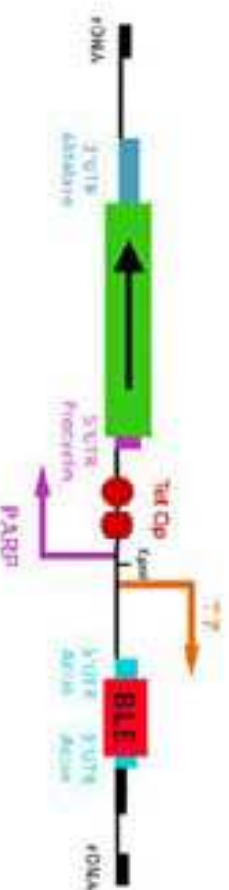


snl-2
 WT-T4αα (constitutive)
 KO-T4αα (constitutive)

WT
TbAGO1-/- (WT)

PLEW100

Wirtz et al. MBP 1995



PLEW-SLACsSens
 PLEW-SLACsSantisans

29-13

Search for

[Limits](#)
[Preview/Index](#)
[History](#)
[Clipboard](#)
[Details](#)

Range: from to Features: SNP CDD MGC HPRD

1: [AAR10810](#). Reports argonaute-like pr...[gi:38073253]

[BLink](#), [Domains](#), [Links](#)

LOCUS AAR10810 892 aa linear INV 09-JAN-2004

DEFINITION argonaute-like protein 1 [Trypanosoma brucei].

ACCESSION AAR10810

VERSION AAR10810.1 GI:38073253

DBSOURCE accession [AY433802.1](#)

KEYWORDS .

SOURCE Trypanosoma brucei

ORGANISM [Trypanosoma brucei](#)

Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae; Trypanosoma.

REFERENCE 1 (residues 1 to 892)

AUTHORS Durand-Dubief,M. and Bastin,P.

TITLE TbAG01, an Argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in Trypanosoma brucei

JOURNAL BMC Biol. 1 (1), 2 (2003)

PUBMED [14670085](#)

REFERENCE 2 (residues 1 to 892)

AUTHORS Bastin,P. and Durand-Dubief,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (09-OCT-2003) Biophysique, MNHN, 43, rue Cuvier, Paris 75231

COMMENT Method: conceptual translation supplied by author.

FEATURES

Location/Qualifiers

source

1..892
/organism="Trypanosoma brucei"
/db_xref="taxon:5691"

[Protein](#)

1..892
/product="argonaute-like protein 1"
/name="TbAG01"

[CDS](#)

1..892
/coded_by="AY433802.1:1..2679"
/note="required for RNA interference"

ORIGIN

```

1 msdwergyrg grgggggrr grggggggr rggrgggeg yrggrggge gyrggrgggf
61 gdgayrtgqt rerdavvsfa kagmydrpve awtnllplyi dprkcafiyp lsiemkdgap
121 dlrervkvla sknmlkmrk esgedafdvd nmcvctgssi icptrlpae ynyeltvnr
181 kgkgktvtyt ytltlkqats cslnpkertm elncvigsav qecyeevgt kfvdlkngkk
241 natgtisife avsvkafstv irgkendvlq ldvslpvasa mdcltamede rrrargsirr
301 alaerfikkk vysvdkrsra tmytvlditd nkacdaaglk qnpsqtyvey frdrygihie
361 pqqalfkcert ndgrrvvlvp pqvlhemsln eqdrrqlpql csifpdrvq rllrvierli
421 qheggrvkvf leaygisfgk dfvsvdgqvl kspeilipkg dgfrrvspqs essqqgfvke
481 lkdlrhpgar qtdvvlvlyde tnnkqgtvvv gnikkyldgm saplnfgdsi pvrslkeakg
541 rlgknifgvt flrrperepy aewkaswsgg galsqvvakd ltggressiv mavaqqicak
601 tgrlnwtldv nqvcplaks dspggiliia advgrdqrsv atessavrqe ffavafvsfy
661 vkgtqwstyc nhyqvnrke tlyadgsdcd ttsmsegpp tpseviskm gefvqeaksh
721 ftskgnavsa ylvrgcase gelldarksd vdlvsevlkg sswavvagqr yqhsrfafqa
781 pddrtmycna prgfvtaega dkkfgeaffl tganctlgha rstlyvvskr kgfdlgelqa
841 llygmcflyp nktdalplpl plkcaaeygr kysaltnlkt lggnlrttmh yl

```

Search for

[Limits](#)
[Preview/Index](#)
[History](#)
[Clipboard](#)
[Details](#)

Range: from to Features: SNP CDD MGC HPRD

1: [AAR10811](#). Reports PIWI-like protein...[gi:38073255]

[BLink](#), [Domains](#), [Links](#)

LOCUS AAR10811 1103 aa linear INV 09-JAN-2004

DEFINITION PIWI-like protein 1 [Trypanosoma brucei].

ACCESSION AAR10811

VERSION AAR10811.1 GI:38073255

DBSOURCE accession [AY433803.1](#)

KEYWORDS .

SOURCE Trypanosoma brucei

ORGANISM [Trypanosoma brucei](#)

Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae; Trypanosoma.

REFERENCE 1 (residues 1 to 1103)

AUTHORS Durand-Dubief,M. and Bastin,P.

TITLE TbAGO1, an Argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in Trypanosoma brucei

JOURNAL BMC Biol. 1 (1), 2 (2003)

PUBMED [14670085](#)

REFERENCE 2 (residues 1 to 1103)

AUTHORS Bastin,P. and Durand-Dubief,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (09-OCT-2003) Biophysique, MNHN, 43, rue Cuvier, Paris 75231, France

COMMENT Method: conceptual translation supplied by author.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1103
/organism="Trypanosoma brucei"
/db_xref="taxon:5691"

[Protein](#) 1..1103
/product="PIWI-like protein 1"
/name="TbPW11"

[CDS](#) 1..1103
/coded_by="AY433803.1:1..3312"

ORIGIN

```

1 mrrrtlrcmi paassssts aiarrqqqq qrhhsqqnn wrcaptfnes nvltetnasa
61 avrsgssksl wlcearqvtl sdvkrdyisk rlldktrfv vrqrlregga tsnffpllfs
121 qpivlysyei eatrrplhal kapsgeevps qcrggktgkt rkgkskitap ekissvpvrr
181 vecsrawrav qrylrrclpn applvnlrqq iyttaplrvv alqlppecl d lgwvecklhf
241 rgktkltemd saemqetvnk ivlwalrngg snqkghqfcv areangkvvh ihdavsvdgl
301 rvfkgtlira tfvssgdae dvpsptvvlp pstavlk tla agdygakklr flveefvrgf
361 vfkernvhsy kiadasgttq aslwdateet klkvgciyev tdyrvrvfes hngmrlvemt
421 vgktsfnvnm sqqdevttge eaddngkaks kesrkdvkkl rskcgkeasa geerkhqhqq
481 iekdeakrim kntsdsgslp hctgkltlki dtkctvatel slweevkqhf grgpydpame
541 eriarsvqgt pvvisttlrh sivrlvrfnm vatevnlept lqhlirelep gppyavlvdy
601 svvplqalhc cydprtrswq dtsvtacsfm psqrleilel fraklesamq pwgitvapkp
661 llskalslp apqkvsp fak ktndtsivn dnsngrlsv apngsvplr ppppsspttt
721 avvgiiasha seeessrvkq ttqaignrycr sttvitvpde qeavrylvqq lisagteelr
781 dpntaavivt neretrlvrw mqaecltrgi lplfvppcas pkqqqlrcen irlrlrtvfa
841 tdplrgvdlq revpavaqrr vllvgvdsch tptvstgsvv gilctaernh llpffwkher
901 rgqevelvse hfevlisram elydglddvv vfgdgdvyse msamqahlpv gcgftfac lh
961 krsdvrfvhe frgeantsgs kvaagnvkg tvvqaltiqr asedpll gna vnsfylvqnhd

```

1021 cetstartvq ytlyctsptl dvsvdqqlsh vlahamatra tklpmptrca hrlasiverl
1081 idavpplqcs mipkplnerl wff

//

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Jan 31 2005 23:45:21

Résumé :

Régulations génétique et moléculaire par ARN interférence chez *Trypanosoma brucei*

L'ARN interférence (ARNi) est un phénomène découvert en 1998 par lequel la présence d'ARN double brin au sein d'une cellule entraîne la dégradation d'ARN de séquence homologue. L'ARNi est effectué par un complexe ribonucléoprotéique contenant des petits ARN double brin et au moins une protéine de la famille Argonaute.

Cette thèse a été consacrée à l'étude de l'ARNi chez le protozoaire *Trypanosoma brucei*. Nous avons d'abord défini les conditions d'utilisation de l'ARNi au niveau de la spécificité et de l'efficacité, paramètres qui ont servi à l'élaboration d'un logiciel permettant la sélection de l'ARN double brin pour les études fonctionnelles. Ensuite, nous avons recherché plusieurs gènes candidats codant pour des protéines participant à l'ARNi. Le meilleur d'entre eux, TbAGO1, appartient à la famille Argonaute et se caractérise par la présence d'un domaine supplémentaire, capable de lier les ARN. Il est essentiel pour l'ARNi chez le trypanosome. Sa délétion produit des défauts significatifs lors de la mitose et nous avons établi que l'ARNi contribue à la formation du fuseau mitotique et à la ségrégation des chromosomes. Un second phénotype observé en l'absence d'ARNi est la surexpression des ARN de deux types de rétroposons (rétrotransposons sans LTR), sans toutefois augmentation de leur activité de rétroposition. Les deux phénotypes sont indépendants l'un de l'autre. Nous avons ensuite démontré que la présence d'ARN double brin entraîne la destruction d'ARN cible de séquence homologue dans le cytoplasme mais peut aussi conduire à une extinction de la transcription du gène correspondant. Ce type de mécanisme pourrait non seulement contrôler l'expression des ARN des rétroposons, mais aussi celle des gènes dans lesquels ils sont insérés.

Abstract :

Molecular and genetic regulations by RNA interference in *Trypanosoma brucei*

RNA interference (RNAi) is a phenomenon discovered in 1998 in which the presence of double-stranded RNA (dsRNA) in a cell leads to degradation of RNA of homologous sequence. RNAi is mediated by a ribonucleoprotein complex that contains short double stranded RNA and a member of the Argonaute protein family.

This thesis is focusing on RNAi in the protist *Trypanosoma brucei*. We first defined the degree of specificity and efficiency of RNAi generated after expression of dsRNA, parameters that were instrumental in the design of a software allowing selection of dsRNA for silencing experiments. Next, we searched for candidate genes coding for proteins potentially involved in RNAi. The best candidate is TbAGO1, a member of the Argonaute protein family characterised by an extra domain possibly involved in RNA binding. This gene is essential for RNAi. Its deletion leads to significant mitosis defects, that we established were due to defects in spindle formation and chromosome migration. A second phenotype in the absence of RNAi is the overexpression of retroposon (retrotransposons without LTR) transcripts, without a concomitant increase in retroposition. Both phenotypes are independent. We next demonstrated that presence of dsRNA leads to destruction of homologous RNA in the cytoplasm but could also induce transcriptional silencing of the corresponding gene. This type of mechanism could control expression of retroposons but also of genes in which these retro-elements are inserted.

Mots clefs:

ARN interference, Argonaute, ARNdb, transposons,
mitose, chromosome, *Trypanosoma brucei*,

Laboratoire de Biophysique

USM503, INSERM U565, CNRS 5153 ;

Muséum National d'Histoire Naturelle ; 43 Rue Cuvier ; 75005 Paris