

Thèse

Présentée à l'Université Lille 2
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE II

(Spécialité : Biochimie et Biologie moléculaire)

Présentée et soutenue publiquement par

CLEA MANTINI

Le 19 Octobre 2010

Identification, évolution et mort cellulaire chez un groupe de protistes, les Parabasalia

Président : Pr. E.M. Aliouat, CIIL, Lille

Rapporteurs : Pr. F. Delbac, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Dr. R. Hirt, Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle

Examineurs : Dr. E. Viscogliosi, CIIL, Lille

Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDPEE)
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL)
Institut Pasteur de Lille,
Inserm U1019, CNRS UMR 8402, Université Lille-Nord de France,
1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex

Résumé

Les Parabasalia forment un groupe de protistes complexe et diversifié incluant les hypermastigines et les trichomonadines. Dans, la première partie de ma thèse, je me suis intéressée à l'identification moléculaire de trichomonadines dans de nouveaux cas cliniques chez l'homme mais aussi dans certains environnements chez l'animal en particulier chez les bovins et les volailles. Nous avons ainsi identifié une nouvelle espèce de *Tetratrichomonas* chez un patient atteint d'empyème pulmonaire, ce qui fait monter à 7 le nombre d'espèce de ce groupe de protistes identifiées jusqu'à présent chez l'homme. Nous avons également identifié l'espèce *Pentatrichomonas hominis* chez deux patients atteints de symptômes intestinaux et confirmé son pouvoir pathogène en particulier chez les enfants et son fort potentiel de transmission dans l'eau. Chez l'animal, *Histomonas meleagridis* est l'agent de l'histomonose des volailles alors que *Tritrichomonas foetus* est l'agent de la trichomonose bovine. Ces parasitoses ont des conséquences économiques importantes. Aussi, la présence chez ces mêmes animaux d'autres espèces de trichomonadine ayant des forme et taille similaires aux parasites pathogènes peuvent fausser le diagnostic de ces maladies se faisant généralement par observation microscopique. L'utilisation de l'ARNr 18S permet donc de palier à ce problème. Ainsi, à partir de 12 isolats de trichomonadines prélevés dans la cavité préputiale de taureaux, nous avons identifié trois espèces de trichomonadines, *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas* et *Honigbergiella* en plus de l'espèce responsable de la trichomonose des bovins, *Tritrichomonas foetus*. Nous avons en outre pu confirmer la spécificité du couple d'amorces TFR3 et TFR4 pour la recherche exclusive de *T. foetus*. Dans les selles des volailles, sur les trois génotypes de trichomonadines identifiés dans une étude ultérieure, deux correspondent à *H. meleagridis*. Le 3ème génotype correspond à une espèce phylogénétiquement proche de *Histomonas*, *Parahistomonas wenrichi*. En parallèle, nous avons complété, par l'addition de nouveaux taxons, les phylogénies moléculaires des Parabasalia basée sur la comparaison des séquences de l'ARNr 18S et reconstruit des arbres de ce groupe sur la base des séquences d'autres indicateurs comme la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'actine et le facteur d'élongation EF-1a. Les données obtenues confirment la polyphylie des Calonymphidae, Devescovinidae, Trichomonadida et hypermastigines et la monophylie de l'ordre des Cristamonadida. Ces phylogénies moléculaires sont largement en conflit avec la systématique actuelle et appellent donc à une révision globale de la taxonomie de ce groupe.

Le second volet de mes travaux concerne l'étude des processus de mort cellulaire chez la trichomonadine *Trichomonas vaginalis*, l'agent responsable de la trichomonose humaine. Ce parasite présente deux particularités intéressantes dans le cadre de notre projet : son unicellularité et l'absence de mitochondrie. Il est possible d'induire une forme de mort cellulaire distincte de la nécrose chez ce parasite *via* l'utilisation de drogues pro-apoptotiques comme la staurosporine. Plusieurs caractéristiques de cette mort cellulaire sont communes à celles observées pour l'apoptose des métazoaires. *Via* une recherche *in silico* menée dans le programme de séquençage du génome de *T. vaginalis*, nous avons identifié des protéines homologues aux caspases des métazoaires, les métacaspases. Ces protéines, au nombre de 11 chez *Trichomonas*, possèdent toutes le domaine catalytique peptidase C14 et la dyade histidine-cystéine du site catalytique caractéristiques des caspases. La régulation de l'expression des gènes codant ces protéines semble différente de celle généralement observée pour les gènes de caspases. Les métacaspases produites en système bactérien ont la propriété de s'auto-cliver et présentent une activité endopeptidase arginine ou lysine spécifique tout comme les métacaspases étudiées chez d'autres organismes. En revanche, celles produites en système eucaryote (*S. cerevisiae* et *T. vaginalis*) semblent ne pas s'auto-cliver mais présente les mêmes caractéristiques enzymatiques. Enfin, les premiers résultats de l'analyse fonctionnelle par ARN anti-sens montrent que deux des métacaspases de *T. vaginalis* seraient impliquées dans la mort cellulaire de ce parasite.

Abstract

Parabasalia represent a complex and diversified group of protists that includes the hypermastigids and the trichomonads. The first part of my thesis focused on the molecular identification of trichomonads in additional human clinical cases and also specific environment in animals and more particularly in bovids and poultries. We identified a new *Tetratrichomonas* species in a patient with lung empyema, increasing to 7 the number of species of this protist group identified so far in human. We have also identified the *Pentatrichomonas hominis* species in two patients with intestinal symptoms and confirmed its pathogenicity in particular toward children and its high transmissibility in water. In animals, *Histomonas meleagridis* is the agent of poultry histomonosis whereas *Tritrichomonas foetus* is the agent of the bovine trichomonosis. These diseases have important economical consequences. Then, the presence in these animals of other trichomonads species having shape and size similar to pathogenic parasites may alter the diagnosis of these diseases that is usually established through microscopic observation. Consequently, the use of 18S rRNA allows to solve this problem. Thus, we have identified three trichomonads species, *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas*, and *Honigbergiella* found in preputial cavity of bulls from 12 isolates of trichomonads along with the species causing the bovine trichomonosis. In addition, we confirmed the specificity of the primers pair TFR3 and TFR4 used for exclusive search for *T. foetus*. In poultry stools, two out of three trichomonad genotypes identified in previous study correspond to *H. meleagridis*. The third genotype corresponds to a species phylogenetically related to *Histomonas*, *Parahistomonas wenrichi*. In parallel, we have completed by the addition of new taxa, the molecular phylogeny of Parabasalia based on the comparison of 18S rRNA gene sequences. In addition, we have reconstructed phylogenetic trees of this group inferred on other markers such as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), actin and elongation factor EF-1a. The data obtained confirmed the polyphyly of Calonymphidae, Devescovichidae, Trichomonadida, and hypermastigids, and monophyly of Cristamonadida order. These molecular phylogenies are strongly in conflict with the current systematic and claim then a global review of the taxonomy of this group.

The second part of my works deals with the study of the cell death process in the trichomonad *Trichomonas vaginalis*, the causing agent of human trichomonosis. This parasite exhibits two interesting features in the frame of our project: its unicellularity and the absence of mitochondria. In this parasite, a form of a cell death distinct from necrosis can be triggered using pro-apoptotic drugs such as staurosporine. Several features of this cell death are common with those observed in metazoan apoptosis. Through *in silico* researches driven with the *T. vaginalis* genome sequencing program we have identified homologous metazoan caspase proteins, the metacaspases. These proteins, numbered up to 11 in *Trichomonas*, all include the catalytic peptidase domain C14 and the catalytic site histidine-cysteine dyad also found in caspases. The regulation of the expression of these genes encoding these proteins seems different from the one commonly observed for caspase genes. Metacaspases produced in bacterial system are auto-clived and have a specific arginine or lysine endopeptidase activity, as metacaspases studied in other organisms. However, when produced in eukaryotic system (*S. cerevisiae* and *T. vaginalis*), they don't process nonetheless they have the same enzymatic features. Preliminary functional analysis using anti-sense RNA show that two metacaspases of *T. vaginalis* are involved in cell death of this parasite.

Abréviations

Ac-DEVD-AMC	: N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-méthylcoumarin
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
AIF	: apoptosis inducing facteur
Apaf-1	: apoptosis protease activation factor
ARN _T	: acide ribonucléique totaux
ARN _m	: acide ribonucléique messenger
ARN _r	: acide ribonucléique ribosomique
ATG	: protéine de l'autophagie
ATP	: adénosine triphosphate
Bcl-2	: B cell lymphoma-2
Boc-GRR-AMC	: Boc-Gly-Arg-Arg-7-amino-4-méthylcoumarin
Boc-VLK-AMC	: Boc-Val-Leu-Lys-7-amino-4-méthylcoumarin
CaCl ₂	: chlorure de calcium
CAD	: caspase activated DNase
CARD	: caspase recruitment domain
CHAPS	: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CH ₃ CN	: acétonitrile
DD	: death domain
DED	: death effector Domain
DISC	: death Inducing Signaling Complex
DTT	: dithiothréitol
EDTA	: acide éthylène diamine tetra acétique
EF	: elongation Factor
EGTA	: acide éthylène glycol tetra acétique
ERO	: espece réactives de l'oxygène
FADD	: Fass associated death domain
FeSOD	: superoxyde dismutase à fer
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GST	: glutathione S-transférase
HCOOH	: acide méthanoïque
Hsp	: heat shock protein
IAP	: inhibitors of Apoptosis Proteins
IBS	: irritable bowel syndrome
ICAD	: inhibitor of caspase activated DNase

IP	: iodure de propidium
IP ₃ R	: inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
ITS	: internal transcribed spacer
kDa	: kilodalton
LBA	: long branch attraction
PBS	: phosphate buffered saline
Pb	: paire de base
PcP	: pneumonie à <i>pneumocystis</i>
PCR	: polymerase chain reaction
PFOR	: pyruvate ferredoxine oxydoreductase
PS	: phosphatidylsérine
Q-PCR	: PCR quantitative
MCA	: métacaspase
MCP	: mort cellulaire programmée
MEM	: membrane externe mitochondriale
MLO	: mitochondrion-like organel
MPTP	: mitochondrial permeability transition pore
NaCl	: chlorure de sodium
NH ₄ HCO ₃	: ammonium bicarbonate
NOD	: nucleotid binding and oligomerization domain
RE	: réticulum endoplasmique
SDRA	: syndrome de détresse respiratoire aigue
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STS	: staurosporine
TNFR	: tumor necrosis factor receptor
TUNEL	: Terminaldeoxynucleotidyltransferase mediated dUTP Nick End Labelling assay
VIH	: virus de l'immunodéficience humaine

Sommaire

Introduction	1
Analyse bibliographique	4
I- QUELQUES GENERALITES SUR LES PARABASALIA	4
I-1- Diversité et taille	4
I-2- Habitat, pathogénicité	4
I-3- Localisations inhabituelles et trichomonoses pulmonaires	7
I-4- Traitement	8
I-5- Division	9
I-6- Hydrogénosome	9
I-7- Génome de Trichomonas vaginalis	13
II- CYTOSQUELETTE DES PARABASALIA	14
II-1- Les structures microtubulaires	14
II-1-1- L'appareil flagellaire	14
II-1-2- Le complexe axostyle-pelta	17
II-2- Les structures microfibrillaires	19
II-2-1- Les fibres préaxostylaires	19
II-2-2- Les fibres parabasales	19
II-2-3- La membrane ondulante	19
II-2-4- La côte	23
II-2-5- Autres dérivés cinétosomiens	25
III- L'EMERGENCE DES PARABASALIA DANS L'EUCARYOGENESE	25
III-1- D'après l'analyse des caractères morphologiques	25
III-2- D'après l'analyse des données moléculaires	27
IV- SYSTEMATIQUE ET EVOLUTION DES PARABASALIA	32
IV-1- D'après l'analyse des caractères morphologiques	32
IV-2- D'après l'analyse des séquences des gènes d'ARN ribosomiques	34
IV-3- D'après l'analyse des séquences des gènes d'autres marqueurs	43

V- CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE CHEZ LES METAZOAIRES	45
V-1- Nécrose	45
V-2- Apoptose	46
V-3- Paraptose	47
V-4- Autophagie et mort cellulaire autophagique	47
VI- PRINCIPAUX ACTEURS DE L' APOPTOSE CHEZ LES EUCARYOTES PLURICELLULAIRES	50
VI-1- Les caspases	51
VI-1-1- Structure	53
VI-1-1-1- Caractéristiques générales	53
VI-1-1-2- Caractéristiques des prodomaines	53
VI-1-1-3- Structures des caspases hétérotétramériques actives	53
VI-1-2- Activation des caspases	55
VI-1-2-1- Activation d'une caspase initiatrice à motifs DED	55
VI-1-2-3- Activation d'une caspase initiatrice à motif CARD	56
VI-1-2-4- Activation des caspases effectrices	58
VI-1-3- Les substrats des caspases	59
VI-1-3-1- Spécificité de substrat	59
VI-1-3-2- Exemples de substrats de caspase effectrices	59
VI-1-4- Inhibiteur des caspases	60
VI-2- Facteurs de régulation de l'apoptose : la famille de protéines Bcl-2	61
VI-2-1- Structure	61
VI-2-2- Mode d'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2	62
VI-2-2-1- Bax et Bak	62
VI-2-2-2- Protéines BH-3 only	64
VI-2-3- Libération extra-mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques	65
VI-2-3-1- Le cytochrome <i>c</i>	66
VI-2-3-2- Apoptosis Inducing Factor	66
VI-2-3-3- Endonucléase G	67
VI-2-3-4- Smac /DIABLO et HtrA2 /Omi	67
VII- MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE CHEZ LES EUCARYOTES UNICELLULAIRES	67
VII-1- Voies de mort cellulaire chez les eucaryotes unicellulaires	68
VII-2- Métacaspases dans la MCP des eucaryotes unicellulaire	70
VII-3- Mort cellulaire chez le protiste parasite <i>Trichomonas vaginalis</i>	72

Matériels et Méthodes	73
I- RECHERCHE <i>IN SILICO</i> DANS LE GENOME DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	73
II- ANALYSE PHYLOGENETIQUE	73
III- CULTURE ET RECOLTE DES PARASITES	77
IV- ETUDE DE L'EXPRESSION RELATIVE DES GENES DE METACASPASES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> PAR PCR QUANTITATIVE APRES INDUCTION DE LA MORT PAR LA STAUROSPORINE	77
IV-1- Induction de la mort cellulaire	77
IV-2- Extraction des ARN totaux et obtention des ADN complémentaires	77
IV-3- PCR quantitative	77
IV-4- Quantification relative des niveaux d'expression	78
V- ANALYSE DE LA MORT CELLULAIRE DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> PAR CYTOMETRIE EN FLUX	79
V-1- Marquages à l'Annexine V et à l'iodure de propidium	79
V-2- Marquage TUNEL	79
VI- PRODUCTION DES METACASPASES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> EN SYSTEME BACTERIEN	80
VI-1- Amplification et clonage dans le vecteur pGex-6-P2	80
VI-2- Mutagenèse dirigée	82
VI-3- Production des métacaspases recombinantes	82
VII- PRODUCTION DES METACASPASES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> EN SYSTEME LEVURE	84
VIII- SPECTROMETRIE DE MASSE : PREPARATION DES ECHANTILLONS ET ANALYSE	85
IX- DETERMINATION DE LA SPECIFICITE DE SUBSTRAT DES METACASPASES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	86
IX-1- Substrats et inhibiteurs synthétiques	86
IX-2- Substrat potentiel de M6: le facteur d'élongation Tu de <i>Escherichia coli</i>	87
X- INDUCTION DE L'AUTOCLIVAGE DES METACASPASES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> PAR LE CALCIUM	87
XI- ETUDE FONCTIONNELLE DES METACASPASES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	87
XI-1- Clonage des gènes codant les protéines M6 et M9 dans le vecteur pBSneo	87
XI-2- Transfection et sélection des parasites	89

XI-3- Immunoblotting à partir des lysats de parasite	89
XI-4- Induction de la mort cellulaire des cellules transfectées.....	89
Résultats.....	91
<u>PARTIE I</u> IDENTIFICATIONS MOLECULAIRES DES TRICHOMONADINES CHEZ L'HOMME	91
I- 1- Introduction.....	91
I- 2- Résultats.....	91
I- 3- Conclusions.....	92
<u>PARTIE II</u> IDENTIFICATIONS MOLECULAIRES DES TRICHOMONADINES CHEZ LES BOVINS ET LES VOLAILLES	93
II- 1- Introduction	93
II- 2- Résultats	93
II- 3- Conclusions	94
<u>PARTIE III</u> PHYLOGENIES MOLECULAIRES DES PARABASALIA BASEES SUR DIFFERENTS INDICATEURS	95
III-1- Introduction	95
III-2- Résultats	95
III-3- Conclusions	96
<u>PARTIE IV</u> ANALYSE ET CARACTERISATION D'UN PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE CHEZ <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	97
IV-1- Recherche <i>in silico</i> de protéines potentiellement impliquées dans la mort cellulaire chez <i>Trichomonas vaginalis</i>	97
IV-2- Analyse des séquences protéiques des métacaspases de <i>Trichomonas vaginalis</i>	97
IV-3- Phylogénie des métacaspases de <i>Trichomonas vaginalis</i>	99
IV-4- Cinétique de la mort cellulaire induite par la staurosporine chez <i>Trichomonas vaginalis</i> ..	101
IV-4-1- Observation microscopique directe des parasites traités.....	101
IV-4-2- Analyse des cellules traitées par cytométrie en flux	101
IV-4-2-1- Marquage à l'annexine V / iodure de propidium.....	101
IV-4-2-2- Détection de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL	104

IV-5- Etude de l'expression relative des gènes de métacaspases de <i>Trichomonas vaginalis</i> par PCR quantitative après induction de la mort cellulaire par la staurosporine	105
IV-6- Caractérisation biochimique et enzymatique des métacaspases de <i>Trichomonas vaginalis</i> produites en système bactérien	107
IV-6-1- Analyse des profils électrophorétiques des métacaspases purifiées de <i>Trichomonas vaginalis</i>	107
IV-6-2- Activité enzymatique et substrats des métacaspases de <i>Trichomonas vaginalis</i>	109
IV-6-2-1- Variation du pH du tampon d'activation	109
IV-6-2-2- Variation de la concentration en Ca ²⁺ du tampon d'activation	110
IV-6-2-3- Spécificité de substrat des métacaspases	113
IV-6-2-4- Effet des inhibiteurs de protéases	113
IV-6-2-5- Activité enzymatique des métacaspases mutées.....	113
IV-6-2-6- Identification d'un substrat de la métacaspase M6.....	115
IV-7- Production des métacaspases M6 et M9 de <i>Trichomonas vaginalis</i> en système levure	116
IV-7-1- Auto-clivage des métacaspases	117
IV-7-2- Activité enzymatique et substrats des métacaspases	117
IV-8- Etude fonctionnelle des métacaspases M6 et M9 par ARN anti-sens	119
<i>Discussion générale et perspectives</i>	121
I- IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE ESPECE DE TRICHOMONADINE CHEZ L'HOMME	121
II- <i>PENTATRICHOMONAS HOMINIS</i> : POUVOIR PATHOGENE ET TRANSMISSION	123
III- IDENTIFICATION DES TRICHOMONADINES DANS LA CAVITE PREPUTIALE DES BOVINS	124
IV- IDENTIFICATION DES TRICHOMONADINES DANS LE TUBE DIGESTIF DES VOLAILLES.....	126
V- PHYLOGENIE DES PARABASALIA BASEE SUR LA COMPARAISON DES SEQUENCES DE L'ARNr 18S	127
VI- PHYLOGENIE DES PARABASALIA BASEE SUR LA COMPARAISON DES SEQUENCES DE LA GAPDH	128
VII- PHYLOGENIE DES PARABASALIA BASEE SUR LA COMPARAISON DES SEQUENCES D'AUTRES INDICATEURS	129
VIII- PROPOSITION D'UNE NOUVELLE SYSTEMATIQUE DES PARABASALIA.....	130
IX- UNE MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE CHEZ <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	134
X- IDENTIFICATION DE METACASPASES CHEZ <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> ET ANALYSE PHYLOGENETIQUE	135

XI- ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES DE MCAs DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> APRES INDUCTION DE L' APOPTOSE	136
XII- PRODUCTION DES METACASPASES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> EN SYSTEME D'EXPRESSION PROCARYOTE	137
XIII- ACTIVITE ENZYMATIQUE, SUBSTRATS ET INHIBITEURS DES METACASPASES PURIFIEES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	138
XIV- PRODUCTION DES METACASPASES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> EN SYSTEME D'EXPRESSION EUCARYOTE ET ANALYSE DE LEUR ACTIVITE ENZYMATIQUE	140
XV- ANALYSE FONCTIONNELLE DES METACASPASES DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	141
XVI- PRESENCE POTENTIELLE D' AUTRES VOIES DE MORT CELLULAIRE CHEZ <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	143
XVII- ROLE DE LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE CHEZ LES EUCARYOTES UNICELLULAIRES ...	145
<i>Références bibliographique</i>	147

Depuis le milieu du XIX^{ème} siècle et l'observation par Donné d'un « animalcule » auquel il a choisi le nom *Trichomonas*, tous les chercheurs intéressés par ces microorganismes n'ont eu depuis de cesse d'évaluer par différentes approches la diversité de ce groupe de protozoaires appelé Parabasalia tout en se penchant sur leur pathogénicité potentielle chez l'homme comme chez l'animal. Aujourd'hui la pathogénicité de la trichomonadine *Trichomonas vaginalis* ne fait plus aucun doute et la trichomonose humaine est d'ailleurs considérée comme la maladie sexuellement transmissible, d'origine non virale, la plus répandue à travers le monde. Par contre, ce n'est pas le cas de toutes les trichomonadines retrouvées chez l'humain et l'on peut citer par exemple *Pentatrachomonas hominis* qui colonise le tube digestif et dont le pouvoir pathogène reste encore très controversé tout comme son origine et sa transmission. En fait, jusqu'à ces dernières années, la situation semblait claire avec 4 espèces de trichomonadines pouvant être trouvées chez l'homme (*T. vaginalis*, *T. tenax*, *P. hominis* et *Dientamoeba fragilis*). Elles étaient de plus, sauf rares exceptions, considérées comme site-spécifiques. Cependant, les travaux récents menés en particulier dans notre équipe (Duboucher et al., 2007, 2008) ont quelque peu bouleversé ce schéma en montrant d'une part que certaines de ces espèces de trichomonadines pouvaient être retrouvées avec des fréquences élevées dans des localisations inhabituelles comme l'appareil respiratoire de patients atteints de différentes pathologies pulmonaires et d'autre part que d'autres espèces probablement d'origine animale étaient capables d'infecter l'homme en plus de celles classiquement admises. L'utilisation d'outils moléculaires pour la détection des trichomonadines dans ces contextes cliniques et en particulier l'amplification par PCR du gène de l'ARN ribosomique (ARNr) 18S ou de la région Internal transcribed spacer 1 (ITS1)-ARNr 5.8S-ITS2 et leurs séquençages couplés à la disponibilité dans les bases de données des séquences de ces gènes pour un grand nombre d'espèces de ce groupe de protistes se sont avérés être une avancée significative en palliant au manque de critères morphologiques d'identification. Chez l'animal, certaines espèces de trichomonadines sont pathogènes comme *Histomonas meleagridis* chez les volailles ou *Tritrichomonas fetus* chez les bovins. Du fait de leur impact économique important, leur détection demeure d'un grand intérêt. Mais encore faut-il que cette identification soit spécifique et qu'en d'autres termes la présence d'autres trichomonadines de morphologie similaire à celle des espèces pathogènes ne viennent pas fausser ce diagnostic. Une molécule comme l'ARNr 18S est là encore très précieuse afin de pouvoir identifier toutes les trichomonadines éventuellement présentes dans ces niches écologiques.

Cette molécule est donc largement utilisée pour l'identification des trichomonadines dans certains écosystèmes ou environnements mais aussi pour déterminer la diversité génétique des Parabasalia et les liens de parenté entre ses différents représentants. En effet, Grassé (1952) dans

son *Traité de Zoologie* puis Honigberg (1963), Brugerolle (1976) et Yamin (1979) furent les premiers à appréhender la diversité des Parabasalia sur la base de données morphologiques en identifiant pas moins de 80 genres et 400 espèces et à commencer à proposer des relations de parenté entre taxons. Mais très vite ils furent aussi les premiers à remarquer que le nombre de caractères morphologiques communs à tous les représentants des Parabasalia et donc comparables était très restreint du fait de la formidable diversité de ce groupe de protistes limitant ainsi les considérations évolutives. Aussi, depuis maintenant plusieurs années, la molécule d'ARNr 18S est utilisée pour la reconstruction d'arbres phylogénétiques. Globalement, les différentes phylogénies moléculaires obtenues sur la base de cet indicateur sont en désaccord profond avec la taxonomie classique des Parabasalia basée sur les caractères morphologiques et suggèrent une refonte nécessaire de la systématique de ce groupe. Cependant, cette refonte reste encore prématurée pour deux raisons essentielles. La première est l'absence de données moléculaires pour un grand nombre de taxons de ce groupe. La seconde est que ces phylogénies ont été généralement construites sur la base d'un seul marqueur en l'occurrence l'ARNr 18S et que l'utilisation d'autres marqueurs pour un échantillonnage d'espèces large est indispensable à des fins de comparaison.

Ainsi dans la première partie de ma thèse, je me suis intéressée à l'identification moléculaire de trichomonadines dans de nouveaux cas cliniques chez l'homme mais aussi dans certaines niches écologiques chez l'animal en particulier chez les bovins et les volailles. En parallèle, j'ai complété, par l'addition de nouveaux taxons, les phylogénies moléculaires des Parabasalia basée sur la comparaison des séquences de l'ARNr 18S et reconstruit des arbres de ce groupe sur la base des séquences d'autres indicateurs comme la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'actine et le facteur d'élongation EF-1a.

La seconde partie de ma thèse avait pour but de compléter les données obtenues précédemment dans l'équipe sur l'identification d'une forme de mort cellulaire chez *T. vaginalis* (Chose et al., 2002, 2003). Ce projet avait été quelque peu mis entre parenthèses faute de pouvoir obtenir des données moléculaires mais l'accès récent au génome complet de ce microorganisme (Carlton et al., 2007) a complètement relancé ce programme en nous permettant de rechercher des molécules et mécanismes potentiellement impliqués dans ce processus. Notre équipe avait ainsi pu montrer qu'il était possible d'induire, chez ce parasite, une forme de mort cellulaire distincte de la nécrose et de l'autophagie mais qui était similaire sous de nombreux aspects à l'apoptose des métazoaires. Il est bon de rappeler que chez les eucaryotes possédant des mitochondries, les voies d'apoptose décrites mettent en avant le rôle central de la mitochondrie dans le processus apoptotique. Si ces mécanismes de mort cellulaire sont maintenant bien connus

chez les métazoaires, il n'en est pas de même chez les eucaryotes unicellulaires comme *Trichomonas*. Pourtant ces unicellulaires sont *a priori* d'excellents modèles pour aborder une problématique de biologie générale qui est l'origine de la mort cellulaire chez les métazoaires puisque l'on sait que l'apparition de la mort cellulaire a précédé celle de la multicellularité. D'autre part, *Trichomonas* a une caractéristique intéressante par rapport à la plupart des autres eucaryotes unicellulaires qui est l'absence de vraies mitochondries *sensu stricto*. En effet, il possède des organites particuliers appelés hydrogénosomes qui en simplifiant seraient des mitochondries transformées en réponse à une adaptation évolutive à un mode de vie anaérobie. Aussi le fait de pouvoir induire une mort cellulaire chez ce microorganisme pourrait remettre un peu plus en question la vision quelque peu dogmatique du rôle central de la mitochondrie dans le processus apoptotique. J'ai donc essayé de contribuer à répondre à une question essentielle qui est : quelles sont les voies et molécules impliquées dans la mort cellulaire chez cet eucaryote unicellulaire dépourvu de mitochondries ?

I- QUELQUES GENERALITES SUR LES PARABASALIA

Préambule : Dans les trois premiers paragraphes de l'analyse bibliographique, nous avons décidé, par souci de clarté pour le lecteur, d'utiliser la classification de Brugerolle et Lee (2001) qui divise classiquement les Parabasalia en deux classes, les trichomonadines qui en résumant ont une morphologie et un cytosquelette simple et les hypermastigines qui ont une structure complexe avec en particulier une augmentation de leur taille et une multiplication de leurs fibres et flagelles. Même si cette classification n'est plus d'actualité (voir Par. IV), elle a le mérite de faciliter la description d'un certain nombre de caractéristiques de ce groupe de protistes.

I-1- Diversité et taille

Le phylum des Parabasalia (Cavalier-Smith, 2002) est composé de deux classes : les Trichomonadea (ou trichomonadines) et les Hypermastigea (ou hypermastigines). Il forme un groupe de protistes riche et diversifié où pas moins de 80 genres et 400 espèces ont déjà été identifiés (Yamin, 1979). Cependant, il est fort probable que de nombreux taxons restent encore à découvrir. Au sein de ce phylum, les trichomonadines ont une taille moyenne comprise entre 10 et 40 μm . Pourtant, certaines espèces appartenant au genre *Tricercomitus* ont une taille n'excédant pas les 2 ou 3 μm , en faisant ainsi un des plus petits eucaryotes (Brugerolle, 1986) alors que d'autres du genre *Trichomitopsis*, que l'on trouve dans le tube digestif de termites, peuvent atteindre les 150 μm (Amos et al., 1979). La forme des trichomonadines reste assez stéréotypée (**Figures 1A et 1B**). Une exception est *Dientamoeba fragilis* qui se présente comme une amibe binucléée (**Figure 1C**). Les hypermastigines quant à elles se distinguent par des formes plus complexes et souvent de grande taille (jusqu'à 500 μm pour *Deltotrichonympha*). La plupart sont caractérisées par une multiplication importante du nombre de flagelles qui peut atteindre plusieurs milliers (**Figures 1D à 1F**)

I-2- Habitat et pathogénicité

Globalement, la distinction des Parabasalia en deux grands groupes, trichomonadines et hypermastigines sur le plan morphologique, correspond aussi à une différence au niveau de leur biotope. En effet, les hypermastigines vivent en symbiotes dans la panse rectale de termites inférieurs et de la blatte xylophage *Cryptocercus* (Yamin, 1979). Ces insectes maintiennent, dans leur tube digestif, une communauté symbiotique complexe composée de bactéries et de protistes. Le rôle supposé des hypermastigines (et des trichomonadines symbiontes de ces mêmes hôtes) serait de digérer la cellulose, composant majeur du bois ingéré par ces insectes (Breznak, 1982 ; Grosovsky et Margulis, 1982 ; Ohkuma, 2003 ; Ohkuma, 2008), ce qui les rendrait indispensables à la survie de leurs hôtes.

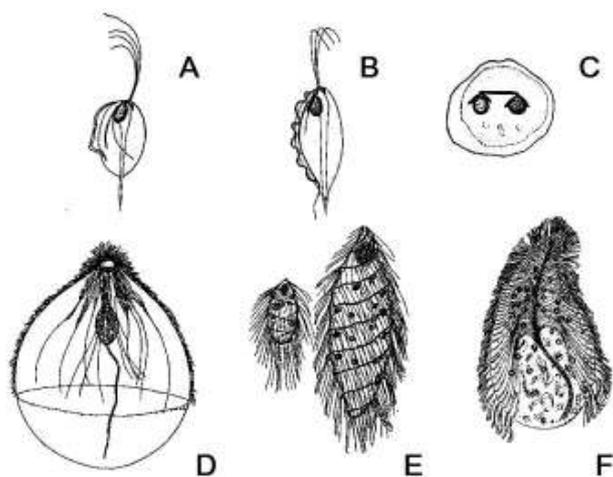


Figure 1 Variabilité morphologique des Parabasalia. **A:** *Trichomonas* sp. ; **B:** *Tritrichomonas* sp. ; **C:** *Dientamoeba fragilis* ; **D:** *Deltotrichonympha* sp. ; **E:** *Holomastigotes* sp. ; **F:** *Snyderella tabogae*.

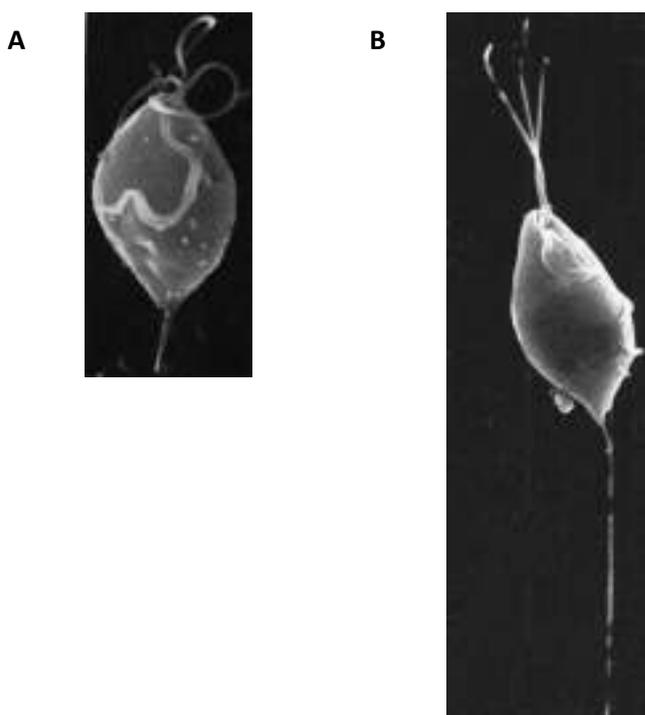


Figure 2: Vues en microscopie à balayage de deux principales trichomonadines pathogènes (d'après Warton et Honigberg, 1979). **A:** *Trichomonas vaginalis*, parasite de l'homme ($\times 4700$) ; **B:** *Tritrichomonas foetus*, parasite des bovins ($\times 4000$).

En effet, les insectes sont dépourvus de l'équipement enzymatique nécessaire à la digestion du bois. Au centre de la cellule du protozoaire, se trouve un très grand nombre de bactéries qui entourent les fragments de bois. Les bactéries dégradent les déchets puriques, et restituent de l'azote aux termites (Stingl et al., 2005). Le groupe des Parabasalia exerce donc un rôle important dans la gestion des écosystèmes, permettant la dégradation et le recyclage des espèces végétales mortes.

La plupart des trichomonadines sont quant à elles symbiontes ou parasites de très nombreux groupes d'organismes que ce soit les insectes, mollusques, poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères et colonisent généralement le tube digestif ou parfois les voies génitales de leurs hôtes respectifs. Chez l'homme, quatre espèces ont été fréquemment identifiées: *Trichomonas vaginalis* dans l'appareil uro-génital, *Trichomonas tenax* dans la cavité buccale, *Pentatrichomonas hominis* dans le gros intestin, et *Dientamoeba fragilis* dans le côlon (Honigberg, 1978). Parmi celles-ci, deux sont considérées comme pathogènes en l'occurrence *T. vaginalis* et *D. fragilis*. Cette dernière est en particulier responsable de diarrhées chroniques (pour revue voir Stark et al., 2006). En ce qui concerne *T. vaginalis* (**Figure 2A**), c'est de loin l'espèce de trichomonadines la plus connue puisque c'est l'agent responsable de la trichomonose humaine, la maladie transmise sexuellement d'origine non virale la plus répandue à travers le monde (pour revues générales voir Gerbase et al., 1998 ; Petrin et al., 1998 ; Lehker et Alderete, 2000 ; Miller et al., 2005 ; Van der Pol, 2007 ; Krashin et al., 2010). En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à près de 200 millions le nombre de nouveaux cas par an en faisant ainsi un problème majeur de santé publique (Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections, World Health Organization, Geneva, 2001, www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm). Pourtant, cette parasitose reste encore curieusement largement négligée par les autorités sanitaires (Van der Pol, 2007). Typiquement, l'infection masculine est asymptomatique, ce qui favorise naturellement la transmission du parasite. Une étude de Sena et al. (2007) a montré la présence de *T. vaginalis* chez 66 à 77 % des partenaires de femmes infectées et que environ 70% de ces mêmes hommes étaient asymptomatiques. Bien que la maladie soit le plus souvent asymptomatique, quelques complications peuvent être observées chez l'homme comme des prostatites, des urétrites ou encore des infertilités (Gardner et al., 1986; Krieger et al., 1995 ; Schwebke et al., 2003). Chez la femme, ce parasite est à l'origine de vaginites, d'urétrites et parfois de cystites. Quelques fois les symptômes sont discrets, voire absents. Il serait aussi la cause de certaines naissances prématurées (Cotch et al., 1997 ; Sutton, 1999). Smith et al. (2002) ont aussi montré que les petites filles peuvent être infectées à leur naissance mais que l'infection reste asymptomatique jusqu'à la puberté. Il est aussi le vecteur de virus humains, comme le papilloma virus dont on connaît l'incidence dans

certains cancers des voies génitales chez la femme (Pindak et al., 1989 ; Zhang et Begg, 1994 ; Viikki et al., 2000), et de bactéries pathogènes accolées à sa surface (Rappelli et al., 1998). Enfin, il pourrait avoir un rôle non négligeable dans l'amplification de la transmission du VIH (McClelland et al., 2007 ; Van Der Pol et al., 2007). En effet, l'action du parasite sur les tissus de son hôte provoque, entre autre, des hémorragies, ce qui augmenterait les portes d'entrée et de sortie du virus.

De nombreux travaux ont aussi été menés sur les trichomonadines parasites d'animaux qui ont une incidence économique importante. C'est le cas de *Tritrichomonas fetus* qui envahit le tractus génital des bovins (Yule et al., 1989 ; Corbeil, 1994) (**Figure 2B**) et qui peut être la cause d'endométrites, d'avortements, voire même d'infertilités temporaires ou permanentes. Citons aussi *Histomonas meleagridis*, l'agent de l'histomonose des volailles ou « blackhead disease », chez lesquelles les atteintes intestinale et hépatique peuvent être fatales en quelques semaines (Huber et al., 2006). Si la presque totalité des trichomonadines sont commensaux, il existe de rares espèces libres qui ont été isolées de sédiments lacustres, comme *Ditrichomonas honigbergii* (Farmer, 1993), *Pseudotrichomonas keilini* (Bishop, 1939) et *Honigbergiella* (Hampl et al., 2007), ou marins, comme *Monotrichomonas carabina* et *Monotrichomonas* sp. (Edgcomb et al., 1998).

I-3- Localisations inhabituelles et trichomonoses pulmonaires

Jusque dans un passé très récent, les trichomonadines trouvées chez l'homme et décrites ci-dessus étaient toutes considérées, sauf rares exceptions, comme ayant une forte spécificité pour leur site d'infection. Pourtant, certaines d'entre elles comme *T. vaginalis* et *T. tenax* ont été identifiées au niveau moléculaire et avec des fréquences importantes dans des localisations inhabituelles comme l'appareil respiratoire de patients (trichomonoses pulmonaires) atteints de différentes pathologies pulmonaires telles que la pneumocystose (ou PcP) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë ou SDRA (Duboucher et al., 2003, 2005, 2006, 2007a, 2007b, 2008 ; Mallat et al., 2004 ; Bellanger et al., 2008). Dans ces contextes cliniques, les trichomonadines apparaîtraient comme des opportunistes dont le développement ne serait pas conditionné par une immunodépression (dans les cas de SDRA les patients sont en général immunocompétents au contraire des patients atteints de PcP) mais par la présence d'un environnement local intra-alvéolaire partagé par la PcP et le SDRA. Ainsi, nous avons suggéré que le comblement des alvéoles pulmonaires par *Pneumocystis* (PcP) ou du sang coagulé (SDRA) créerait des niches d'anaérobiose nécessaires au développement des trichomonadines qui rappelons le, sont des organismes micro-aérophiles. *Trichomonas vaginalis* a également été identifié dans les poumons lors d'infections néonatales suggérant une contamination maternelle lors de la naissance (Szarka

et al., 2002). La présence de trichomonadines dans des localisation inhabituelles comme les poumons, a sans nul doute été largement sous-estimée par les anatomo-pathologistes du fait 1) d'une identification difficile sur la base de caractères morphologiques puisque ces protozoaires prennent une forme amiboïde avec une plasticité exagérée et 2) d'une méconnaissance même de ces protozoaires.

Trichomonas vaginalis a aussi été retrouvé entre autre, dans la prostate (Gardner et al., 1986), au niveau de l'utérus (Gardner et al., 1987), dans un kyste rénal (O'Hara et al., 1980), dans les urines (Bellanger et al., 2008) ou encore dans un cas de péritonite (Straube, 1991). Quant à *Pentatrachomonas hominis*, sa présence hors de son habitat naturel a aussi été reportée dans un abcès du foie (Jakobsen et al., 1987) et dans un cas fatal d'empyéma (Jongwutiwes et al., 2000). Il est à noter que deux autres espèces d'origine animale ont été identifiées dans les poumons humains : *Tritrachomonas fœtus*, un parasite des bovins décrit ci-dessus (Duboucher et al., 2006) et *Tetratrachomonas* sp. (Kutisova et al., 2005), une espèce trouvée fréquemment chez les oiseaux. Ces dernières observations posent naturellement la question du potentiel zoonotique encore mal connu des trichomonadines.

I-4- Traitement

Le traitement des parasitoses induites par les trichomonadines pathogènes nécessite l'utilisation de composés de la famille des 5-nitroimidazoles, comme le métronidazole (commercialisé sous le nom de Flagyl) dont le mode d'action est maintenant assez bien connu (Upcroft et Upcroft, 2001 ; Cudmore et al., 2004). Le métronidazole a une toxicité sélective puisque il est seulement actif sur les organismes anaérobies. Chez les trichomonadines, il pénètre par simple diffusion dans la cellule puis dans les hydrogénosomes. Dans ces organites, l'activation de cette drogue consiste en une réduction de celle-ci par deux enzymes, la Pyruvate Ferredoxine Oxydoréductase ou PFOR et l'hydrogénase (Kulda, 1999). Cette réaction produit un radical toxique qui se lie à l'ADN et entraîne une mort rapide du parasite en quelques heures. Cependant et malgré son efficacité, le métronidazole aurait certains effets secondaires néfastes et pourrait être un agent cancérigène, bien qu'aucune confirmation nette n'ait été apportée sur ce dernier point (Rustia et Shubik, 1972; Goldman, 1980). Aussi, par prudence, ce traitement n'est pas prescrit aux femmes enceintes. Enfin, l'identification de souches virulentes résistantes au métronidazole est de plus en plus courante (Cudmore et al., 2004; Goldman et al., 2009; Upcroft et al., 2009). Toutes ces données appellent donc à la mise au point de traitements médicamenteux de substitution qui pourraient, de surcroît, être moins coûteux que ceux actuellement disponibles. Il est à noter que El-Sherbini et al. (2009) ont obtenu des résultats très prometteurs avec un traitement à base de plante utilisé sur des souches résistantes aux métronidazole.

I-5- Division

Les Parabasalia ont un mode de division original appelé « cryptopleuromitose » par Grassé (1952), et caractérisé par un fuseau de division extra-nucléaire, ou paradesmose, et par le maintien de l'enveloppe nucléaire au cours du cycle cellulaire (**Figure 3**). Ces caractères en feraient, selon Heath (1980), un mode de division primitif chez les eucaryotes. Cette cryptopleuromitose a été bien décrite en microscopie optique (Grassé, 1952; Cleveland, 1961), en microscopie électronique (Hollande, 1974 ; Brugerolle, 1975; Honigberg et Brugerolle, 1990) et en immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-tubuline (Delgado-Viscogliosi et al., 1996 ; Noël et al., 2003). Ce mode de division original n'est pas exclusif aux Parabasalia et s'observe chez d'autres groupes de protistes comme les dinoflagellés (Grassé, 1952). Deux organites rattachés aux cinétosomes, les atractophores (équivalents des centrosomes des cellules de métazoaires), polarisent la paradesmose. Récemment, Bricheux et al. (2007) ont identifié une protéine de 477 kDa appartenant à la famille des « large coiled-coiled proteins » et constitutive de ces structures. Ces atractophores polarisent aussi des faisceaux de microtubules qui se dirigent vers le noyau formant les fibres chromosomiales. Ces fibres se fixent sur les centromères des chromosomes insérés dans l'enveloppe nucléaire. En simplifiant, l'allongement de la paradesmose permettrait, d'après de nombreux auteurs, la séparation et la migration des cinétides filles, alors que les fibres chromosomiales joueraient un rôle majeur dans la ségrégation des chromosomes. Pourtant, Noël et al. (2003) ont montré que l'allongement de la paradesmose n'était pas la principale force permettant la séparation des cinétides filles. La cryptopleuromitose est un mode de multiplication asexué et à notre connaissance il n'a pas encore été observé de division sexuée autogamique ou hétérogamique chez les Parabasalia, à l'exception peut-être d'une division sexuée avec gamétogenèse chez le genre *Trichonympha* (Cleveland, 1949 ; Dacks, 1999).

I-6- Hydrogénosome

L'une des caractéristiques majeures des Parabasalia est l'absence de mitochondrie et de peroxyosomes. Cependant, ils possèdent des organites sphériques ou en bâtonnets, mesurant environ 1 µm, et appelés hydrogénosomes (Lindmark et Muller, 1973) (**Figure 4**). Ces organites, découverts initialement chez la trichomonadine *Tritrichomonas fetus* (Lindmark et Muller, 1973), ont été aussi trouvés chez d'autres eucaryotes vivant en milieu anaérobie ou très pauvre en oxygène, comme certains ciliés du rumen (Yarlett et al., 1981, 1984), des ciliés libres (Van Bruggen et al., 1983) et des champignons (Yarlett et al., 1986 ; Benchimol et al., 1997). Sur un plan morphologique, les hydrogénosomes sont, comme les mitochondries, constitués d'une matrice dense, entourée d'une double membrane (Benchimol et De Souza, 1983) et se divisent

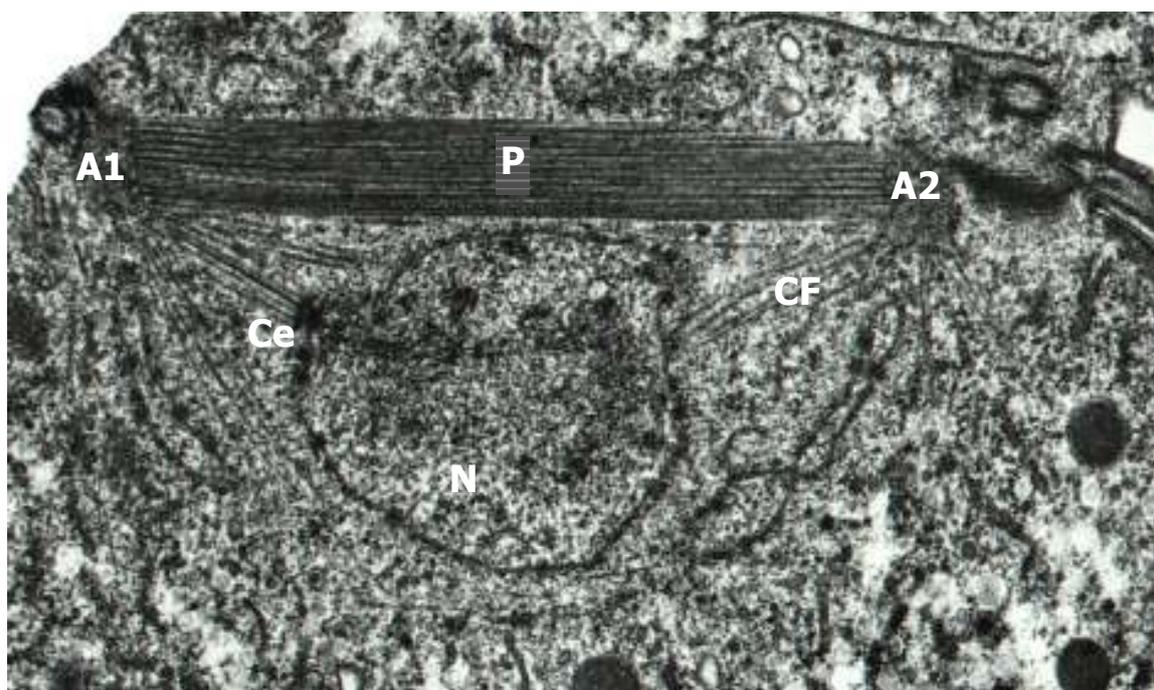


Figure 3 : Cryptopleuromitose chez *Trichomonas vaginalis* (d'après Brugerolle, 1975) ($\times 25000$). Abréviations : A1, A2 : attractophores ; Ce : centromères ; CF : fibres chromosomiales ; N : noyau ; P : paradesmose.

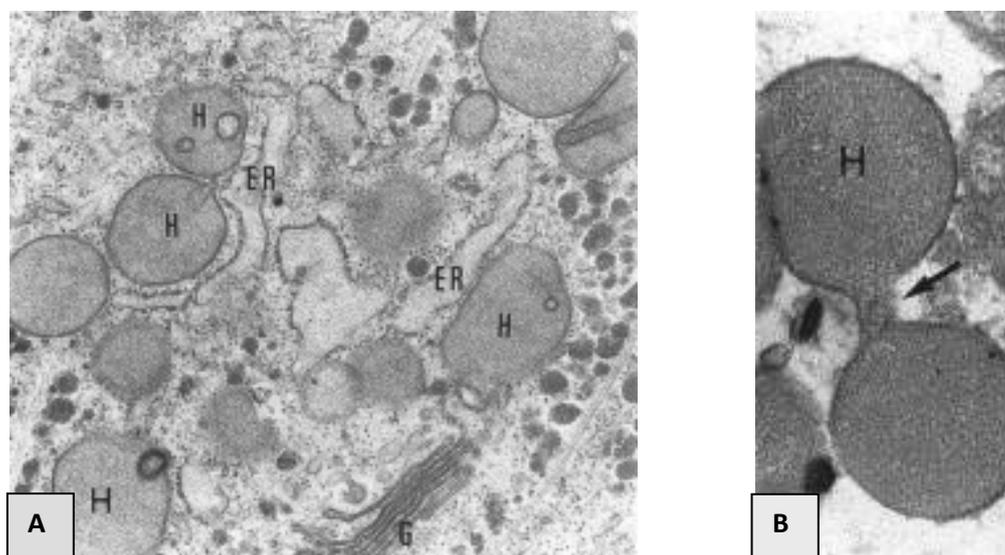


Figure 4 : Hydrogénosomes vus en microscopie électronique (d'après Benchimol et al., 1996). **A :** Chez *Tritrichomonas foetus* ($\times 29000$) ; **B :** Chez *Trichomonas vaginalis* (mode de division par segmentation) ($\times 40000$). Abréviations : ER : réticulum endoplasmique ; G : dictyosomes ; H : hydrogénosomes.

par segmentation et partition (Benchimol 1996, 2009) (**Figure 4B**). Par contre, aucun ADN n'a été détecté dans cet organelle (Turner et Müller, 1983 ; Clemens et Johnson, 2000) sauf dans les hydrogénosomes du cilié *Nyctotherus ovalis*, symbionte du tube digestif de la blatte *Periplaneta americana* (Akhmanova et al., 1998).

La question de l'origine des hydrogénosomes s'est rapidement posée comme celle d'ailleurs d'autres organites tels que les mitosomes ou mitochondrion-like organelles (MLO) trouvés chez d'autres groupes de protistes. Les derniers développements sur ce sujet peuvent être trouvés dans des revues récentes (voir Hjort et al., 2010 ; Lithgow and Schneider, 2010 ; Shiflett et Johnson, 2010). Que ce soient sur la base de phylogénies moléculaires construites à partir de la comparaison des séquences de protéines à localisation mitochondriale ou hydrogénosomale telles que les Heat Shock Proteins ou Hsp (Bui et al., 1996 ; Germot et al., 1996b ; Horner et al., 1996 ; Roger et al., 1996 ; Horner et Embley, 2001) ou sur l'étude des mécanismes d'accrochage de ces protéines à la membrane des hydrogénosomes et de translocation à l'intérieur de ces mêmes organites qui peuvent être comparés à ceux des protéines mitochondriales (Bradley et al., 1997 ; Häusler et al., 1997 ; Dyall et al., 2000 ; Plümper et al., 2000 ; Mentel, 2008), tout porte à croire que les hydrogénosomes partagent une même origine endosymbiotique avec les mitochondries. Ces organites seraient donc des mitochondries fortement modifiées en réponse à une évolution adaptative à un mode de vie anaérobie. De ce fait, les Parabasalia ne seraient pas primitivement dépourvus de mitochondries et descendraient donc d'ancêtres ayant connu l'endosymbiose mitochondriale. Ils auraient donc secondairement subi une transformation de ces organites tout en intégrant certains gènes d'origine endosymbiotique dans leurs génomes. Plus globalement, on peut dire qu'à ce jour il n'existe pas *a priori* de vrais eucaryotes amitochondriaux et que l'endosymbiose mitochondriale a dû se produire avant la divergence de tous les eucaryotes étudiés jusqu'à présent. Dans le cadre du séquençage du génome de *T. vaginalis* (Carlton et al., 2007), 138 gènes codant pour de probables protéines hydrogénosomales ont été identifiés du fait de la présence d'un motif d'adressage dans l'organite. Ainsi une carte des voies métaboliques au sein des hydrogénosomes a pu être dressée (**Figure 5**). Dans les hydrogénosomes comme dans les mitochondries, le pyruvate est métabolisé pour produire de l'acétyl-CoA. Par contre, les enzymes diffèrent et les voies métaboliques divergent. En effet, dans la mitochondrie, le pyruvate est métabolisé par un complexe pyruvate déshydrogénase, générant de l'acétyl-CoA et du CO₂. Cet acétyl CoA est ensuite métabolisé dans le cycle de Krebs, avec production de NADH et de CO₂. Enfin, la phosphorylation oxydative de l'ADP en présence d'O₂ et par l'entremise du NADH et de la chaîne respiratoire, aboutit à la production d'ATP. Dans l'hydrogénosome, le pyruvate est décarboxylé oxydativement par la PFOR, générant de l'acétyl-CoA. Une ferredoxine-hydrogénase accepte les électrons de la PFOR et

Figure S12. Metabolic map of the *T. vaginalis* hydrogenosome. Orange rectangles represent enzymes known to be involved in energy metabolism. Ferredoxins (Fdx, green ovals) donate electrons to hydrogenases which subsequently synthesize molecular hydrogen. In the presence of metronidazole (pink Mz), Fdx transports electrons derived via oxidative decarboxylation of malate or pyruvate to the drug, resulting in its activation. Predicted protein activities, mostly uncovered by analysis of the genome sequence, are colored coded as follows: pink, iron-sulfur cluster assembly machinery and hydrogenase maturation; cyan, oxygen scavenging system; yellow, amino acid metabolism; and blue, protein translocation and maturation. Open circles located in the membrane indicate unidentified transporters that likely facilitate substrate and metabolite transport. Key to abbreviations: AK, adenylate kinase; Fdx, ferredoxin; GCV, glycine cleavage system; Hy, hydrogenase; PFO, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase; SOD, superoxide dismutase; STK, succinate thiokinase (succinate-CoA ligase, ADP forming); SHMT, serine hydroxymethyl transferase; Trx: thioredoxin; TrxP, thioredoxin peroxidase; TrxR, thioredoxin reductase; THF-CH₂: N⁵,N¹⁰-CH₂ tetrahydrofolate; Hy?: likely two NADH dependent hydrogenase genes; Hy: likely 64 kDa hydrogenase with homology to NnoG; ASCT?: acetyl:succinate CoA-transferase, no gene identified in the sequence data, but acetyl CoA hydrolase proteins were identified which are likely translocases and localize to hydrogenosomes; oxidase?: no gene identified in the sequence data, although the activity is likely present.

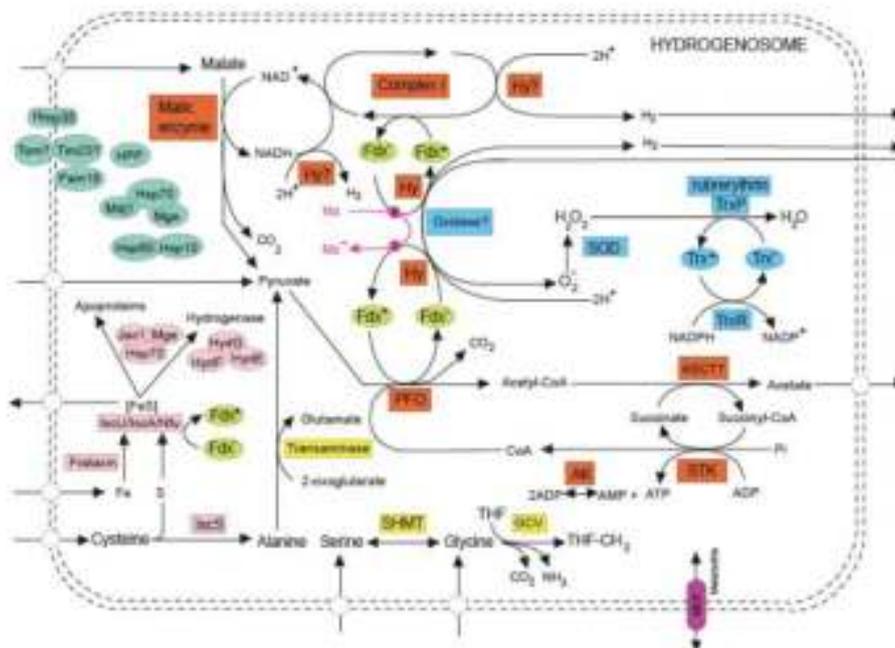


Figure 5 Voies métaboliques identifiées au niveau de l'hydrogénosome de *Trichomonas vaginalis* (d'après Carlton et al., 2007). Cette figure est complétée par des activités protéiques prédites par le récent séquençage de son génome.

utilise les ions H^+ comme accepteur d'électrons, libérant ainsi de l'hydrogène moléculaire H_2 d'où d'ailleurs le nom de l'organelle. L'acétyl-CoA est utilisé pour produire de l'ATP, par une phosphorylation au niveau du substrat contrairement à la phosphorylation oxydative de la mitochondrie. L'enzyme, la succinyl-CoA synthétase, est l'homologue de l'enzyme présente dans le cycle de Krebs de la mitochondrie. Les hydrogénosomes ont ainsi un rôle dans la production énergétique même si ce rôle n'est pas essentiel. Cependant, la glycolyse intra cytosolique assurerait l'essentiel de l'apport énergétique (Muller, 1993).

I-7- Génome de *Trichomonas vaginalis*

A ce jour, *T. vaginalis* est la seule espèce de Parabasalia dont le génome ait été séquencé. Ce génome est haploïde et composé de six chromosomes monocentriques. Il a été couvert 7,2 fois et plus de 17000 contigs sont disponibles dans les bases de données (Carlton et al., 2007). La taille de ce génome est estimée à 160 Mb et compte environ 60000 gènes (pour comparaison : 35845 gènes pour *Homo sapiens* et 9649 pour *Giardia lamblia*). Le premier résultat significatif obtenu au cours de ce séquençage est la présence de très nombreuses séquences répétées représentant environ 65% du génome. Les 59 familles de séquences répétées les plus représentées occupent 39 Mb du génome et sont regroupées en plusieurs catégories dont les virus-like, les transposons-like et retrotransposons-like. Les éléments de ces 59 familles sont présents en centaines d'exemplaires et montrent une extraordinaire homogénéité, avec un polymorphisme moyen d'environ 2,5%. Il est intéressant de noter que cette expansion génomique se serait produite récemment après la séparation des espèces *T. vaginalis* et *T. tenax*. Il a aussi été montré que seuls 65 gènes présentent des introns et environ 150 cas de possible transfert latéral de gènes d'origine procaryotique ont été recensés et intéressent plusieurs voies métaboliques. En parallèle, des gènes impliqués dans les mécanismes d'ARN interférence et de méiose ont été identifiés. D'autre part, *T. vaginalis* possède l'un des dégradomes les plus complexes identifiés jusqu'à présent avec plus de 400 peptidases (pour comparaison : 561 pour *Homo sapiens* et 92 pour *Plasmodium falciparum*) et des centaines de gènes codant pour des protéines de surface BspA-like pouvant être impliquées dans l'adhésion aux cellules hôtes.

Le génome de *T. vaginalis* est un de ceux ayant la plus grande capacité codante parmi les eucaryotes et l'on peut se demander pourquoi ce génome a connu une telle expansion. L'hypothèse avancée par les auteurs est la suivante : l'ancêtre de *T. vaginalis* et *T. tenax* était sans doute un parasite du tube digestif. Après spéciation, *T. tenax* a colonisé la cavité orale alors que *T. vaginalis* a colonisé l'appareil uro-génital. Cette colonisation a nécessité une adaptation de *T. vaginalis* à son environnement. Cette colonisation s'est donc accompagnée d'une expansion de plusieurs familles de gènes en particulier ceux impliqués dans l'endocytose, la

phagocytose et le trafic membranaire et liés à son style de vie. Cette expansion s'est aussi accompagnée d'une augmentation de la taille du parasite facilitant la phagocytose de bactéries et augmentant sa surface de contact avec la muqueuse vaginale tout en limitant sa propre phagocytose par les cellules de l'hôte.

II- CYTOSQUELETTE DES PARABASALIA

Dans ce mémoire, nous nous sommes focalisés sur la morphologie des trichomonadines qui est maintenant bien connue (pour revues voir Honigberg, 1963 ; Brugerolle, 1976 ; Honigberg et Brugerolle, 1990 ; Brugerolle et Lee, 2001). Quant aux hypermastigines, elles ont une morphologie plus complexe et moins stéréotypée. A l'échelle ultrastructurale, la structure des organites varie peu d'une espèce à l'autre (Brugerolle et Lee, 2001), mis à part la taille, la topographie ou le nombre de certains organites.

La plupart des Parabasalia sont caractérisées par un cytosquelette souvent complexe et diversifié où prédomine (**Figure 6**):

i) des structures microtubulaires, comme le complexe axostyle-pelta, véritable squelette axial de la cellule, et les flagelles antérieurs et récurrent, en nombre variable selon les espèces. Aucun microtubule cytoplasmique libre n'a été mis en évidence à ce jour chez ces protistes.

ii) des structures microfibrillaires, comme la côte, les fibres parabasales, les fibres préaxostylaires (ou sigmoïdes) et la membrane ondulante. Ces structures particulières forment des racines striées périodiques. Elles sont rattachées aux cinétosomes et composées de microfilaments de 2 à 4 nm de diamètre très répandus chez les protistes (Grain, 1986).

Certaines de ces structures, comme les fibres parabasales, sont communes à toutes les espèces de la lignée des Parabasalia, alors que d'autres, comme la côte ou la membrane ondulante, sont spécifiques d'un genre ou d'une famille donnée et ont donc été utilisées comme caractères taxonomiques.

II-1- Les structures microtubulaires

II-1-1- L'appareil flagellaire

Les trichomonadines possèdent en général 4 flagelles issus de 4 cinétosomes, dont 3 sont dirigés vers l'avant (flagelles antérieurs) et un vers l'arrière (flagelle récurrent). C'est le cas par exemple du genre *Tritrichomonas* (**Figure 7A**). Le flagelle récurrent peut être libre ou adhérent au corps cellulaire et détermine conventionnellement la face dorsale de la cellule. Les cinétosomes sont disposés de façon très précise dans l'espace (on parle de disposition réciproque

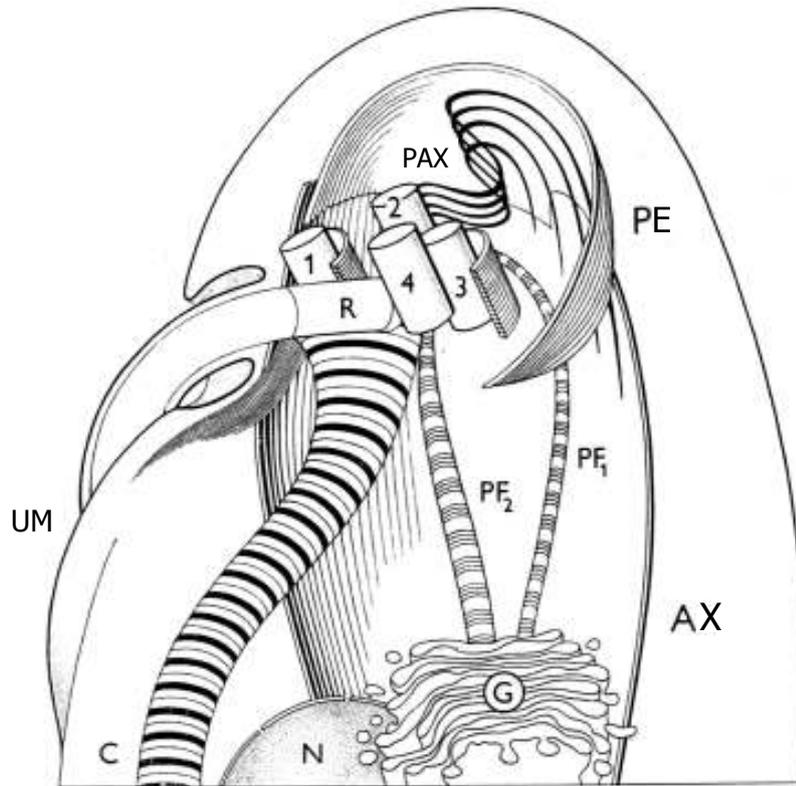


Figure 6 : Diagramme schématique d'une trichomonadine (d'après Kulda et al., 1986).
Abréviations : AX : axostyle ; PE : pelta (l'ensemble AX-PE formant le complexe axostyle-pelta) ; C : côte ; G : dictyosomes ; N : noyau ; PAX : fibres préaxostylaires ; PF1, PF2 : fibres parabasales ; R : cinétosome du flagelle récurrent ; UM : membrane ondulante ; 1, 2, 3, 4 : cinétosomes des flagelles antérieurs.

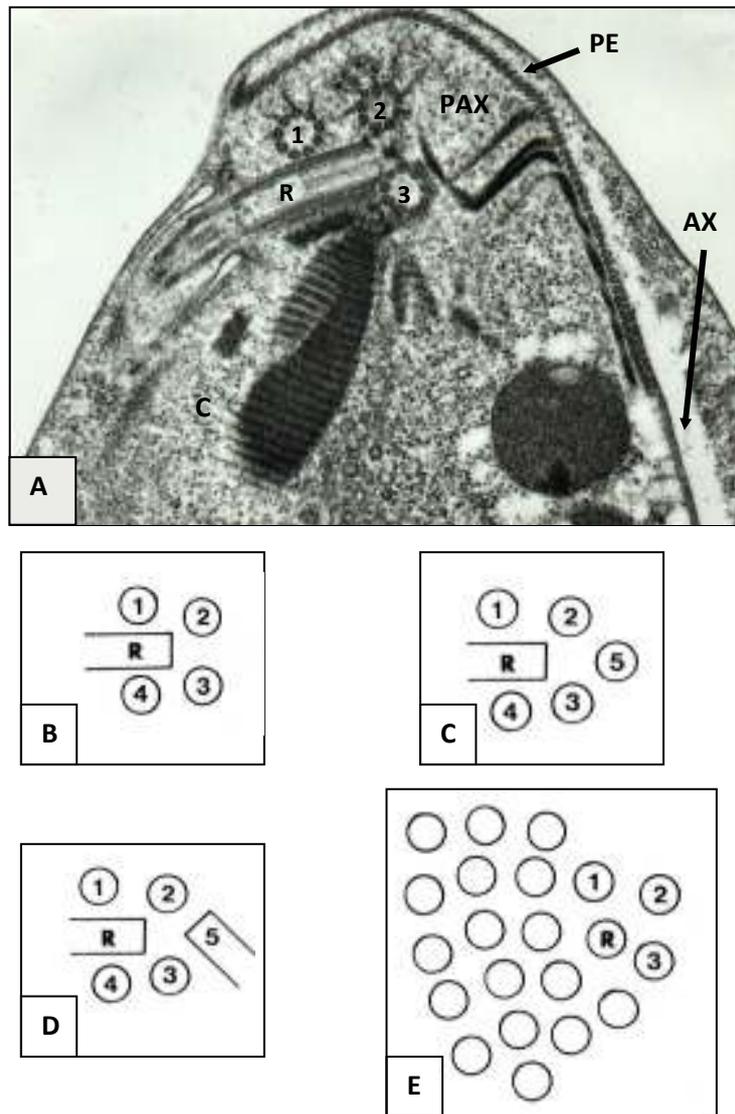


Figure 7 : Disposition réciproque des cinétosomes chez les Parabasalia. **A :** chez *Tritrichomonas foetus* (d'après Viscogliosi et Brugerolle, 1993b, $\times 30000$); **B :** chez *Trichomonas* et *Tetratrichomonas*; **C :** chez *Hexamastix* et *Pentatrichomonoides*; **D :** chez *Pentatrichomonas*; **E :** Aire flagellaire et cinétosomes privilégiés chez l'hypermastigine *Lophomonas*. Abréviations : AX : axostyle ; C : côte ; PAX : fibres préaxostylaires ; PE : pelta ; R, 1, 2, 3, 4, 5 : cinétosomes des flagelles.

des cinétosomes ou de cinétosomes privilégiés). En effet, les cinétosomes des flagelles antérieurs sont orthogonaux au cinétosome du flagelle récurrent. Les cinétosomes sont repérables et numérotés en fonction des structures microfibrillaires qui leur sont associées. Les genres *Trichomonas* et *Tetratrichomonas* possèdent un cinétosome supplémentaire donnant naissance à un quatrième flagelle antérieur (**Figure 7B**). Un cinquième flagelle antérieur est présent chez *Hexamastix* et *Pentatrichomonoides* (**Figure 7C**) (Brugerolle et al., 1994). Chez *Pentatrichomonas*, le cinétosome (noté 5) du sixième flagelle est lui orthogonal aux cinétosomes des flagelles antérieurs, et le sixième flagelle émerge donc sur la face ventrale de la cellule (Honigberg et al., 1968) (**Figure 7D**). Cette organisation des cinétosomes est très proche de celle observée chez *Cochlosoma anatis* (Pecka et al., 1996). Deux genres très intéressants sont à signaler : le genre *Dientamoeba* qui est dépourvu de cinétosomes et de flagelles (Camp et al., 1974), et le genre *Histomonas* qui présente un seul flagelle plus 3 cinétosomes non flagellifères (Rybicka et al., 1972). Pour ce qui est des hypermastigines, on observe une multiplication importante du nombre des flagelles (jusqu'à plusieurs milliers) formant l'aire flagellaire. Pourtant, on retrouve les cinétosomes privilégiés des trichomonadines chez plusieurs familles d'hypermastigines (Hollande et Carruette-Valentin, 1969, 1971, 1972; Kubai, 1973) (**Figure 7E**).

II-1-2- Le complexe axostyle-pelta

Le complexe axostyle-pelta compose quant à lui un véritable squelette axial qui maintient la forme de la cellule (**Figure 8**). L'axostyle se présente sous la forme d'un tronc qui s'élargit à l'avant pour s'ouvrir dorsalement et former le capitulum où est logé le noyau. Il se termine en pointe à l'extrémité postérieure de la cellule et peut se prolonger au-delà du corps cellulaire. On distingue deux types d'axostyle : le type *Trichomonas* avec une forme de cône, c'est-à-dire de diamètre décroissant du capitulum vers la pointe et le type *Tritrichomonas* qui a plutôt une forme de tube épais avec un diamètre égal du capitulum à la pointe (Cepicka et al., 2010). La pelta est surmontée à l'avant par le capitulum et encercle les cinétosomes en laissant une ouverture dorsale par où sortent les flagelles. Chez les Devescovinidae, le complexe axostyle-pelta peut s'enrouler sur lui-même et décrire plusieurs tours de spires (**Figure 8D**). Il devient encore plus puissant chez les hypermastigines (Hollande et Valentin, 1969). Au contraire, cette structure est beaucoup moins développée chez les trichomonadines à forte tendance à l'amiboïsme, comme *Protrichomonas*, *Parahistomonas* ou *Histomonas*, et peut même complètement disparaître chez *Dientamoeba*.

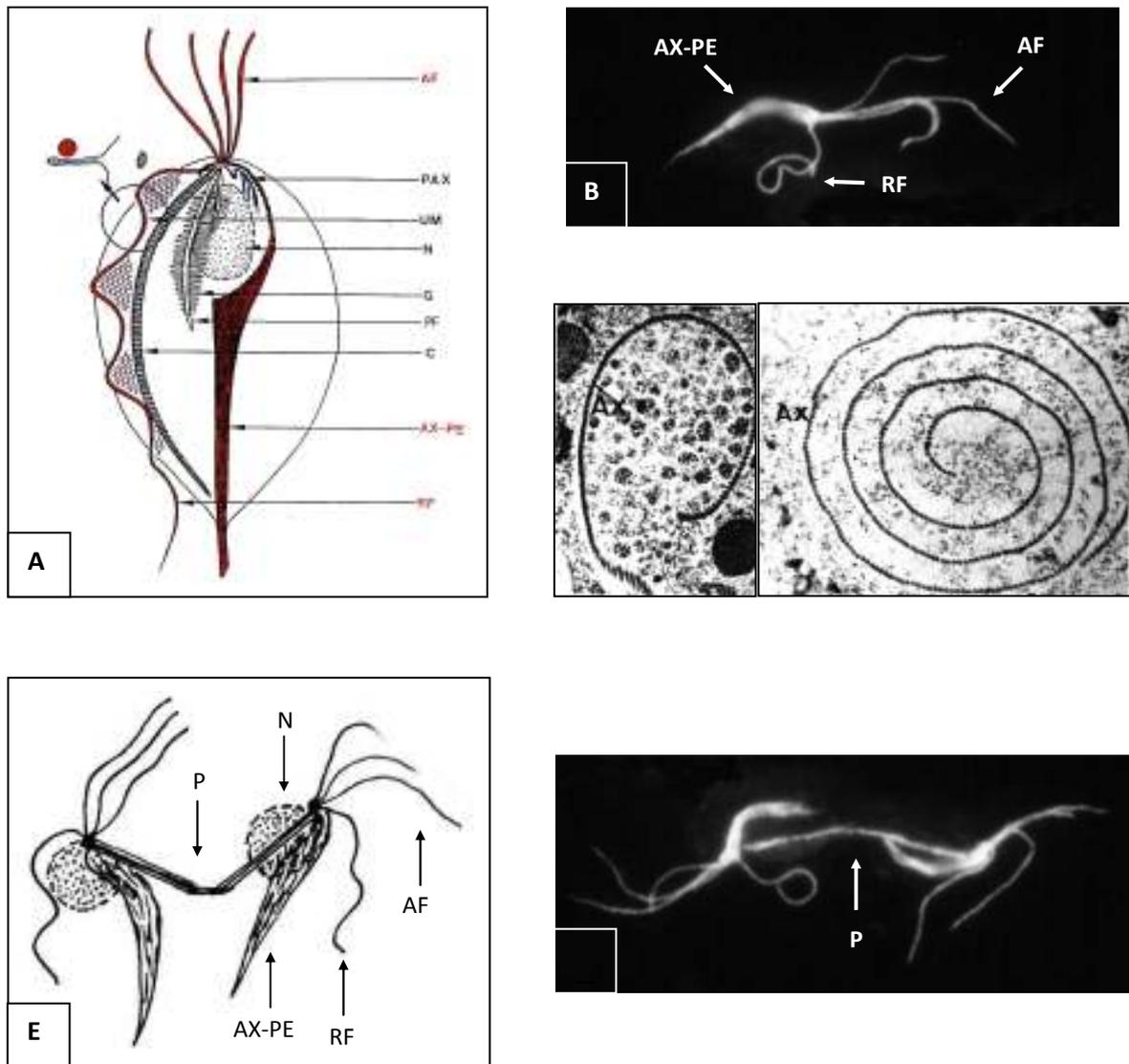


Figure 8 : Structures microtubulaires chez les trichomonadines. **A :** Représentation schématique du cytosquelette de *Trichomonas vaginalis*. Les structures microtubulaires sont indiquées en rouge. ; **B :** Immunomarquage des structures microtubulaires d'une cellule interphasique de *Trichomonas vaginalis* à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-tubuline (d'après Viscogliosi, non publié). ($\times 4400$) ; **C, D :** Coupes transversales de l'axostyle chez *Tritrichomonas* (C) et *Devescovina* (D) (d'après Brugerolle, 1976). (C : $\times 20000$; D : $\times 23000$) ; **E :** Représentation schématique des structures microtubulaires d'une cellule de *Trichomonas vaginalis* en division (stade 4-4 : 4 flagelles dans chaque cinétide fille). ; **F :** Immunomarquage des structures microtubulaires d'une cellule de *Trichomonas vaginalis* en division (stade 4-4) (d'après Viscogliosi et Brugerolle, 1994a). ($\times 4400$). Abréviations : AF : flagelles antérieurs ; AX : axostyle ; AX-PE : complexe axostyle-pelta ; C : côte ; G : dictyosomes ; N : noyau ; P : parademose ; PAX : fibres préaxostylaires ; PF : fibres parabasales ; RF : flagelle récurrent ; UM : membrane ondulante.

II-2- Les structures microfibrillaires

Préambule : Par souci de clarté, nous ne développerons pas dans ce paragraphe les données concernant les structures microfibrillaires type actine et ses protéines associées puisqu'elles ne composent pas de structures cytosquelettiques réellement identifiables morphologiquement.

II-2-1- Les fibres préaxostylaires

Le cinétosome 2 est relié au complexe axostyle-pelta par plusieurs fibres préaxostylaires (ou sygmoïdes), qui sont en nombre variable (4 à 18). Elles suivent un trajet en S et s'écartent en éventail pour s'appliquer sur les microtubules au niveau de la jonction axostyle-pelta (**Figure 9B**).

II-2-2- Les fibres parabasales

Chez les trichomonadines, deux fibres parabasales rattachées au cinétosome 2 et pouvant être de tailles inégales, s'enfoncent dans le cytoplasme (**Figure 9C**). Elles supportent les dictyosomes sans qu'aucune liaison avec ces organites n'ait pu être mise en évidence (**Figure 10B**), l'ensemble fibres parabasales-dictyosomes formant ce que l'on appelle l'appareil parabasal (**Figure 10**), d'où le nom Parabasalia choisi pour ce phylum. La périodicité de ces fibres est de 42 nm chez les trichomonadines, et la structure est identique à celle de la côte des *Tritrichomonas* (type A). Chez les hypermastigines, leur périodicité est variable et leur développement plus important, puisqu'on observe une multiplication importante du nombre de ces fibres, chacune supportant des dictyosomes (Hollande et Valentin, 1969 ; Hollande et Carruette-Valentin, 1971) (**Figure 10C**).

II-2-3- La membrane ondulante

L'ensemble constitué par le flagelle récurrent adhérent au corps cellulaire et les structures éventuelles d'association côte-membrane plasmique forme la membrane ondulante (**Figures 9E et 11**). Elle est surtout caractéristique des Trichomonadidae car sa présence est intimement liée à celle de la côte. Pour ces microorganismes, ce serait la principale source de motricité de la cellule et les flagelles antérieurs serviraient surtout au changement de direction (Kulda et al., 1986).

On peut distinguer essentiellement 3 types de membrane ondulante (**Figure 11**):

i) celle du type *Trichomonas* qui est lamellaire. Le flagelle récurrent est généralement non modifié et accolé à une lamelle dense qui fait saillie et qui serpente sur la face dorsale de la cellule. Dans ce type, la côte suit le trajet de la membrane ondulante sans lui être directement associée.

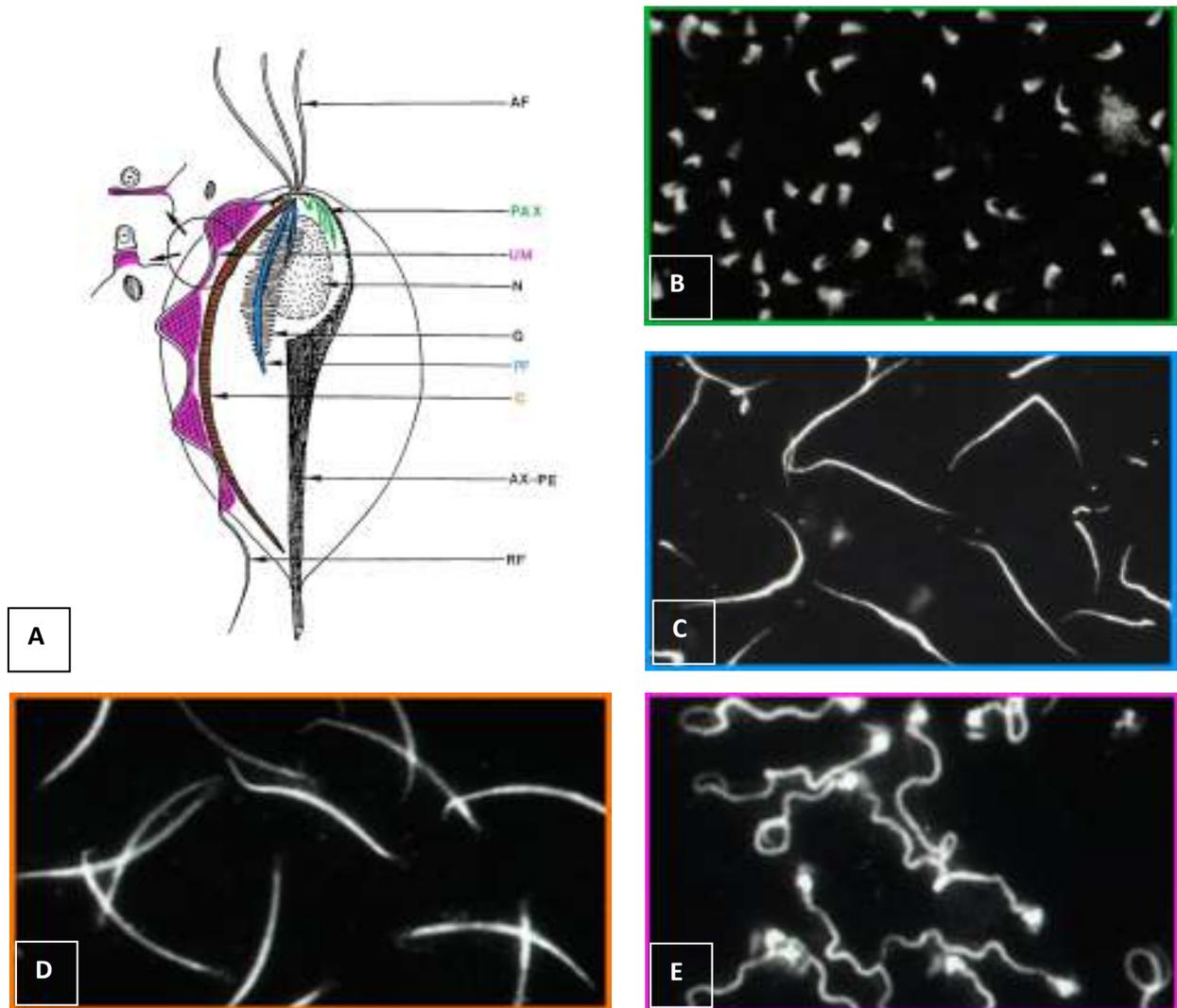


Figure 9 : Immunomarquages de différentes structures cytosquelettiques à l'aide d'anticorps monoclonaux chez *Tritrichomonas foetus* (B, D, E) et *Trichomonas vaginalis* (C) (d'après Viscogliosi, non publié). ($\times 6000$). **A :** Représentation schématique du cytosquelette d'une trichomonadine ; **B :** Immunomarquage des fibres préaxostylaires ; **C :** Immunomarquage des fibres parabasales ; **D :** Immunomarquage de la côte ; **E :** Immunomarquage de la membrane ondulante. Abréviations : AF : flagelles antérieurs ; AX-PE : complexe axostyle-pelta ; C : côte ; G : dictyosomes ; N : noyau ; PAX : fibres préaxostylaires ; PF : fibres parabasales ; RF : flagelle récurrent ; UM : membrane ondulante.

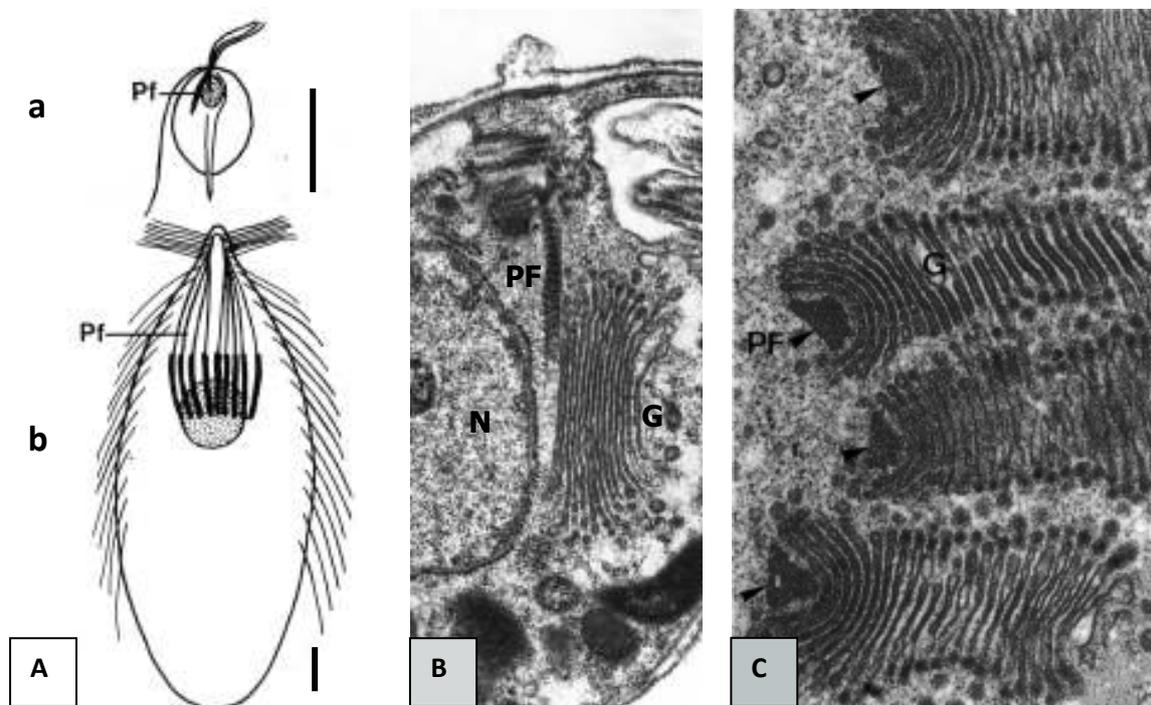


Figure 10 : Fibres parabasales chez les Parabasalia (d'après Brugerolle et Viscogliosi, 1994). **A** : Nombre et localisation des fibres parabasales chez une trichomonadine (a), comme *Monocercomonas* sp. et chez une hypermastigine (b), comme *Trichonympha* (échelle = 10 μm) ; **B** : Chez les trichomonadines (ex : *Monocercomonas*), l'appareil parabasal est composé d'une fibre parabasale et des dictyosomes. ($\times 20000$) ; **C** : Chez les hypermastigines (ex : *Joenia*), on note une multiplication du nombre des fibres parabasales, chacune associée à un appareil de Golgi. ($\times 15000$). Abréviations : G : dictyosomes ; N : noyau ; PF : fibres parabasales.

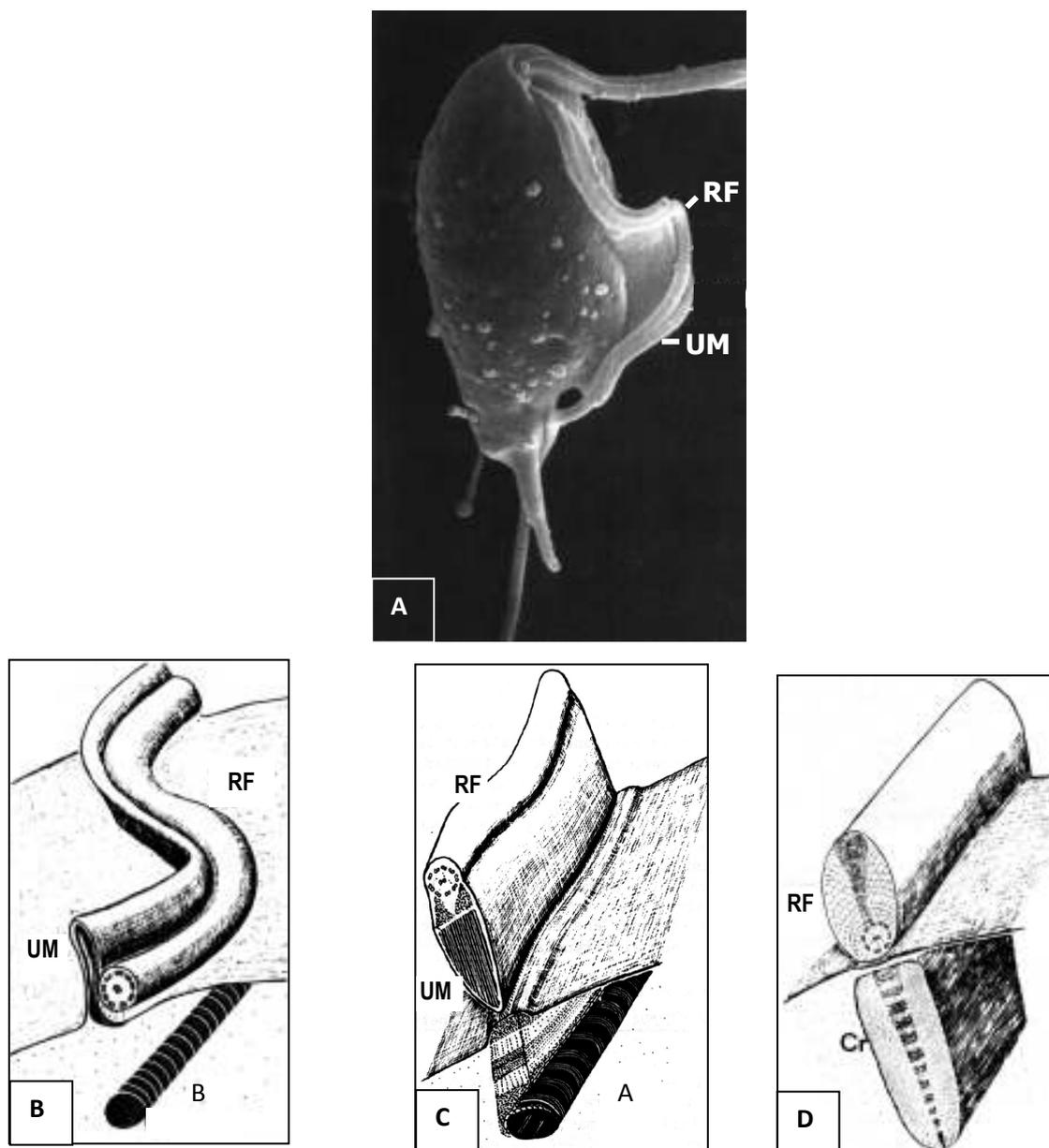


Figure 11 : Les différents types de membranes ondulantes chez les trichomonadines. **A** : Vue en microscopie à balayage de la membrane ondulante de *Trichomitus batrachorum* (d'après Germot et al., 1996a). ($\times 7200$) ; **B** : Membrane ondulante du type *Trichomonas* ; **C** : Membrane ondulante du type *Tritrichomonas* ; **D** : Membrane ondulante du type Devescovinidae (B, C, D : d'après Brugerolle, 1976). Abréviations : B : côte du type *Trichomonas* ; A : côte du type *Tritrichomonas* ; Cr : cresta ; RF : flagelle récurrent ; UM : membrane ondulante.

ii) celle du type *Tritrichomonas* qui a une forme de rail, où la gaine du flagelle récurrent est toujours dilatée. Plusieurs strates microfibrillaires relient alors la partie proximale de la membrane ondulante à un système d'arceaux situés sur la côte.

iii) celle du type Devescovinidae (ex : genre *Devescovina*) où l'on observe un flagelle récurrent dilaté et une structure homologue aux strates microfibrillaires de la membrane ondulante du type *Tritrichomonas*, appelée cresta (Kirby, 1941 ; Joyon et al., 1969 ; Brugerolle, 1976). Cette cresta est aussi présente chez certaines hypermastigines et c'est en particulier sur ce critère que fut créé l'ordre des Cristamonadida par Brugerolle et Patterson (2001) (voir Par. IV).

II-2-4- La côte

La côte est une large fibre striée périodique (**Figures 9D, 12A et 12B**), rattachée aux cinétosomes et présente uniquement chez les trichomonadines possédant une membrane ondulante. Elle a la forme d'une baguette droite ou arquée selon les genres, qui suit le trajet de la membrane ondulante et s'étend immédiatement sous elle dans le cytoplasme. De ce fait, l'hypothèse que la côte puisse avoir un rôle de support mécanique de la membrane ondulante fut avancée (Kulda et al., 1986). Cette fibre est constituée de microfilaments longitudinaux de 2-4 nm de diamètre.

Deux types de côtes ont été décrits selon leur zone d'insertion et leur profil de striation (**Figures 12C et 12D**) :

i) le type B ou type *Trichomonas* : la côte est large à sa base et prend naissance sous toute la face du cinétosome R. Elle peut présenter une structure grillagée bien visible en coupe longitudinale chez certains genres comme *Pentatrichomonas* (Honigberg et al., 1968) et *Pentatrichomonoides* (Brugerolle et al., 1994).

ii) le type A ou type *Tritrichomonas* : la côte est étroite à sa base et prend naissance au niveau du cinétosome 2. Deux structures, le peigne et le corps sous-cinétosomien, viennent généralement occuper l'emplacement de l'insertion de la côte de type B. Elle n'a pas d'aspect grillagé visible en coupe longitudinale.

En fait, cette dichotomie n'est pas si simple, puisque, par exemple, le genre *Trichomitopsis* possède une côte dont le profil de striation est de type B (avec aspect grillagé) mais dont l'insertion est de type A (Hollande et Valentin, 1968 ; Mattern et Honigberg, 1971). De plus, certaines côtes sont motiles. C'est le cas chez *Trichomitopsis termopsidis*, où une activité ATPasique a été détectée dans cet organite (Amos et al., 1979), et chez *Pseudotrypanosoma giganteum* (Brugerolle, 1999).

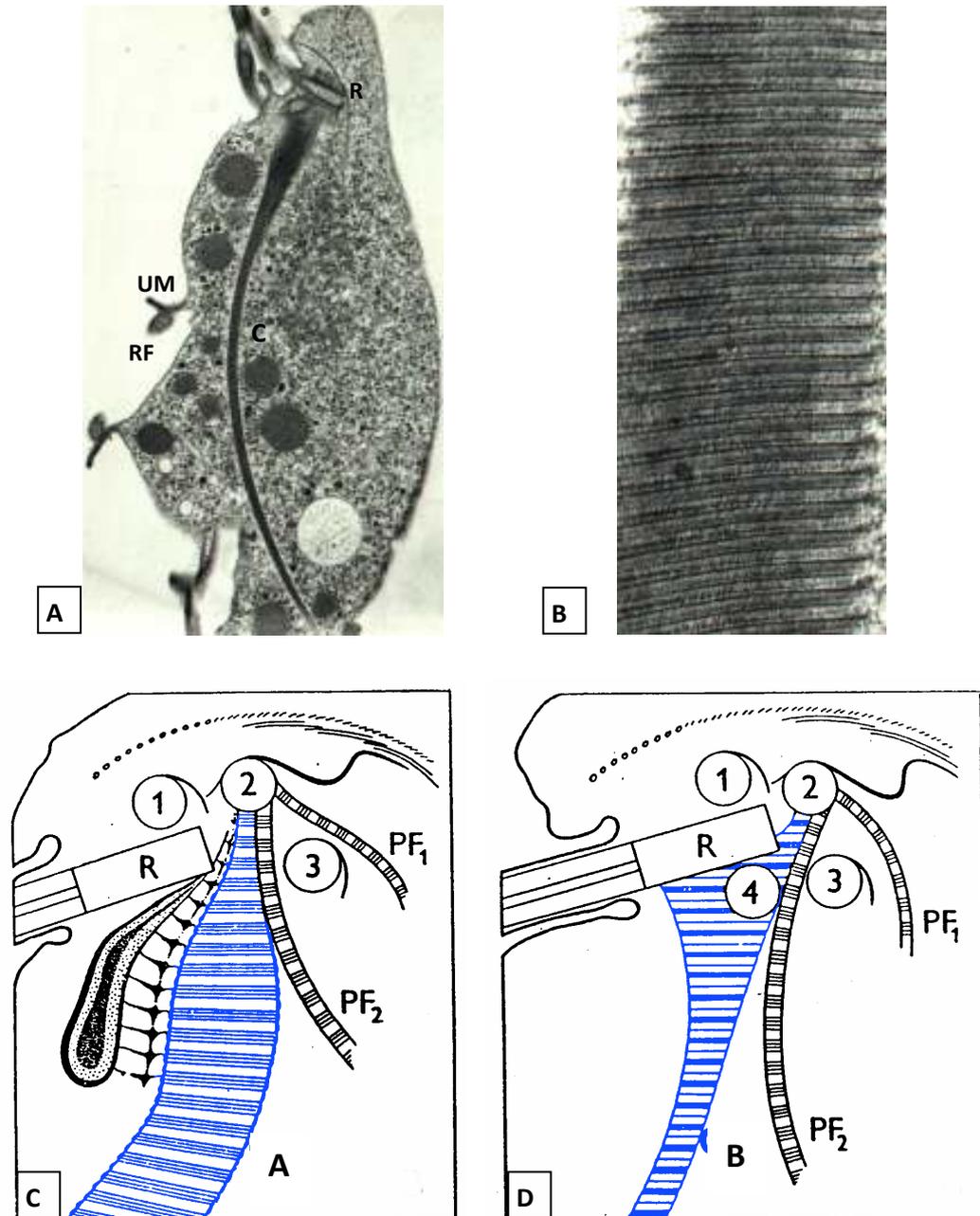


Figure 12 : La côte des trichomonades.. **A :** Chez *Trichomonas vaginalis*, la côte (C) est rattachée au cinétosome du flagelle récurrent (R) et suit le trajet de la membrane ondulante (UM) en s'étendant sous elle dans le cytoplasme (d'après Viscogliosi et Brugerolle, 1994b). (x 10000) ; **B :** Coupe longitudinale montrant le pattern de striation de la côte de type A chez *Tritrichomonas foetus* (d'après Viscogliosi et Brugerolle, 1994b). (x 80000) ; **C, D :** Représentation schématique des deux types de côte (A et B) (d'après Kulda et al., 1986)..
Abréviations : PF1 et PF2 : fibres parabasales ; RF : flagelle récurrent ; R, 1, 2, 3 et 4 : cinétosomes.

II-2-5- Autres dérivés cinétosomiens

D'autres structures microfibrillaires peuvent être rattachées aux cinétosomes, mais nous n'avons pas d'informations sur leur structure fine et leur fonction. Chez les trichomonadines, les cinétosomes 1 et 3 peuvent porter sur l'un des triplets une lame en forme de crochet, à structure périodique, appelée « hook fiber » ou lame d'ancrage selon les auteurs. Elles sont homologues aux lames d'ancrage fixées sur les cinétosomes de l'aire flagellaire de l'hypermastigine *Joenia* (Hollande et Valentin, 1969). Citons aussi la zone X, la lamelle marginale, les fibres AF1 ou AXF1, le peigne ou encore les corps supra- ou sous-cinétosomiens qui peuvent être présents et plus ou moins développés selon les genres.

III- L'EMERGENCE DES PARABASALIA DANS L'EUCARYOGENESE

III-1- D'après l'analyse des caractères morphologiques

Jusqu'à ces vingt dernières années, les relations de parenté entre groupes de protistes étaient couramment établies d'après l'analyse comparative des caractères cytologiques. Citons entre autre le travail courageux mais prudent de Taylor (1978), qui chercha à positionner différents groupes de protistes flagellés dans un arbre global des eucaryotes en utilisant différents critères, comme la morphologie des crêtes mitochondriales, des flagelles, des plastes ou bien encore le type de mitose. Dans son arbre, la plupart des groupes étudiés, incluant les Parabasalia, avaient une position incertaine. Brugerolle (1976) essaya de comparer la cellule des Parabasalia avec celles d'autres ordres de flagellés potentiellement proches, comme les retortamonadines, les diplomonadines ou les oxymonadines. Pour lui, il était impossible d'établir des relations phylétiques directes entre ces flagellés et les Parabasalia sur la base des données morphologiques. Plus récemment, Cavalier-Smith (1987, 1989) proposa de classer les Parabasalia avec les métamonadines, microsporidies et les Archamoebae dans le phylum des Archezoa, dont les membres ne possèdent pas de mitochondries ni de peroxisomes. Pour cet auteur, l'absence de tels organites faisait de ces groupes de protistes les taxons ayant la position la plus précoce au sein de l'eucaryogenèse, puisque leur émergence avait précédé l'endosymbiose mitochondriale et donc celle de tous les autres eucaryotes possédant des mitochondries. Pourtant, les Parabasalia furent rapidement exclus des Archezoa, car ayant des dictyosomes et des hydrogénosomes (Cavalier-Smith, 1991, 1993), et intégrés dans le sous-phylum des Dictyozoa (**Figure 13**). En effet, pour Cavalier-Smith, les hydrogénosomes étaient des mitochondries transformées et, de ce fait, les Parabasalia ne pouvaient pas être regroupés avec des organismes supposés primitivement dépourvus de mitochondries. A ce stade, les

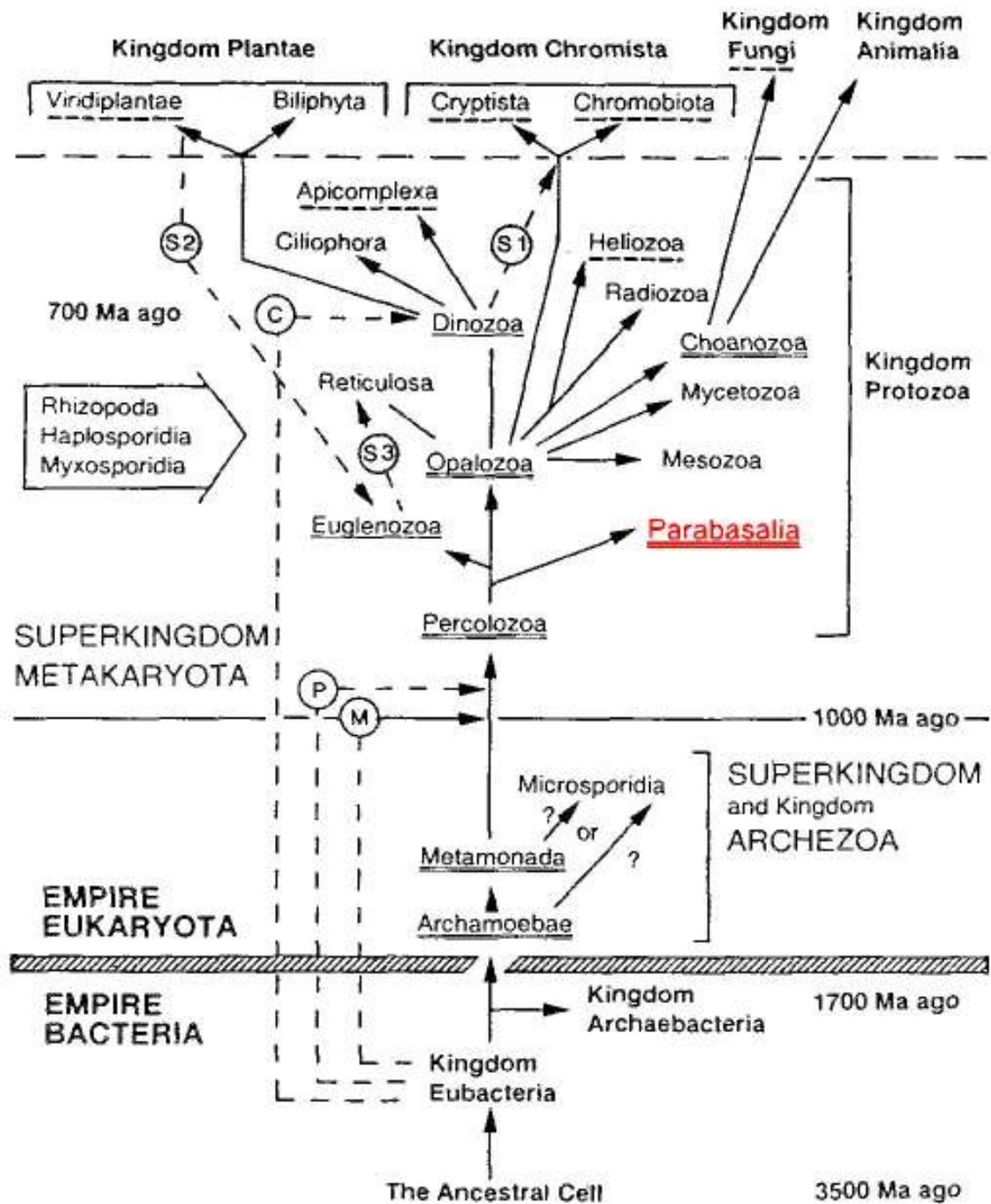


Figure 13 : Les Parabasalia sont exclus des Archezoa et inclus dans le sous-phylum des Dictyozoa (d'après Cavalier-Smith, 1991).

Archezoa, dépourvus de mitochondries et de dictyosomes, étaient situés à la base de l'arbre des eucaryotes, suivis des Parabasalia qui avaient l'émergence la plus précoce au sein des Dictyozoa.

III-2- D'après l'analyse des données moléculaires

Pour différentes raisons, les molécules d'ARNr sont rapidement devenues des indicateurs moléculaires incontournables pour tenter de préciser les relations phylogénétiques entre ou au sein de groupes d'organismes. Sogin (1989, 1991) fut ainsi le premier à proposer un arbre global du vivant incluant la séquence de l'ARNr 18S d'un représentant des Parabasalia, en l'occurrence, *Trichomonas vaginalis*. Cet arbre montrait la séparation des trois grandes lignées du vivant que sont les Eubacteria (ou aujourd'hui Bacteria), les Archaeobacteria (ou Archaea) et les Eukaryota (**Figure 14**). Au sein des eucaryotes, les Parabasalia avaient une émergence très précoce avec les microsporidies, comme *Vairimorpha*, et les diplomonadines, comme *Giardia*. Il est à noter que les premières phylogénies basées sur des séquences partielles de l'ARNr 28S suggéraient aussi l'émergence précoce des Parabasalia (Baroin et al., 1988 ; Viscogliosi et al., 1993). Très vite, Leipe et al. (1993) ont montré que l'ordre d'émergence des microsporidies, diplomonadines et Parabasalia pouvait dépendre du choix des groupes bactériens utilisés pour enracer l'arbre (groupes extérieurs ou outgroups). L'ordre d'émergence des trois groupes de protistes variait alors en fonction du pourcentage de G+C des groupes extérieurs bactériens choisis.

Toutes les phylogénies plus récentes basées sur cet indicateur (voir par exemple Gunderson et al., 1995 ; Sogin et al., 1996 ; Sogin, 1997 ; Sogin et Silberman, 1998) confirmaient la position primitive des Parabasalia. Mais pour ce groupe de protistes comme pour d'autres, il a été suggéré que leur émergence précoce pouvait être un artefact lié au phénomène dit « d'attraction des longues branches ou LBA » (Philippe et Laurent, 1998 ; Philippe et Germot, 2000). En simplifiant, des molécules comme les ARNr de certains protistes supposés primitifs peuvent avoir une vitesse d'évolution plus rapide que celle observée pour d'autres organismes. Si c'est aussi le cas pour les groupes extérieurs choisis dans l'analyse, il en résultera une « attraction » entre taxons dits à longues branches. De ce fait, l'organisme étudié sera proche du groupe extérieur et donc à la base de l'arbre, sans pour cela que ce soit sa véritable position phylogénétique.

Cependant, sur la base de la comparaison des séquences d'énolase, Keeling et Palmer (2000) maintenaient l'idée que les Parabasalia pouvaient former la lignée la plus primitive au sein des eucaryotes. Cette hypothèse était pourtant de nouveau largement remise en question par Baptiste et Philippe (2002). Pour ces derniers, la position basale des Parabasalia était probablement liée là encore à un artefact du fait d'un phénomène de LBA ou à un ancien transfert de gène d'une bactérie vers l'ancêtre de ces protistes ce qui faussait ainsi la position de

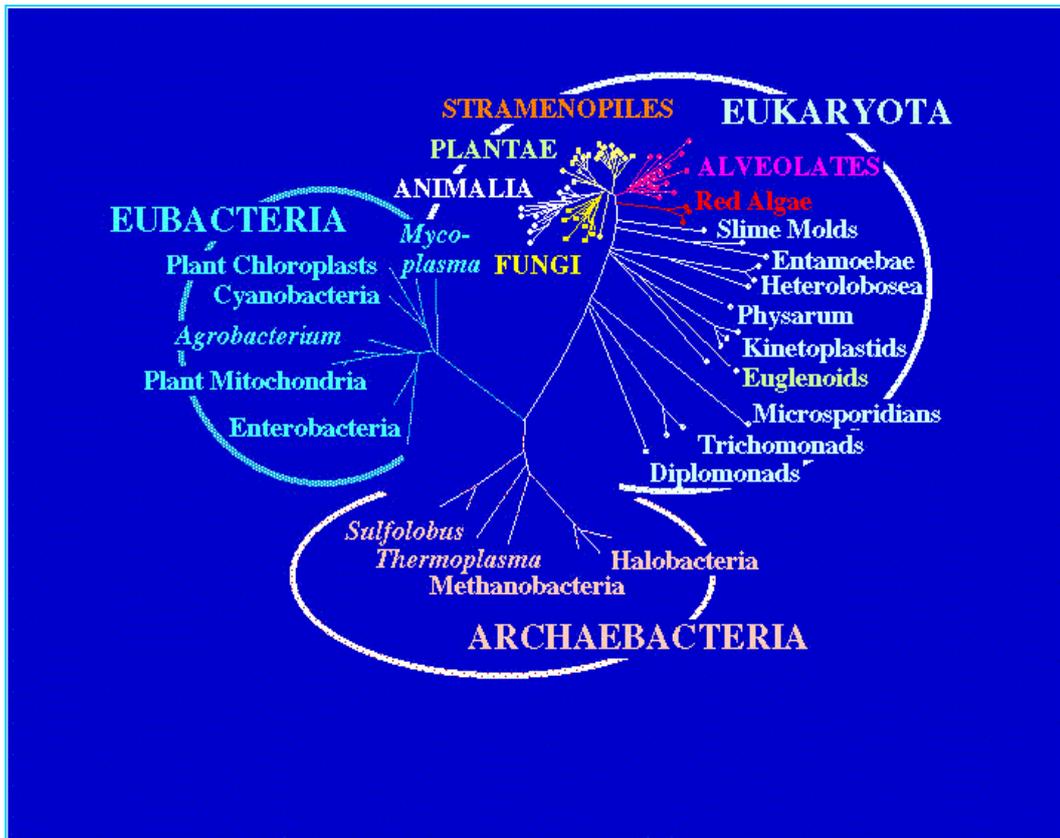


Figure 14 : Arbre universel du vivant (modifié d'après Sogin, 1991). Les trois règnes constituant le monde vivant sont bien délimités. Noter l'émergence précoce des trichomonadines au sein des eucaryotes.

ce groupe dans l'arbre. En parallèle, Philippe et al. (2000) développaient l'hypothèse du « big bang » qui suggérait une rapide diversification de toutes les lignées eucaryotes. Ainsi, déterminer un quelconque ordre d'émergence des groupes de protistes dans l'eucaryogenèse n'était plus guère d'actualité.

En 2002, dans une nouvelle classification des protistes, Cavalier-Smith proposait d'intégrer les Parabasalia dans un large sous-phylum appelé Excavata. La composition de ce nouveau groupe a été détaillée dans la foulée par plusieurs auteurs (Cavalier-Smith, 2003 ; Simpson, 2003). Il contient une dizaine de groupes dont les Preaxostyla (oxymonadines...), Jakobida, Fornicata (diplomonadines, retortamonadines...), Heterolobosea, Euglenozoa et bien sûr Parabasalia. Ce regroupement se base sur des caractères morphologiques communs (sans rentrer dans les détails, c'est entre autre une organisation de l'appareil flagellaire assez similaire et la présence pour la plupart d'entre eux d'un « feeding groove » ou bouche ventrale permettant la capture des proies) et sur les phylogénies moléculaires (**Figures 15 et 16**). Ainsi la plupart des eucaryotes étaient regroupés en 6 groupes (Simpson et Roger, 2004) qui sont les Opisthokonta, Amoebozoa, Plantae, Chromalveolata, Rhizaria et bien sûr Excavata (**Figure 17**) mais très vite s'est posée la question de leur monophylie.

La monophylie des Excavata a été dans un premier temps confirmée par Hampl et al. (2005) par la reconstruction de phylogénies basées sur la concaténation des séquences de 8 marqueurs différents. Ces auteurs mettaient aussi en évidence un groupe très bien supporté au sein des Excavata et appelé Metamonada qui englobait les Parabasalia, les diplomonadines comme *Giardia* et les oxymonadines. Simpson et al. (2006) confirmèrent que les Parabasalia représentaient le groupe-frère des diplomonadines et du protiste libre dépourvu de mitochondrie *Carpodomonas*. Par contre, d'après ces auteurs, les oxymonadines formaient un groupe monophylétique plus éloigné. Il est intéressant de signaler que ce lien de parenté entre Parabasalia et diplomonadines avait été auparavant suggéré dans de nombreuses phylogénies.

Par la suite, Keeling et al. (2005) et Keeling (2007) proposèrent un arbre des eucaryotes à 5 « supergroups » au lieu de 6 en fusionnant Amoebozoa et Opisthokonta avec les Parabasalia toujours au sein des Excavata. Dernièrement, Hampl et al. (2009) ont maintenu la classification à 6 groupes sur la base d'analyses phylogénomiques et ont pu déterminer leurs liens de parenté. Ils confirment de nouveau la monophylie des Excavata mais aussi la position des Parabasalia comme groupe-frère des diplomonadines et l'excellente résolution des Metamonada (Parabasalia, diplomonadines et oxymonadines). Dans cet arbre, les deux groupes Opisthokonta et Amoebozoa sont englobés dans le même ensemble des Unikonts, les 4 autres groupes formant les Bikonts. Bien que la position de la racine des eucaryotes reste encore controversée, elle est,

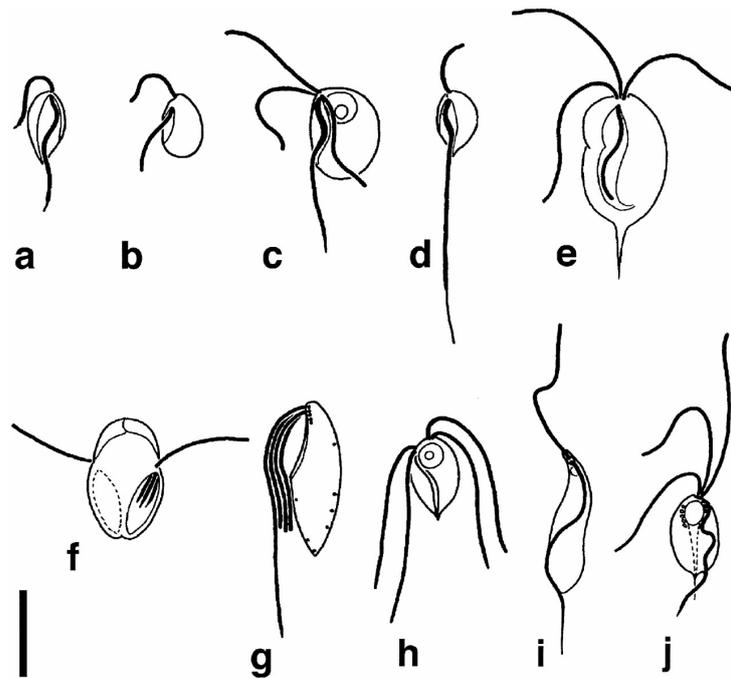


Figure 15 : Apparence en microscopie optique des 10 groupes composant les Excavata (d'après Simpson, 2003). **A** : Jakobid ; **B** : *Mallawimonas* ; **C** : *Trimastix* ; **D** : *Carpediomonas* ; **E** : Retortamonad ; **F** : Diplomonad ; **G** : Heterolobodea ; **H** : Oxymonad ; **I** : Euglenozoa ; **J** : Parabasalia.

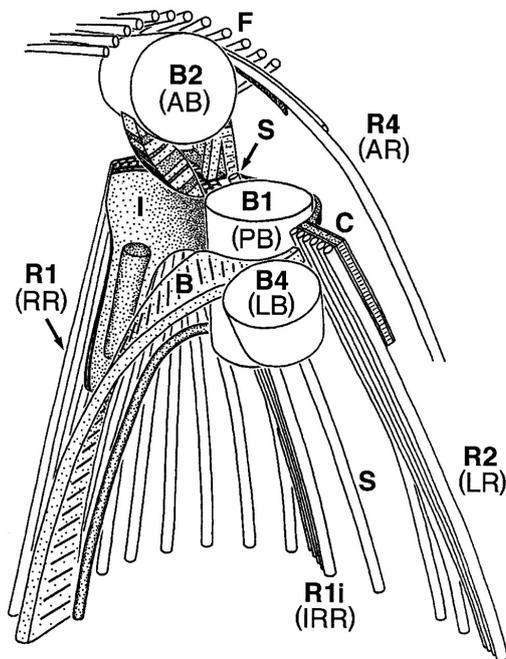


Figure 16 : Appareil flagellaire typique d'un Excavata (d'après Simpson, 2003). Abréviations : Bn : cinétosomes ; B et C : fibres ; F ; microtubules.

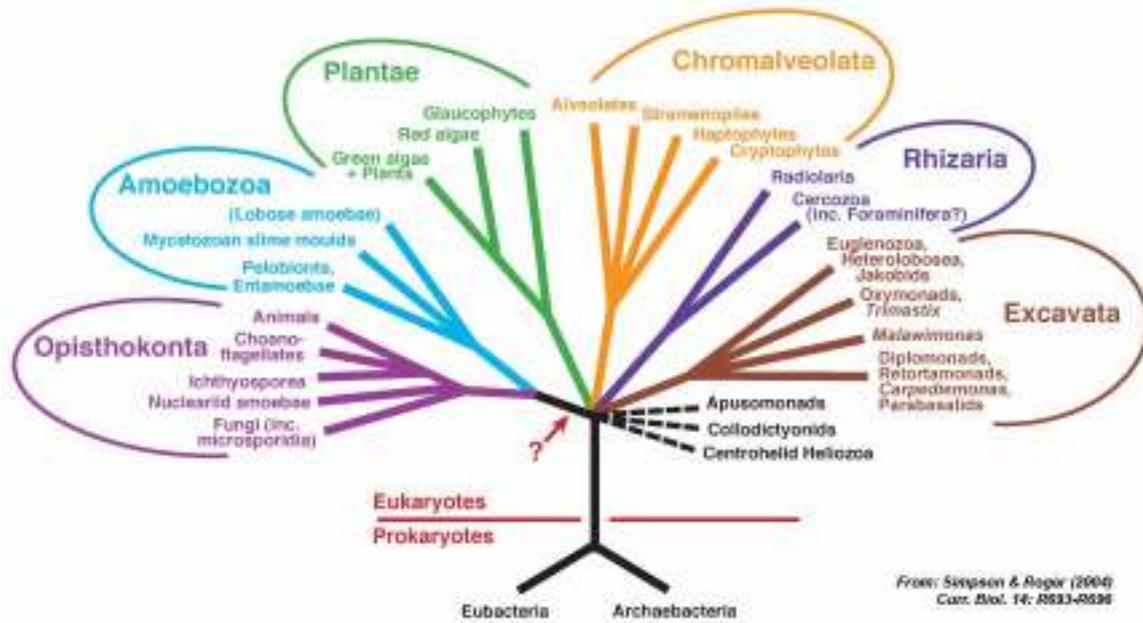


Figure 17 : Arbre schématisé montrant la répartition de la plupart des eucaryotes en 6 groupes majeurs dont les Excavata (d'après Simpson et Roger, 2004).

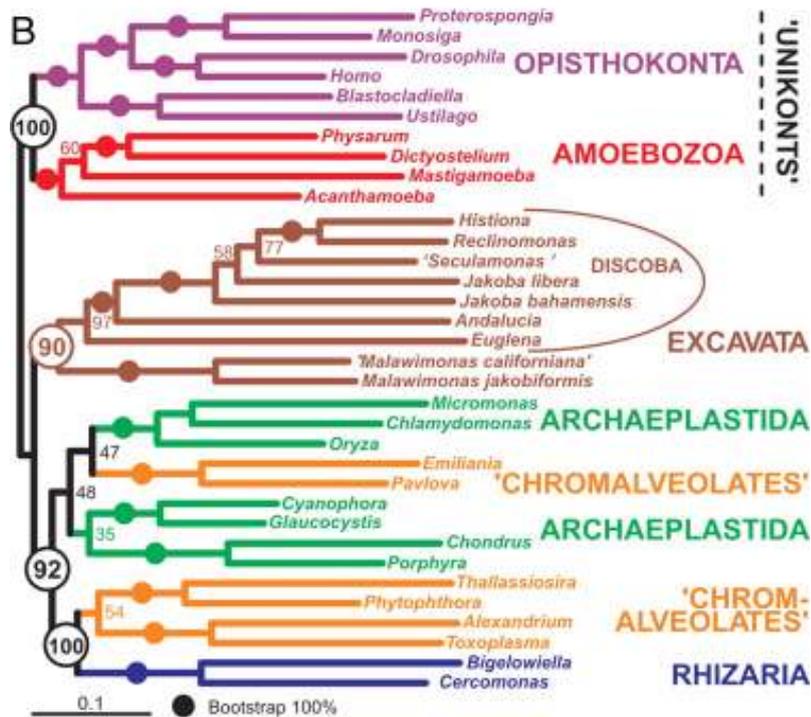


Figure 18 : Analyse phylogénomique des 6 super groupes d'eucaryotes. Les Excavata ont l'émergence la plus précoce au sein des Bikonts (d'après Hampl et al., 2009).

pour les auteurs, probablement quelque part entre les Unikonts et les Bikonts. De ce fait, cela implique que les Excavata forment le groupe le plus primitif au sein des Bikonts (**Figure 18**).

IV- SYSTEMATIQUE ET EVOLUTION DES PARABASALIA

Préambule : A la toute fin de ma thèse, une nouvelle systématique des Parabasalia a été proposée par Cepicka et al. (2010) sur la base des données morphologiques et moléculaires. Elle n'est donc pas prise en compte dans la présentation des résultats mais fera l'objet d'une analyse toute particulière dans la discussion générale de cette thèse.

IV-1- D'après l'analyse des caractères morphologiques

Les premières taxonomies de ce groupe étaient basées sur l'analyse comparative d'un nombre restreint de caractères morphologiques portant essentiellement sur la structure et le développement du cytosquelette (Grassé 1952 ; Honigberg, 1963 ; Hollande et Carruette-Valentin, 1971 ; Brugerolle, 1976, 1986 ; Yamin, 1979 ; Levine et al., 1980 ; Cavalier-Smith, 1997, 1998, 2002 ; Brugerolle et Lee, 2001). Même si, sans rentrer dans les détails, ces études révélaient entre elles des différences mineures, on peut dire que globalement elles se recoupaient. Ainsi, les Parabasalia étaient traditionnellement divisés en deux classes (Brugerolle et Lee, 2001) (**Figure 19**). La première classe des Trichomonadea était composée d'un seul ordre, les Trichomonadida et de 5 familles : Trichomonadidae, Monocercomonadidae, Devescovinidae, Calonymphidae et Cochlosomatidae avec au sein de chacune de ces familles plusieurs sous-familles comme les Trichomonadinae (*Trichomonas*) et les Tritrichomonadinae (*Tritrichomonas*). Concernant la deuxième classe des Hypermastigea, les espèces étaient séparées en trois ordres qui étaient les Lophomonadida, Trichonymphida et Spirotrichonymphida. Les Lophomonadida étaient composés de 6 familles : Joeniidae, Lophomonadidae, Kofoidiidae, Rhizonymphidae, Microjoenidae, et Deltotrichonymphidae. Il en était de même pour les Trichonymphida avec les Hoplonymphidae, Staurjoenidae, Trichonymphidae, Eucomonymphidae, Teranymphidae et Spirotrichosomidae. Enfin l'ordre des Spirotrichonymphida était composé de trois familles : Spirotrichonymphidae, Holomastigotoididae et Holomastigotidae.

On peut remarquer que cette systématique était basée sur un concept alors bien établi qui était que l'évolution allait de pair avec une complexification progressive de l'ultrastructure de ces micro-organismes. La première famille des Trichomonadida, les Monocercomonadidae, a une position primitive dans ce schéma. Les organismes composant cette famille ont été regroupés dans le même taxon car ayant un cytosquelette rudimentaire constitué d'un complexe axostyle-pelta plus ou moins développé, de flagelles en nombre variable (en général 4) et des fibres parabasales. Par contre, ils ne possèdent pas de côte ni de membrane ondulante.

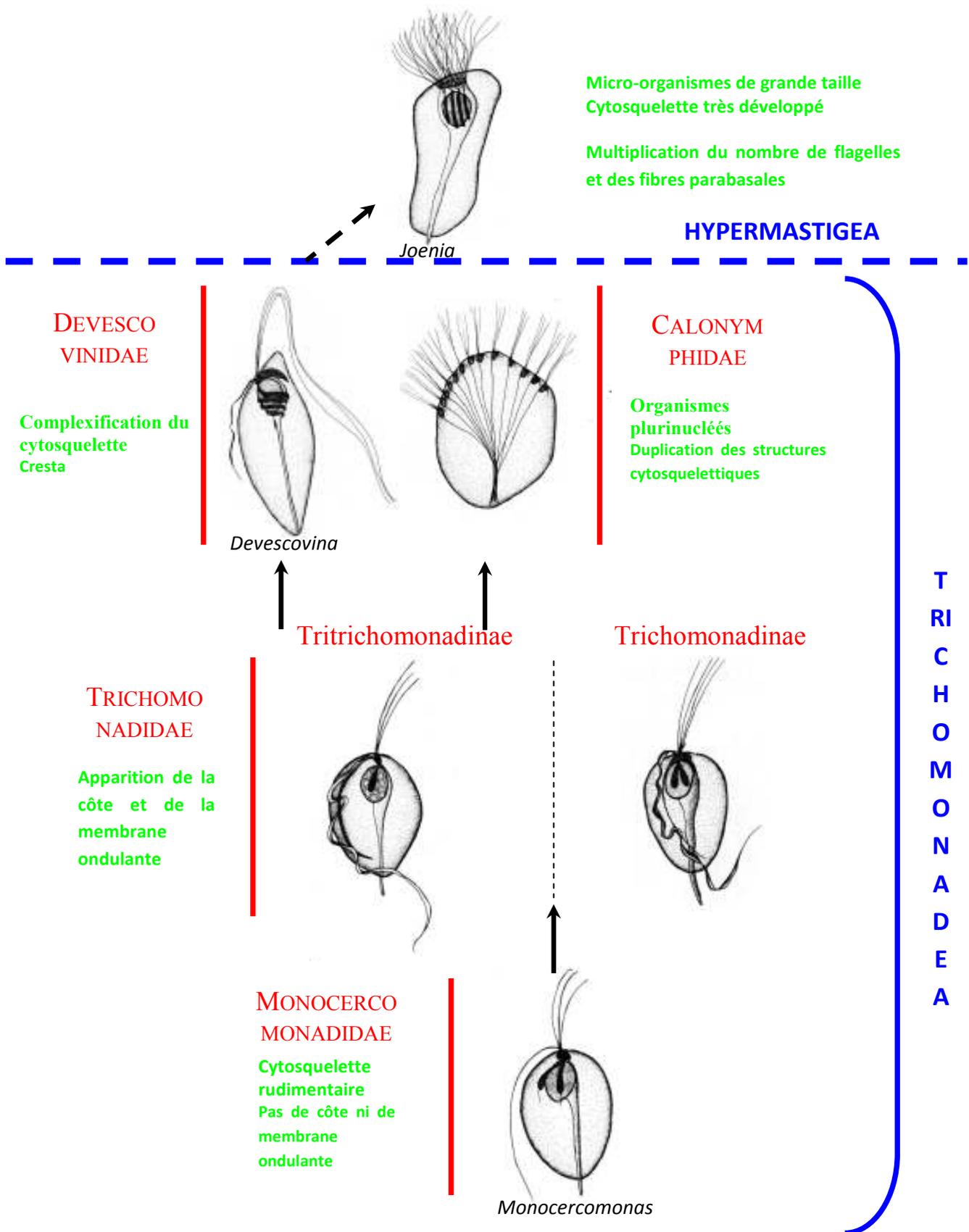


Figure 19 : Systématique des Parabasalia établie d'après les caractères morphologiques (modifiée d'après Dyer, 1989). Noter la complexification progressive de ces micro-organismes.

Avec la seconde famille des Trichomonadidae, le cytosquelette commence à se développer avec l'apparition de la côte et de la membrane ondulante. Au sein de cette famille, on note une dichotomie entre les Trichomonadinae, incluant *Trichomonas vaginalis*, et les Tritrichomonadinae, incluant *Tritrichomonas fetus*. Ces deux principales sous-familles de Trichomonadidae ont des types de côte et de membrane ondulante différents. Avec la troisième famille des Devescovinidae, les cytosquelettes microtubulaire et microfibrillaire poursuivent leur complexification et il apparaît même une nouvelle structure microfibrillaire appelée cresta. Puis, avec les Calonymphidae, on observe probablement une tentative de passage à l'état pluricellulaire, puisque de nombreux représentants de cette famille sont plurinucléés et ont dupliqué la plupart de leurs structures cytosquelettiques. Notons que le seul représentant de la cinquième famille des Cochlosomatidae, en l'occurrence *Cochlosoma anatis*, n'a pas été intégré dans ce schéma puisque son identification est plus récente (Pecka et al., 1996). Pourtant, une rapide analyse ultrastructurale de ce micro-organisme suggère une probable affinité avec les Trichomonadinae (mêmes types de côte et de membrane ondulante). Pour finir, on retrouve au sommet de cet arbre les hypermastigines qui sont des cellules de grande taille, ayant un cytosquelette très développé caractérisé par une multiplication du nombre des flagelles et des fibres parabasales.

En résumant, on voit donc qu'à partir de genres de base simples comme le genre *Monocercomonas*, qui semble avoir toutes les potentialités évolutives pour donner naissance à la plupart des lignées de trichomonadines (Mattern et al., 1972), se sont différenciés d'autres genres chez lesquels le cytosquelette s'est compliqué par acquisition de nouvelles fibres ou structures en même temps qu'une augmentation du nombre des flagelles et de la taille des cellules. De ce fait, les organismes à cytosquelette simple, comme ceux appartenant à la famille des Monocercomonadidae, avaient une position basale dans cet arbre, alors que les organismes à cytosquelette complexe avaient une émergence plus tardive.

IV-2- D'après l'analyse des séquences des gènes d'ARN ribosomiques

La première phylogénie moléculaire intégrant plusieurs séquences d'ARNr de Parabasalia a été publiée en 1993 par Viscogliosi et al. Cette phylogénie, basée sur les séquences partielles de l'ARNr 28S, incluait 7 espèces représentant seulement deux familles de trichomonadines, les Trichomonadidae et les Monocercomonadidae. Elle confirmait en particulier la dichotomie Trichomonadinae – Tritrichomonadinae et suggérerait déjà que des Monocercomonadidae à cytosquelette simple pouvaient avoir perdu secondairement certaines structures cytosquelettiques. A partir de cette étude, seules les séquences d'ARNr 18S ont été utilisées pour clarifier les relations phylogénétiques de ce groupe.

Ainsi, deux ans plus tard, Gunderson et al. (1995) publiaient une phylogénie incluant 9 séquences d'ARNr 18S de Parabasalia (**Figure 20**). Sur cet arbre, on note que ce sont les symbiontes du termite *Reticulitermes flavipes* qui ont l'émergence la plus précoce au sein des Parabasalia. Or ces symbiontes, non identifiés à ce moment-là, étaient probablement des hypermastigines, d'après les travaux de Yamin (1979) qui avait inventorié tous les Parabasalia présents dans le tube digestif de ces insectes. Cette hypothèse sera d'ailleurs confirmée un peu plus tard (Dacks et Redfield, 1998 ; Keeling et al., 1998 ; Ohkuma et al., 1998, 2000). Cela suggérait que des organismes à cytosquelette hyper-développé avaient une position primitive dans ce groupe, ce qui renversait la polarité traditionnellement admise du plus simple au plus complexe dans les phylogénies basées sur les caractères morphologiques. D'autre part, Gunderson et al., (1995) montraient que des Monocercomonadidae libres, *Pseudotrichomonas* et *Ditrichomonas*, partageaient un ancêtre commun avec le parasite *Trichomonas vaginalis*. Ces données suggéraient que ces organismes étaient secondairement libres et dérivait de formes symbiontes ou parasites. L'addition, par notre groupe, de deux nouvelles séquences de formes libres, *Monotrichomonas* sp. et *Monotrichomonas carabina* (Edgcomb et al., 1998) puis plus tard de celle de *Honigbergiella* (Hampl et al., 2007) a conforté cette hypothèse. Enfin, Gunderson et al. (1995) confirmaient la dichotomie Trichomonadinae-Tritrichomonadinae et proposaient des parentés phylogénétiques entre Tritrichomonadinae et Devescovinidae/Calonymphidae, ce que corroboraient les données morphologiques (Brugerolle, 1976). Par contre, la position du genre *Monocercomonas* restait incertaine.

La même année, le groupe de H. König obtenait les séquences d'ARNr 18S de la Devescovinidae *Metadevescovina extranea* et des Trichomonadinae *Pentatrichomonoides scroa* et *Trichomitus trypanoides* (Berchtold et König, 1995 ; Berchtold et al., 1995), sans pour cela présenter de phylogénies incluant toutes les séquences de Parabasalia disponibles. Ce manque fut en partie comblé par Silberman et al. (1996), qui en profitèrent pour y rajouter la séquence d'une espèce amiboïde, *Dientamoeba fragilis* (**Figure 21**). Cette cellule est presque entièrement dépourvue de cytosquelette puisque seules les fibres parabasales ont pu être identifiées à l'échelle ultrastructurale (Camp et al., 1974). De plus, elle a un mode de division de type cryptopleuromitose. Ces caractères ont suffi pour rattacher ce taxon aux trichomonadines, et en particulier aux Monocercomonadidae. L'arbre proposé ne permettait pourtant pas de savoir si cet organisme était primitivement de morphologie simple ou s'il avait perdu secondairement ses autres structures cytosquelettiques. Les conclusions étaient pour le reste assez voisines de celles de Gunderson et al. (1995), bien que les auteurs aient remarqué une certaine discordance entre la position de *Trichomitus trypanoides* (groupe-frère de *Trichomonas vaginalis*) et celle observée pour *Trichomitus batrachorum* dans la phylogénie basée sur la comparaison des séquences de

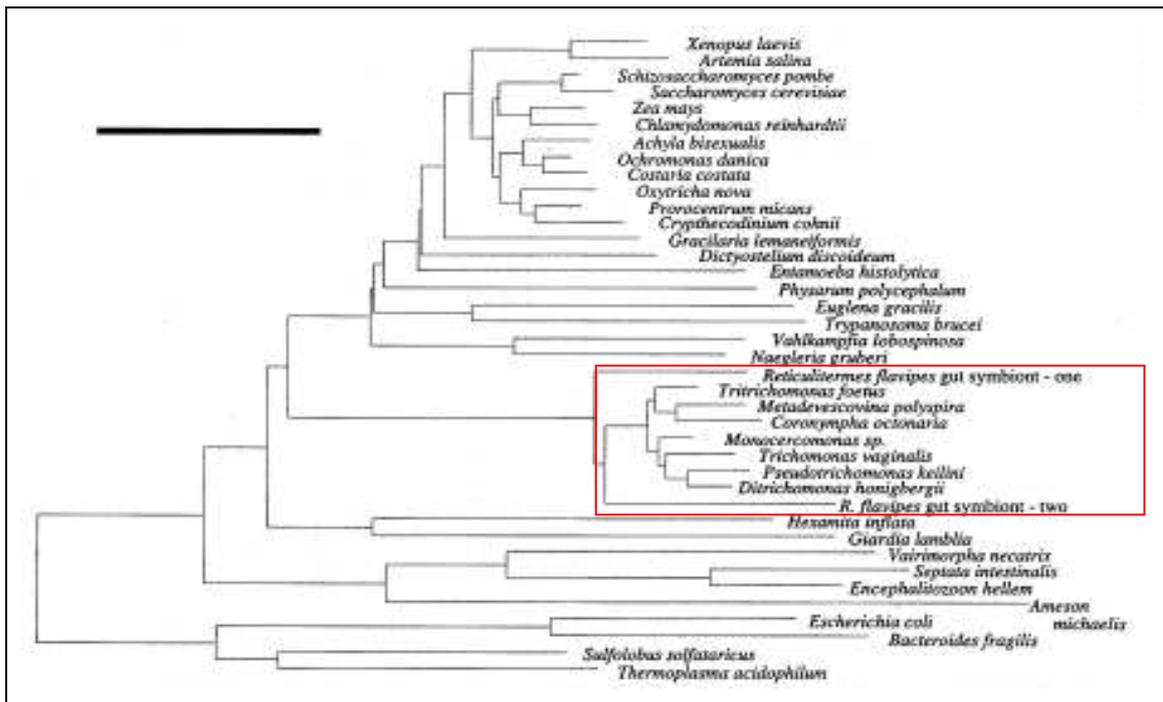


Figure 20 : Phylogénie moléculaire des Parabasalia basée sur la comparaison des séquences de l'ARNr 18S (d'après Gunderson et al., 1995). Les séquences de Parabasalia sont encadrées et forment un groupe monophylétique. Noter la position primitive des symbiontes du termite *Reticulitermes* au sein du groupe.

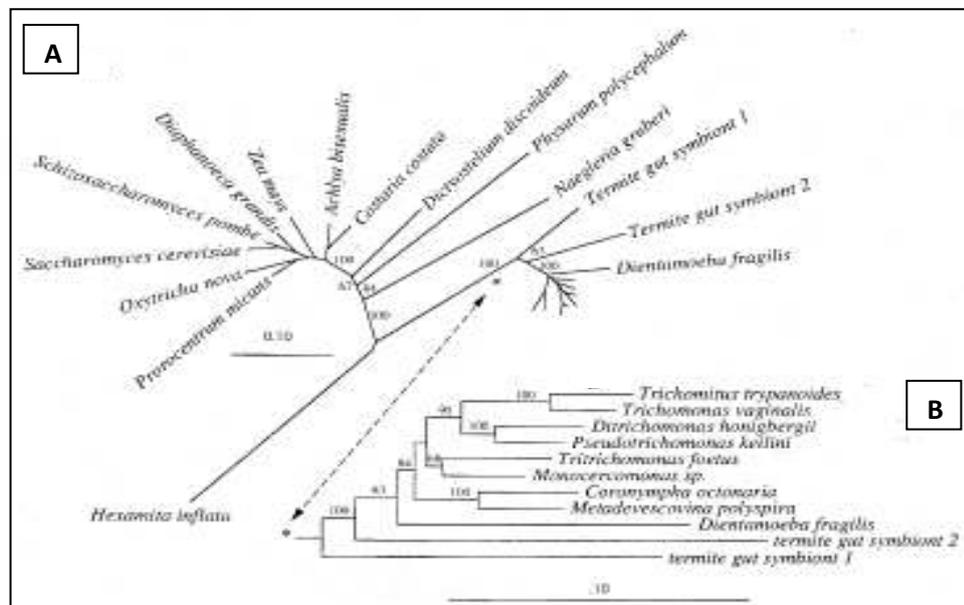


Figure 21 : Phylogénie moléculaire des Parabasalia basée sur l'analyse des séquences de l'ARNr 18S (d'après Silberman et al., 1996). **A :** Arbre non enraciné indiquant la position primitive des symbiontes de termites au sein des Parabasalia. Ceci a permis aux auteurs de proposer un autre arbre enraciné sur ces mêmes symbiontes. **B :** Cette seconde analyse permet d'utiliser un nombre maximal de caractères puisqu'il n'englobe que des séquences de Parabasalia.

l'ARNr 28S (Viscogliosi et al., 1993). Or ces deux espèces étaient censées appartenir au même genre.

Notre groupe a alors séquencé l'ARNr 18S de *Trichomitus batrachorum* tout comme celui de deux Trichomonadinae, *Tetratrichomonas gallinarum* et *Pentatrichomonas hominis* (Delgado-Viscogliosi et al., 2000). Dans l'arbre présenté, qui incluait la séquence de *Trichomonas tenax* précédemment obtenue par Fukura et al. (1996), on notait en effet une forte disparité dans la position des deux espèces de *Trichomitus*. En effet, *Trichomitus trypanoides* émergait au sein des Trichomonadinae, alors que *Trichomitus batrachorum* avait une position plus primitive. Il était donc évident que ces deux espèces ne pouvaient pas appartenir au même genre puisqu'elles ne formaient pas un groupe monophylétique et de ce fait *Trichomitus trypanoides* devait être renommé. Ce fut le cas par Brugerolle et Bordereau (2004) qui proposèrent le nom *Trichomonoides trypanoides* pour cette dernière espèce. En parallèle, nous avons obtenu et intégré dans notre analyse la séquence de *Hypotrichomonas acosta*. Ce taxon est étroitement associé à *Trichomitus batrachorum*. Là encore, nous avons un exemple de perte secondaire de structure cytosquelettique puisque *Hypotrichomonas* est dépourvu de côte et de membrane ondulante, ce qui n'est pas le cas de *Trichomitus batrachorum*.

Dans la même période, trois autres études étaient publiées principalement focalisées sur les Parabasalia symbiontes de termites (Dacks et Redfield, 1998 ; Keeling et al., 1998; Ohkuma et al., 1998). Comme nous l'avons indiqué précédemment, ces travaux confirmaient que certaines séquences, non identifiées à ce jour, correspondaient à l'hypermastigine *Trichonympha*. Il était aussi intéressant de signaler que pour ces auteurs, *Trichonympha* était le taxon ayant l'émergence la plus précoce au sein des Parabasalia. Keeling et al. (1998) ajoutait aussi la séquence du genre *Pseudotrypanosoma* dans leur analyse dont le regroupement au sein des Trichomonadidae était en accord avec les données morphologiques (**Figure 22**).

Ces dernières études de Keeling et al. (1998) et Ohkuma et al. (1998) peuvent être considérées comme les débuts d'une « nouvelle ère » dans l'étude des relations de parenté entre taxons du phylum des Parabasalia. En effet, jusqu'à présent, seules les séquences d'espèces cultivables (trichomonadines) ou facilement isolables généralement de par leur taille (trichomonadines et hypermastigines symbiontes de termites) avaient été obtenues. Ces groupes furent les premiers à présenter et analyser un grand nombre de séquences obtenues à partir d'un mélange de Parabasalia trouvé dans le tube digestif d'un même termite. Ces séquences restaient non identifiées (**Figure 22**) puisque obtenues à partir d'un mélange d'ADNs mais cela ouvrait la porte soit à des suggestions quant à leur origine soit directement à leur identification ultérieure par hybridation *in situ* à l'aide de sondes spécifiques. Et c'est justement cette dernière approche qui fut utilisée par Ohkuma et al. (2000) pour identifier des hypermastigines des genres

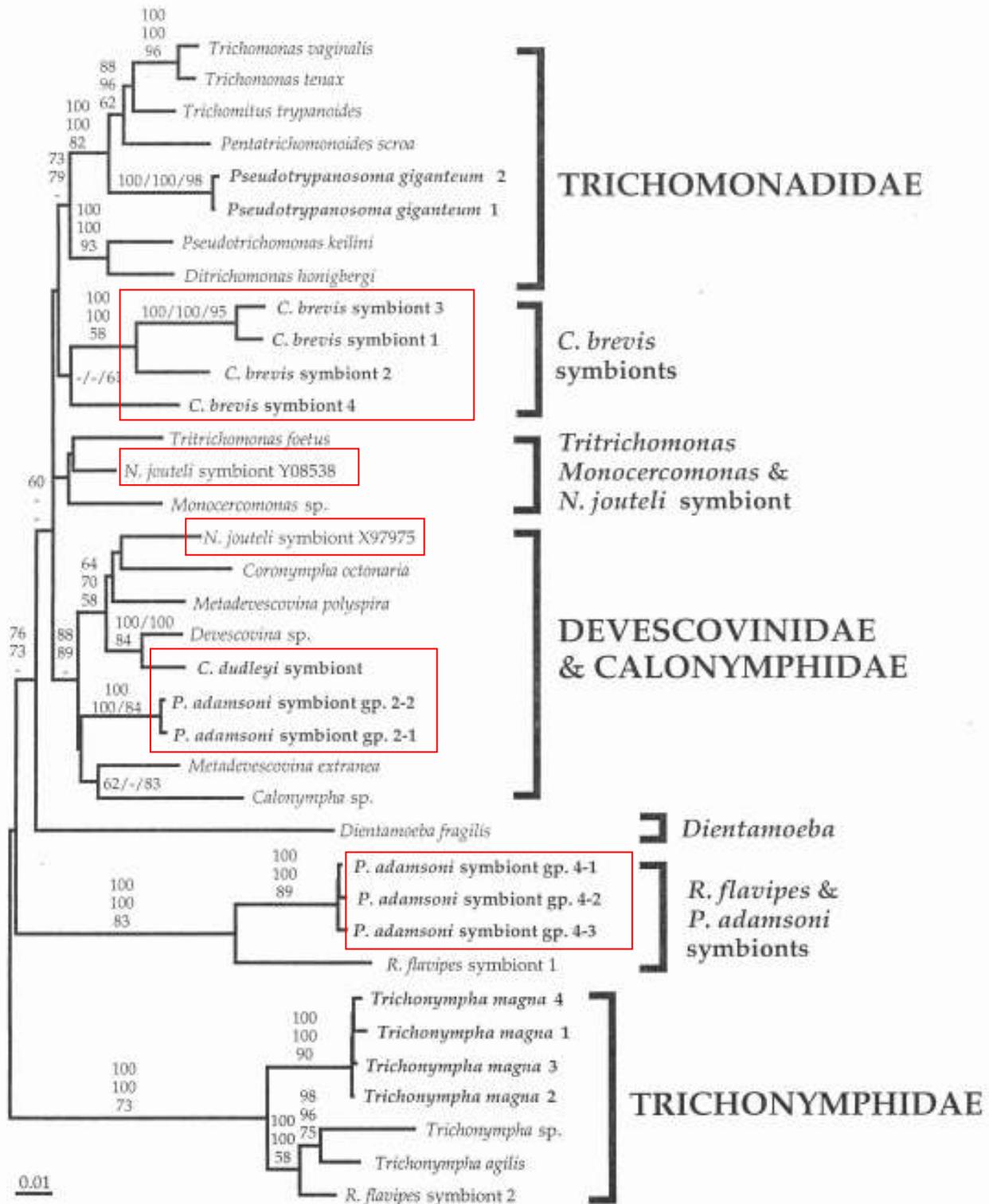


Figure 22 : Phylogénie moléculaire des Parabasalia basée sur l'analyse des séquences de l'ARNr 18S (d'après Keeling et al., 1998). Les séquences non identifiées provenant de Parabasalia des termites *Cryptotermes brevis*, *Neotermes jouteli*, *Cryptotermes dudley* et *Porotermes adamsoni* ont été encadrées.

Pseudotrichonympha, *Spirotrichonympha* et *Holomastigotoides*. L'année suivante, notre équipe intégrait la Monocercomonadidae *Histomonas meleagridis* dans la phylogénie des Parabasalia (Gerbod et al., 2001). Cet organisme a entre autre la particularité de présenter 4 cinétosomes dont un seul est flagellifère. Dans notre arbre, il émerge comme groupe frère de *D. fragilis* qui lui ne possède ni cinétosome ni flagelle. Or ce cluster est lui-même groupe-frère de *Tritrichomonas* qui possède 4 cinétosomes et flagelles suggérant la perte secondaire de structures cytosquelettiques chez *Dientamoeba* et *Histomonas* comme chez d'autres Monocercomonadidae.

En 2002, cette phylogénie s'est de nouveau étoffée avec l'addition par notre équipe de plusieurs Devescovinidae et Calonymphidae (Gerbod et al., 2002) (**Figure 23**). Dans cette étude, nous mettions en évidence une dichotomie inattendue au sein des Calonymphidae qui rappelons-le étaient regroupées au sein de la même famille car étant toutes plurinucléées. D'autre part, aucune des familles de Trichomonadea décrites d'après la systématique classique n'était monophylétique et il en était de même pour les deux classes de Parabasalia. La phylogénie établie par Keeling (2002) et englobant la Trichomonadidae *Trichomitopsis* confirmait cette observation.

Ainsi, sans rentrer dans les détails, de très fortes discordances entre données moléculaires et la systématique dite classique étaient observées. De ce fait, de nombreux auteurs attirèrent l'attention sur la nécessité de réviser la taxonomie de ce groupe de protistes. Brugerolle et Patterson (2001) furent donc les premiers à proposer une nouvelle classification en tenant compte à la fois des données morphologiques et moléculaires. Ils ont ainsi divisé le phylum des Parabasalia en trois grands ordres tout en supprimant les classes. Ces ordres sont les Trichonymphida, Trichomonadida et Cristamonadida. Les Trichonymphida de cette classification regroupaient en fait les deux ordres Trichonymphida et Spirotrichonymphida décrits par Brugerolle et Lee (2001) et leurs 9 familles. Le nouvel ordre des Cristamonadida englobait lui les 6 familles de Lophomonadida de Brugerolle et Lee (2001) plus deux familles de Trichomonadida en l'occurrence les Calonymphidae et les Devescovinidae. Enfin le nouvel ordre des Trichomonadida réunissait les autres familles de trichomonadines c'est-à-dire les Trichomonadidae, Monocercomonadidae, et Cochlosomatidae.

Pourtant, cette classification s'est retrouvée très rapidement de nouveau en désaccord avec les données moléculaires apportées par Hampl et al. (2004) et notre équipe (Ohkuma et al., 2005). En particulier, ces dernières études montraient la séparation des Trichonymphida et Spirotrichonymphida et la polyphylie des Trichomonadida (**Figure 24**). En parallèle, Hampl et al. (2004) ne retrouvaient pas les Trichonymphida à la base de l'arbre des Parabasalia mais ne suggéraient aucune autre position robuste pour la racine de ce groupe. Aussi Adl et al. (2005), dans le cadre d'une taxonomie globale des protistes, proposèrent logiquement une nouvelle

Monocercomonadidae
(rouge)

Trichomonadidae
(bleu)

Devescovinidae
(vert)

Calonymphidae
(violet)

Hypermastigines
(noir)

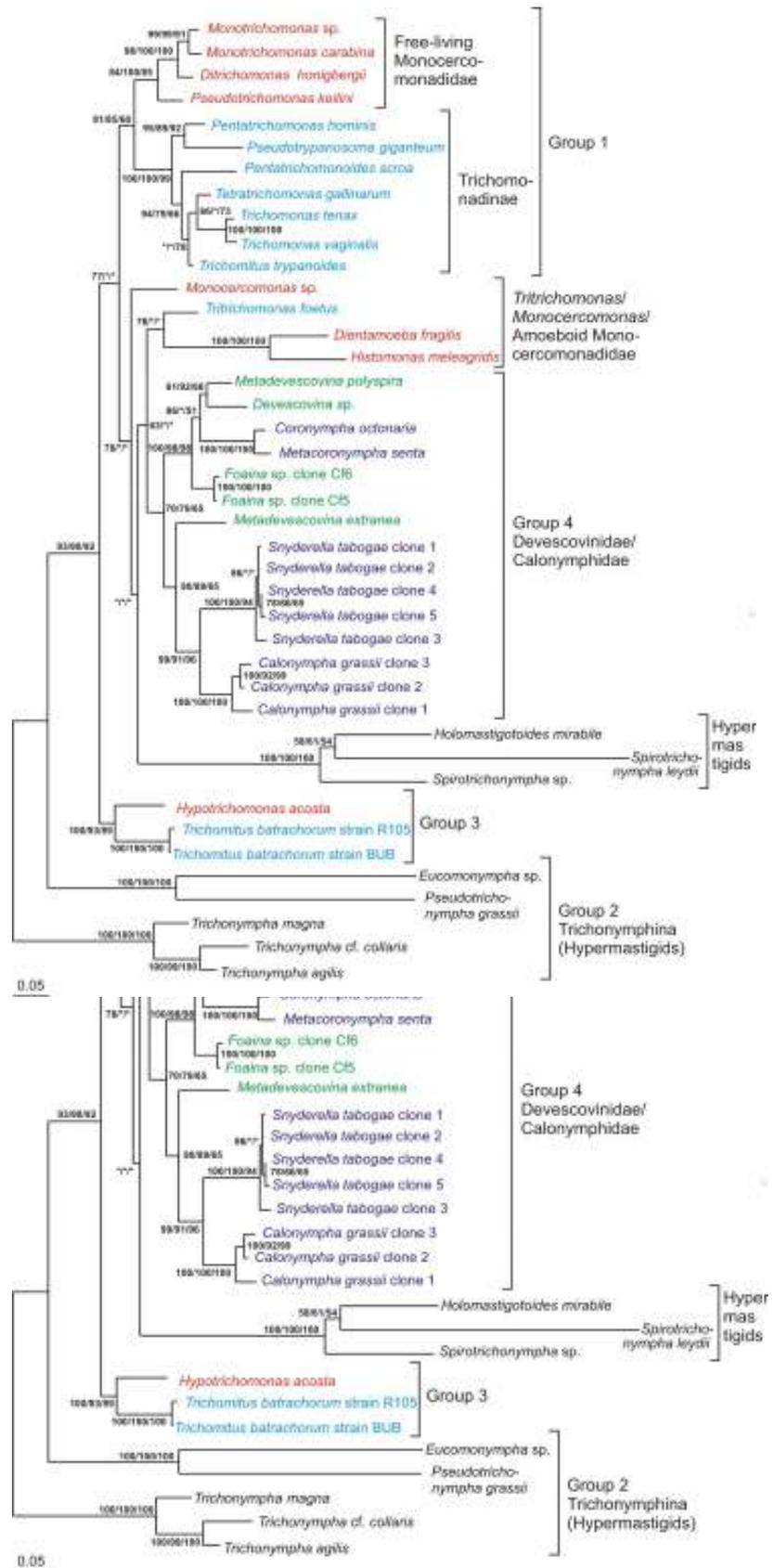


Figure 23 : Phylogénie moléculaire des Parabasalia basée sur la comparaison des séquences de l'ARNr 18S (d'après Gerbod et al., 2002). Noter que toutes les familles de trichomonadines sont polyphylétiques. Il en est de même pour les deux classes de Parabasalia.

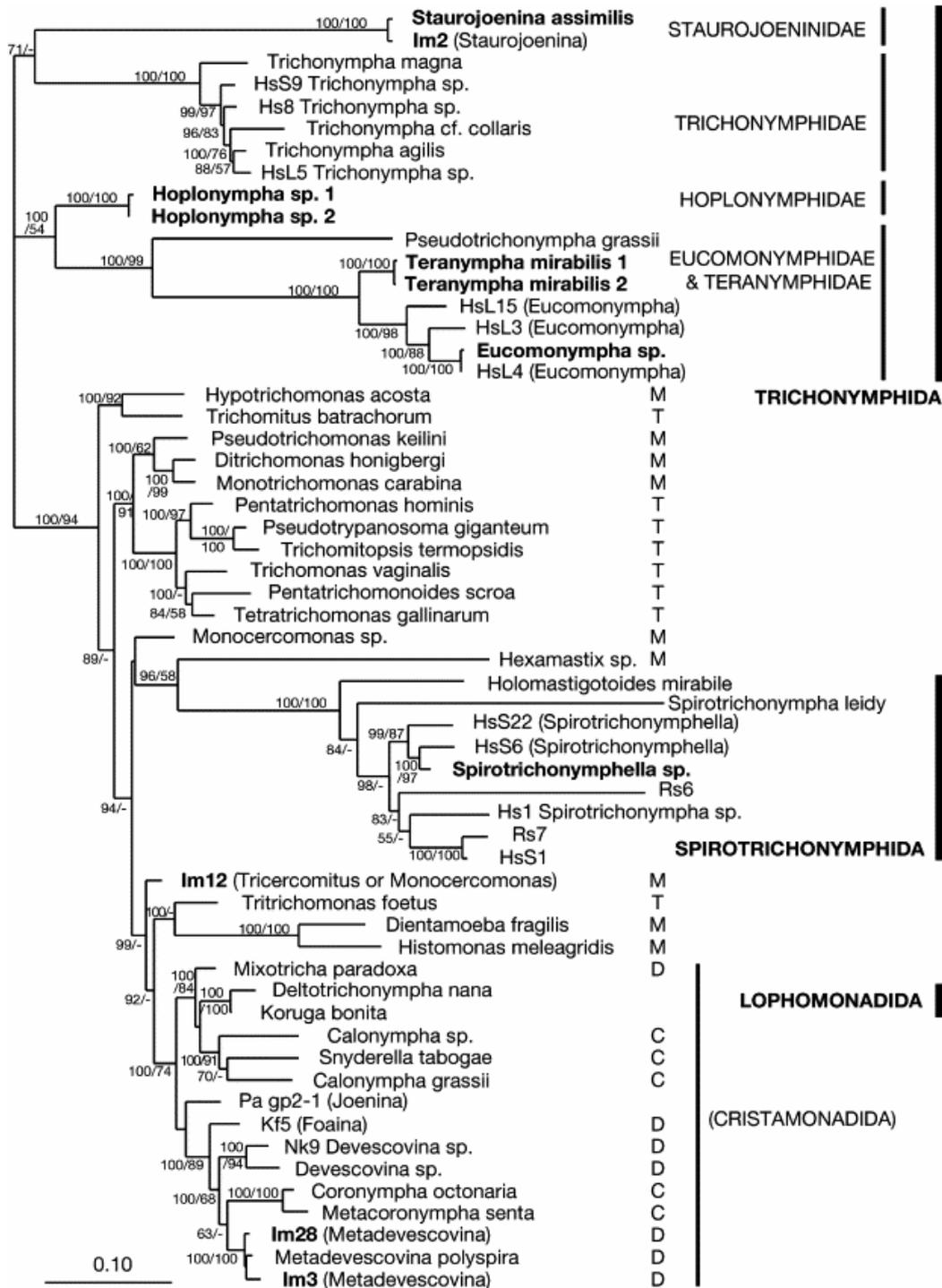


Figure 24 : Phylogénie moléculaire des Parabasalia basée sur les séquences de l'ARNr 18S (d'après Ohkuma et al., 2005). Noter la séparation des Trichonymphida et Spirotrichonymphida et la polyphylie des Trichomonadida. Abréviations : M : Monocercomonadidae ; T : Trichomonadidae ; C : Calonymphidae ; D : Devescovinidae.

systematique à 4 ordres pour les Parabasalia. Elle est très similaire à celle proposée par Brugerolle et Patterson (2001) sauf que Adl et al. (2005) séparent de nouveau les Trichonymphida des Spirotrichonymphida, les deux autres ordres étant toujours les Trichomonadida et les Cristamonadida. Dans cette nouvelle classification, il n'est pas fait mention des différentes familles. Cependant, d'après l'énumération par les auteurs des genres présents dans chaque ordre, ils correspondent pour les Trichonymphida et Spirotrichonymphida aux familles de Brugerolle et Lee (2001) et pour les Trichomonadida et Cristamonadida à celles de Brugerolle et Patterson (2001). D'autre part, dans la classification de Adl et al. (2005), le terme phylum n'est pas utilisé. Les Excavata sont amenés au rang de « super-group » et les Parabasalia au rang de « first rank ».

Dans une étude de 2006, Hampl et al. se penchent sur la position phylogénétique de *Cochlosoma*, le seul représentant de la famille des Cochlosomatidae et montrent que ce genre appartient en fait à la famille des Trichomonadidae. De ce fait, dans la nouvelle classification de Adl et al. (2005), les Trichomonadida ne sont représentés que par deux familles, les Trichomonadidae et les Monocercomonadidae. Dans la même étude, les auteurs proposent aussi de classer les Trichomonadida en 4 familles : Monocercomonadidae, Trichomonadidae, Tritrichomonadidae (avec un seul genre, *Tritrichomonas*) et Trichomitidae (avec un seul genre, *Trichomitus*). Cependant, du fait de sa diversité, les Monocercomonadidae ne forment pas un groupe monophylétique. C'est aussi le cas dans la phylogénie présentée l'année suivante, par les mêmes auteurs (Hampl et al., 2007). Plus récemment, Carpenter et Keeling (2007) et Carpenter et al. (2009) se sont intéressés à l'émergence et à la diversité génétique aux seins des Trichonymphida des genres *Trichonympha* et *Eucomonympha*. Ils confirment la séparation des deux classes Trichonymphida et Spirotrichonymphida et l'intégration de certaines hypermastigines (lophomonadines) au sein des Cristamonadida.

Ces multiples modifications de la systématique témoignent de la difficulté à se fixer sur une classification précise de ces micro-organismes. En effet, les hypermastigines ne présentent finalement que peu de caractères communs, comme la présence de cinétosomes privilégiés et des fibres parabasales. Il est vrai que ces deux principaux caractères ont suffi à regrouper les trichomonadines et les hypermastigines dans le même groupe des Parabasalia, mais ils s'avèrent insuffisants pour établir une systématique au sein des hypermastigines. D'autres caractères communs ont été recherchés, mais la difficulté réside principalement dans l'hyper-développement de la plupart des autres structures cytosquelettiques, ce qui rend la comparaison et la classification des taxons indécises. D'ailleurs, certains genres d'hypermastigines restent « incertains » et n'appartiennent encore à aucune famille. Chez les Monocercomonadidae, la perte secondaire de certaines structures cytosquelettiques ne facilite pas non plus la tâche du

taxonomiste. De plus, dans une étude récente, Harper et al. (2009) ont montré que les deux genres de Calonymphidae, *Coronympha* et *Metacoronympha*, déterminés d'après les caractères morphologiques représentaient en fait le même genre *Coronympha*. En fait, d'après ces auteurs, les données morphologiques sous-estiment souvent la diversité au niveau de l'espèce (dans ce cas précis une seule espèce était identifiée, *Coronympha octonaria* alors que les données moléculaires en désignaient 4) et surestiment cette diversité au niveau du genre (seul le genre *Coronympha* est valide car *Metacoronympha* ne serait qu'un morphotype de *Coronympha*). Cette large diversité génétique au niveau de l'espèce sans modification morphologique marquante a aussi été caractérisée au sein des genres *Tetratrichomonas* (Trichomonadidae) (Cepicka et al., 2006) et *Monocercomonas*, *Hexamastix* et *Honigbergiella* (Monocercomonadidae) (Hampl et al., 2007).

IV-3- D'après l'analyse des séquences des gènes d'autres marqueurs

Comme indiqué ci-dessus, parmi les molécules d'ARN ribosomiques, la molécule d'ARNr 18S a toujours été utilisée comme marqueur pour les constructions de phylogénies des Parabasalia à l'exception de l'ARNr 28S dans l'étude de Viscogliosi et al. (1993). En fait, on peut aussi rajouter deux études réalisées d'après la comparaison des séquences de l'ARNr 5.8S. Ces travaux n'ont pourtant pas été inclus dans le chapitre précédent car les analyses réalisées englobaient aussi les séquences flanquantes ITS1 et ITS2. Ainsi la première étude de Felleisen (1997) englobait 7 Trichomonadidae et ne confirmait que la dichotomie Trichomonadinae – Tritrichomonadinae. Il en était de même de la seconde étude par Kleina et al. (2004). Ces derniers auteurs montraient aussi la polyphylie des Monocercomonadidae et le regroupement de *Trichomitus* et *Hypotrichomonas* tout en suggérant la perte secondaire de structures cytosquelettiques chez certaines Monocercomonadidae.

A des fins de comparaison, quelques phylogénies des Parabasalia ont aussi été construites sur la base de marqueurs protéiques. La première, incluant 4 espèces de Trichomonadidae et 2 espèces de Monocercomonadidae, utilisait la superoxyde dismutase à fer ou FeSOD comme indicateur (Viscogliosi et al., 1996). La seconde, incluant 4 espèces de Trichomonadidae et une espèce de Monocercomonadidae, était basée sur la comparaison des séquences de la GAPDH (Viscogliosi et Müller, 1998). Dans ces deux phylogénies, on retrouvait la dichotomie, Trichomonadinae - Tritrichomonadinae. De plus, pour la GAPDH, on notait l'émergence de *Trichomitus* à la base de cette dichotomie ce qui était en corrélation avec les résultats obtenus pour les ARNr 18S. Pour la FeSOD, on retrouvait *Trichomitus* groupe-frère de *Hypotrichomonas*, comme dans les phylogénies basées sur les ARNr 18S. Enfin, avec ces deux indicateurs, *Tritrichomonas* et *Monocercomonas* étaient étroitement associés, ce qui était aussi le

cas pour l'ARNr 28S. Par contre, cette association n'est pas toujours très nette avec l'ARNr 18S. Quelques années plus tard, une phylogénie basée sur la comparaison des séquences de fumarase de classe II et n'englobant que 5 espèces de Trichomonadidae et une espèce de Monocercomonadidae a été publiée par notre équipe (Gerbod et al., 2001). On notait dans cet arbre une émergence séparée des Trichomonadinae et des Tritrichomonadinae entraînant une polyphylie des Parabasalia. Pourtant, rien ne permettait de dire que la fumarase de classe II avait une origine différente pour ces deux groupes de Parabasalia et il fallait donc plus s'orienter vers des vitesses d'évolution différentes de la protéine pour expliquer l'émergence de ces deux groupes.

En 2004, notre équipe a construit des phylogénies des Parabasalia basées sur la comparaison des séquences de la GAPDH, de l'énolase, de l' α -tubuline et de la β -tubuline pour un même échantillonnage d'espèces en l'occurrence 4 Trichomonadidae, 2 Monocercomonadidae et 1 hypermastigine (*Trichonympha*) (Gerbod et al., 2004). En résumant, l'arbre basé sur les séquences de GAPDH était similaire à celui basé sur les séquences de l'ARNr 18S. En particulier, il montrait la polyphylie des Trichomonadidae et Monocercomonadidae et la position basale de *Trichonympha*. Pour différentes raisons, les arbres construits avec les 3 autres marqueurs montraient une faible résolution et étaient donc peu informatifs même si dans deux d'entre eux, *Trichonympha* avait l'émergence la plus précoce. Cette étude suggérait donc que la GAPDH pouvait être un bon marqueur pour des études phylogénétiques futures. Cette analyse fut donc complétée par Ohkuma et al. (2007). Aux 7 espèces décrites précédemment, ces auteurs ont obtenu les séquences des 4 indicateurs pour 5 espèces supplémentaires : les hypermastigines *Pseudotriconympha* (ordre des Trichonymphida), *Spirotriconympha* et *Holomastigotoides* (ordre des Spirotrichonymphida), la Devescovinidae *Devescovina* (ordre des Cristamonadida) et la Calonymphidae *Stephanonympha* (ordre des Cristamonadida). Là encore, l'arbre basé sur les séquences de GAPDH s'avérait montrer une excellente résolution et était très similaire à celui observé pour l'ARNr 18S ce qui n'était pas le cas des autres indicateurs. D'autre part, ces auteurs ont aussi reconstruit un arbre basé sur la concaténation de toutes les séquences issues de ces marqueurs protéiques et confirmaient l'émergence précoce des Trichonymphida au sein des Parabasalia.

V- CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE CHEZ LES METAZOAIRES

En 1972, Kerr et al. ont décrit 2 types majeurs de mort cellulaire : l'apoptose ou mort cellulaire génétiquement programmée, et la nécrose ou mort cellulaire non génétiquement programmée et accidentelle. Durant les 30 années suivantes, le terme « apoptose » a été utilisé, à tort, en temps que terme général ou synonyme pour parler de la mort cellulaire programmée (MCP). Du fait de la dominance du concept de nécrose *versus* apoptose, toutes les observations prouvant l'existence de MCP alternative non apoptotique étaient ignorées par la communauté scientifique (Schweichel and Merker, 1973). Cependant, ces dernières années, un intérêt croissant pour les MCP alternatives est apparu. Il en existe plusieurs formes mais je présenterai seulement les plus connues et celles présentant le plus d'intérêt par rapport à mes travaux. Il est intéressant de noter que, si l'une de ces voies de mort cellulaire est bloquée, elle peut être compensée par le déclenchement d'une seconde, permettant ainsi l'auto-destruction de la cellule.

La MCP est un phénomène conservé sur un plan évolutif et observée généralement chez les organismes multicellulaires. Néanmoins, elle a également été observée chez des organismes unicellulaires (voir Par. VII). Elle a un rôle crucial dans plusieurs fonctions vitales incluant le contrôle du développement (embryogenèse avec individualisation des doigts, chute des dents de lait...), le contrôle de l'homéostasie (régulation du nombre des cellules du système immunitaire après l'entrée d'un corps étranger...) et la défense contre les pathogènes et les agressions physico chimiques (élimination des cellules endommagées ou cellules infectées par un virus...).

V-1- Nécrose

La nécrose est définie comme une mort passive, désordonnée, rapide, accidentelle et non régulée. Par conséquent, elle est considérée comme le processus non programmé de destruction des cellules "lésées" ou comme une phase ultime de mort programmée (Lockshin et Zakeri, 2004). Elle peut être induite par différents facteurs tels qu'une infection virale, une hyperthermie, une hypoxie, un cancer, une inflammation, une ischémie ou un poison. Les cellules entrent en nécrose suite à une perte de leur équilibre ionique. Elles se remplissent alors d'eau entraînant un gonflement de la cellule et des organelles, notamment la mitochondrie. Cette étape se caractérise par la présence de vacuoles cytoplasmiques (Majno et al., 1995, Sperandio et al., 2000). Il s'en suit une rupture de la membrane des organelles (incluant les lysosomes remplis de protéases en tout genre), une fragmentation non spécifique de l'ADN, et enfin une rupture de la membrane plasmique et donc mort de la cellule par explosion (**Tableau 1**). La lyse

	Nécrose	Apoptose	Paraptose	Autophagie
Condensation chromatinienne	-	+	+/-	+
Fragmentation internucléosomale de l'ADN	-	+	-	-
Corps apoptotiques	-	+	-	-
Vacuolisation cytoplasmique	+	-	+	+
Gonflement mitochondriale	+	Quelques fois	Tard	-
Activité caspase	-	+	-	-

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de mort cellulaire (d'après Sperandio et al., 2000).

cellulaire conduit à la libération du contenu cytoplasmique dans le tissu environnant ce qui attire les mastocytes, provoquant ainsi une réaction inflammatoire locale pouvant entraîner des lésions tissulaires néfastes et irréversibles (Schwartzman et Cidlowski, 1993 ; Majno et al., 1995) (**Figure 25**).

V-2- Apoptose

On nomme apoptose (mot d'origine grecque, faisant référence à la chute programmée des feuilles en automne ; *apo* pour désigner l'éloignement et *ptose* pour chute) le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal (Kerr et al., 1992). C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, qui est activée en réponse à des stimuli provenant de l'environnement cellulaire (voie extrinsèque) ou bien de l'intérieur même de la cellule (voie intrinsèque) (voir Par. VI). Ces stimuli activent des protéases spécifiques, présentes dans la cellule, entraînant à terme des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose. Au début de l'apoptose, les cellules se détachent des cellules voisines et perdent le contact avec la matrice extracellulaire. Il est probable que ce détachement facilite l'élimination ultérieure des cellules apoptotiques par les phagocytes (pour revue voir Taylor et al., 2008). Une des modifications morphologiques dues à l'apoptose est la réduction du volume cellulaire par condensation du cytoplasme lié à la libération d'eau et d'ions dans le milieu environnant (Wyllie et al., 1980). Au cours de cette étape, des modifications membranaires se produisent comme l'exposition sur le feuillet externe de la membrane plasmique de la phosphatidylsérine, un phospholipide normalement constitutif de son feuillet interne (Fadok et al., 1992). Le noyau subit lui aussi une réduction de volume et la chromatine se condense rapidement puis se fragmente en petits lobes entourés par la membrane nucléaire (Wyllie et al., 1980). Ces modifications nucléaires s'accompagnent d'une fragmentation de l'ADN qui est spécifique de l'apoptose puisqu'elle est oligonucléosomale (Wyllie et al., 1980 ;

Enari et al., 1998) (**Tableau 1**). Après cette phase de condensation cytoplasmique et nucléaire, il se forme des protubérances membranaires bien caractéristiques du processus apoptotique à la surface de la cellule. Celle-ci se fragmente en plusieurs petits sacs étanches (enveloppés de membrane plasmique) renfermant une partie du cytoplasme et des organites cellulaires structurellement intacts. Ces petits sacs sont appelés corps apoptotiques (Dive et al., 1992 ; Hengartner, 2000) (**Figure 25**). Du fait de l'exposition de la phosphatidylsérine, les corps apoptotiques sont rapidement reconnus et phagocytés par les macrophages ou les autres cellules adjacentes (Fadok et al., 1992). La conservation de l'intégrité membranaire des corps apoptotiques et leur élimination rapide permet d'éviter la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. Ainsi, la mort de la cellule par apoptose ne déclenche pas de réaction inflammatoire à l'inverse de la nécrose (Cruchten et Van Den Broeck, 2002; Lockshin et Zakeri, 2004).

V-3- Paraptose

La paraptose est une forme de MCP non apoptotique (*paraptose* signifie *proche de* apoptose). Elle a été décrite lors du développement embryonnaire et dans des syndromes neurodégénératifs. Elle peut être déclenchée par le TNF (Tumor Necrosis Factor), membre de la famille des récepteurs TAJ/TROY (Wang et al., 2004) et par le récepteur « insulin-like growth factor I receptor » (Sperandio et al., 2000, 2004). Les mécanismes moléculaires de la paraptose ne sont pas encore bien définis. Cette MCP se caractérise par la présence de vacuoles cytoplasmiques, une absence de corps apoptotiques, une absence de fragmentation de l'ADN, une absence d'activation des caspases, le manque d'inhibition par les inhibiteurs de caspase et de Bcl-x_L et par l'expression de nouveaux gènes (Sperandio et al., 2000) (**Tableau 1**).

V-4- Autophagie et mort cellulaire autophagique

Le mot autophagie est dérivé du grecque et signifie manger (*phagie*) soit même (*auto*). L'autophagie est un processus physiologique, finement régulé, permettant de maintenir des fonctions homéostatiques cellulaires telles que la dégradation des protéines et le « turn-over » des organelles (Shintani et Klionsky, 2004 ; Rubinsztein et al., 2007). C'est un processus conservé au niveau évolutif puisqu'on peut le trouver chez tous les eucaryotes (Levine et Klionsky, 2004). C'est une voie de dégradation alternative à celle du protéasome. Elle est activée par les mêmes stimuli que ceux déclenchant l'apoptose en réponse à un stress extracellulaire (privation de nutriments, hypoxie, température élevée) ou à un stress intracellulaire (accumulation d'organelles défectueux ou en trop grande quantité et de composants cytoplasmiques).

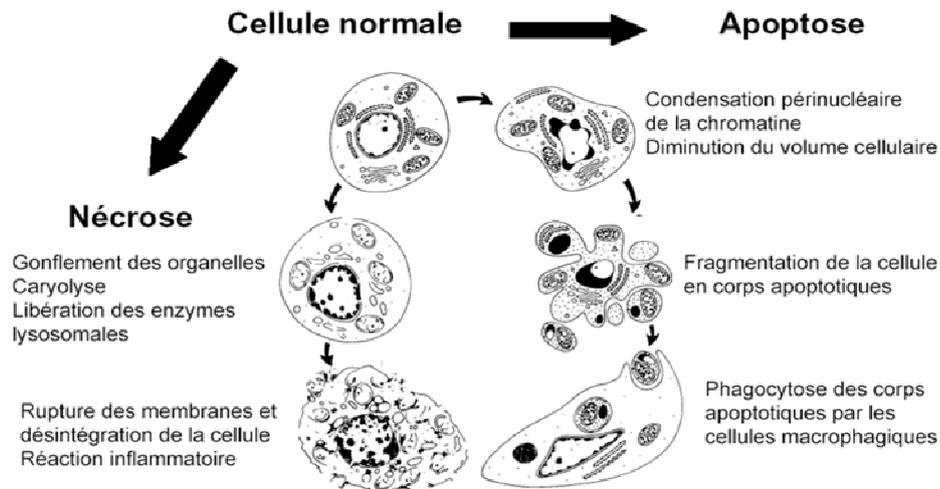


Figure 25 : Morphologie comparée des cellules apoptotiques et nécrotiques.

Chez les eucaryotes unicellulaires tels que la levure, dans des conditions de stress nutritifs, l'autophagie génère des substrats métaboliques, *via* le catabolisme des macromolécules, qui répondent aux besoins énergétiques de la cellule la protégeant ainsi d'une mort certaine (Reggiori et Klionsky, 2002 ; Lum et al., 2005). Chez les mammifères, l'autophagie est présumée être impliquée dans de nombreux processus physiologiques incluant une réponse à un stress nutritif, le contrôle de la croissance, les mécanismes anti-vieillessement et la réponse immunitaire innée. Les mécanismes moléculaires conduisant à l'autophagie ont été décrits pour la première fois chez la levure, *Saccharomyces cerevisiae* (Reggiori et Klionsky, 2002 ; Wang et Klionsky, 2003). La Ser/Thr kinase TOR et les protéines ATG (*AuTophagy*) sont les principaux acteurs moléculaires de l'autophagie responsables des divers changements morphologiques et biochimiques au sein de la cellule (Klionsky et al., 2003) (**Figure 26**). Pour la plupart des gènes impliqués dans l'autophagie chez la levure, des orthologues ont été identifiés chez les eucaryotes pluricellulaires. L'autophagie se caractérise par l'apparition de vésicules, formées d'une double membrane, dans le cytoplasme, appelées autophagosomes (ou vacuoles autophagiques). Ces vésicules « englobent » des portions du cytoplasme et/ou des organelles endommagés tels que les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Clarke, 1990 ; Xu et al., 2005 ; Rodriguez-Enriquez et al., 2006). Elles fusionnent ensuite avec les lysosomes, et délivrent leur contenu qui sera dégradé par les enzymes lysosomales (Levine and Klionsky, 2004 ; Shintani and Klionsky, 2004) (**Figure 26**). L'autophagie protège la cellule de la mort, mais dans certaines circonstances dépendantes du caractère du stimulus, de son amplitude et de sa durée, l'autophagie peut conduire à la mort de la cellule, soit en déclenchant l'apoptose ou la nécrose ou soit, *via* une autophagie massive aboutissant à une perte irréversible des fonctions cellulaires vitales (Yu et

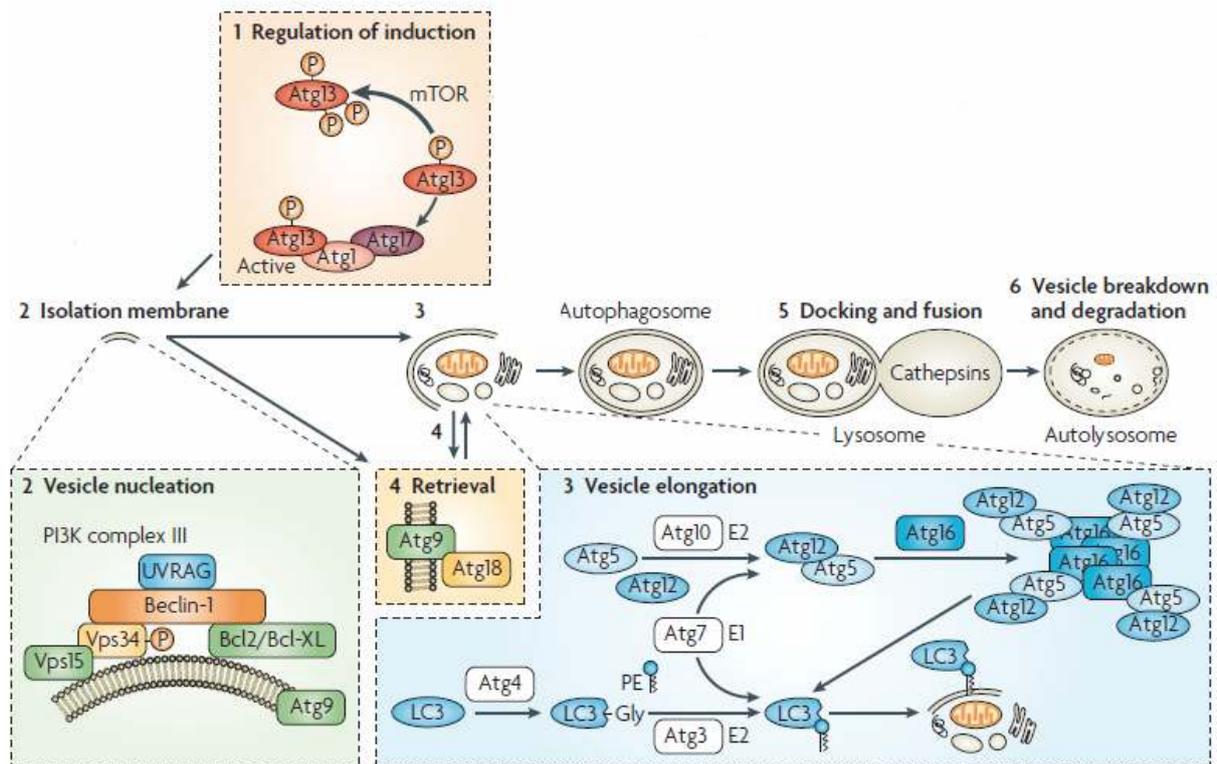


Figure 26 : Mécanisme moléculaire de l'autophagie (d'après Maiuri et al., 2007).

Autophagy starts with the stepwise engulfment of cytoplasmic material (cytosol and/or organelles) by the phagophore (also called isolation membrane), which sequesters material in double-membraned vesicles named autophagosomes (also called autophagic vacuoles). In many cellular settings, the first regulatory process (see figure, step 1) involves the de-repression of the mTOR Ser/Thr kinase, which inhibits autophagy by phosphorylating autophagy protein-13 (Atg13). This phosphorylation leads to the dissociation of Atg13 from a protein complex that contains Atg1 kinase and Atg17, and thus attenuates the Atg1 kinase activity. When mTOR is inhibited, re-association of dephosphorylated Atg13 with Atg1 stimulates its catalytic activity and induces autophagy. Notably, the mammalian orthologue of the yeast Atg13 has not been identified to date. Among the initial steps of vesicle nucleation is the activation of mammalian Vps34, a class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), to generate phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P) (step 2). Vps34 activation depends on the formation of a multiprotein complex in which beclin-1 (Becn1; the mammalian orthologue of Atg6), UVRAG (UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene) and a myristylated kinase (Vps15, or p150 in humans) participate.

Two ubiquitin-like conjugation systems are part of the vesicle elongation process (step 3). One pathway involves the covalent conjugation of Atg12 to Atg5, with the help of the E1-like enzyme Atg7 and the E2-like enzyme Atg10. The second pathway involves the conjugation of phosphatidylethanolamine (PE) to LC3/Atg8 (LC3 is one of the mammalian homologues of Atg8) by the sequential action of the protease Atg4, the E1-like enzyme Atg7 and the E2-like enzyme Atg3. Lipid conjugation leads to the conversion of the soluble form of LC3 (named LC3-I) to the autophagic-vesicle-associated form (LC3-II). LC3-II is used as a marker of autophagy because its lipidation and specific recruitment to autophagosomes provides a shift from diffuse to punctate staining of the protein and increases its electrophoretic mobility on gels compared with LC3-I. Moreover, green fluorescent protein-LC3 fusion proteins can be used to visualize autophagosomes by fluorescence videomicroscopy⁹¹. The mechanism of retrieval in which the Atg9 complex participates is poorly studied (step 4).

Autophagosomes undergo maturation by fusion with lysosomes to create autolysosomes (steps 5 and 6). In the autolysosomes, the inner membrane as well as the luminal content of the autophagic vacuoles is degraded by lysosomal enzymes that act optimally within this acidic compartment⁴⁹². Pharmacological inhibitors and small interfering RNAs that are capable of inhibiting distinct steps of this process are shown (red blocking arrows). Bcl2 and Bcl-XL are regulators of beclin-1. Lamp2, lysosome-associated membrane glycoprotein-2.

al., 2006 ; Maiuri et al., 2007). Cette deuxième voie de mort est aussi une forme de MCP que l'on appelle la mort cellulaire autophagique (Clarke, 1990). Elle est considérée comme une voie de MCP majeure ou complémentaire à celle de l'apoptose. En plus des caractéristiques morphologiques de l'autophagie, cette mort cellulaire se caractérise par des changements nucléaires tels qu'une condensation de la chromatine. Cependant il n'y a pas de fragmentation de l'ADN ni même de formation de corps apoptotiques. Comme pour l'apoptose, la mort par autophagie est complétée par la phagocytose (Lockshin et al., 2004) (**Tableau 1**).

Récemment, Maiuri et al. (2007) ont mis en évidence l'existence d'une relation entre apoptose et autophagie. En effet, ces deux processus peuvent être déclenchés en réponse aux mêmes stimuli et ne sont pas mutuellement exclusifs. Dans quelques cas, les deux processus peuvent avoir lieu en même temps dans la même cellule : la mort cellulaire par apoptose peut commencer par l'autophagie (Lockshin et al., 2004 ; Gozuacik et al., 2007). Par exemple, dans le cas d'une privation de nourriture, la voie par défaut est celle de l'autophagie. Si la cellule réussit à rétablir l'homéostasie, elle survivra mais si elle échoue, elle peut mourir par apoptose. Si l'une des deux voies est inhibée, l'autre prend le relais de telle sorte que la mort de la cellule puisse quand même avoir lieu. La question de savoir comment certains stimuli sont capables d'induire préférentiellement l'autophagie ou l'apoptose reste en suspens même si le contexte cellulaire tel que la spécificité du tissu a sans doute un rôle dans le choix de la direction à prendre (Raveh et al., 2001 ; Inbal et al., 2002 ; Jang et al., 2002). De plus, les limites entre ces deux voies ne sont pas très claires. La protéine ATG5 représente l'exemple le plus révélateur car elle a un double rôle dans l'apoptose et l'autophagie. Cette double fonction est régulée par sa protéolyse. En effet, dans certaines conditions elle est impliquée dans l'apoptose (sous sa forme clivée) et dans d'autres elle est impliquée dans l'autophagie (sous sa forme complète) (Yousefi et al., 2006). De même, la protéine Beclin-1/ATG6, protéine principale intervenant dans l'autophagie peut être inhibée par Bcl-2, une protéine anti-apoptotique (Sinha and Levine, 2008).

VI- PRINCIPAUX ACTEURS DE L' APOPTOSE CHEZ LES EUCARYOTES PLURICELLULAIRES

Seul le mécanisme d'apoptose chez les eucaryotes possédant des mitochondries sera détaillé, de manière non exhaustive, afin d'avoir une vue générale des processus mis en jeu. La machinerie de mort cellulaire existe de façon constitutive chez la plupart des cellules et l'engagement ou non dans la voie de suicide dépend de l'équilibre entre les facteurs activateurs et les facteurs inhibiteurs de cette machinerie.

L'apoptose peut être activée par deux voies caspase-dépendantes différentes mais interconnectées (**Figure 27**):

i) la voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs de mort cellulaire. Cette voie est entre autre impliquée lors de la mort de cellules lors de l'embryogenèse, de cellules infectées par un pathogène et de cellules du système immunitaire (lymphocytes T cytotoxiques) après leur action.

ii) la voie dite intrinsèque également appelée voie mitochondriale car elle met particulièrement en jeu la mitochondrie. Elle est impliquée dans la mort de cellules endommagées ayant subi un « stress » cellulaire produit par des radiations ionisantes, une hypoxie, une hyperthermie, des substances toxiques, des radicaux libres ou des lésions du génome.

Ces deux voies conduisent à l'activation de cystéine protéases appelées caspases. Ces protéases exécutent la mort cellulaire à travers le clivage de divers substrats protéiques induisant des effets cellulaires qui permettent de distinguer l'apoptose des autres morts cellulaires.

VI-1- Les caspases

Le phénomène d'apoptose implique de nombreuses protéines, et notamment une famille de cystéine protéases acide aspartique spécifique appelées caspases (de l'anglais : *cysteine-dependent aspartate specific protease*) (Cohen, 1997 ; Thornberry et al., 1998 ; Nicholson, 1999). La première caspase ou caspase 1 fut identifiée chez l'homme il y a près de 20 ans par Thornberry et ses collaborateurs (1992) et s'appelait alors ICE (Interleukin-1 B Converting enzyme). Puis Yuan et al. (1993) ont émis l'hypothèse que la protéine ICE était impliquée dans la mort cellulaire des mammifères par comparaison avec son homologue ced-3 (*Caenorhabditis elegans* death-3) chez le nématode *C. elegans*. A ce jour, 14 caspases (appelées caspase 1 à caspase 14) ont été identifiées chez les mammifères dont 11 dans le génome humain et sont impliquées soit dans l'inflammation (caspases 1, 4, 5, 11 à 14) soit dans l'apoptose (caspases 2, 3, 6 à 10) (Thornberry et Lazebnik, 1998 ; Lavrick et al., 2005). Récemment, il est devenu évident que quelques caspases, en plus de leurs fonctions apoptotique et/ou pro-inflammatoire, participent également à la prolifération cellulaire, à la différenciation et à la survie. Ce mémoire portera seulement sur les caspases ayant un rôle dans l'apoptose. D'après la classification de Rawlings et Barrett (1993) et Barrett et Rawlings (2001), les caspases constituent la famille C14 du clan peptidase CD qui regroupe les protéines ayant un site catalytique constitué de deux acides aminés principaux, l'histidine 237 et la cystéine 285 (par convention, numéros des acides aminés de la caspase 1) et ayant la particularité de couper la chaîne peptidique de leurs substrats après un acide aspartique (Asp) (Wilson et al., 1994).

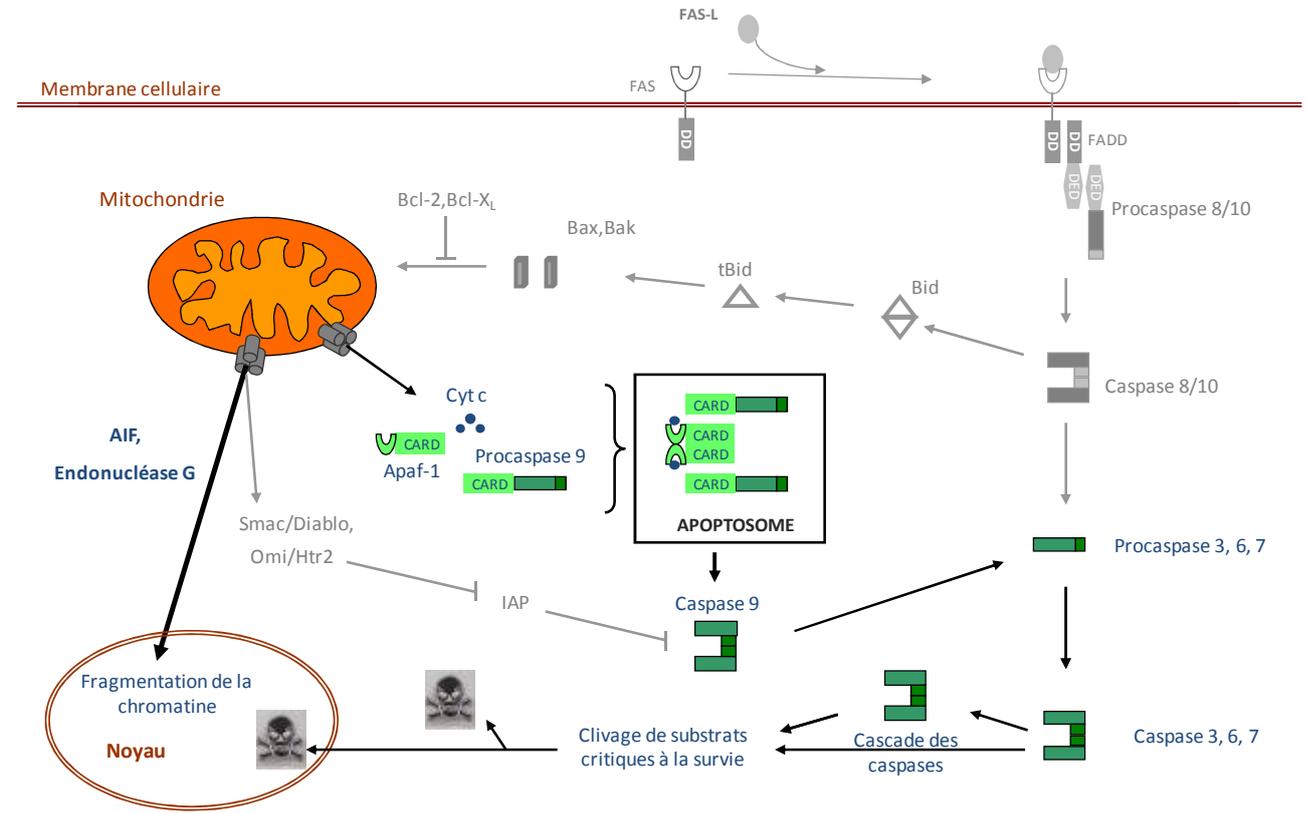


Figure 27 : Description schématique des voies majeures d'apoptose. La voie des récepteurs de mort ou extrinsèque est représentée avec des flèches grises et la voie mitochondriale ou intrinsèque avec des flèches noires. La voie caspases-indépendante médiée par l'AIF et l'endonucléase G est représentée par une flèche noire épaisse. Les deux voies caspases-dépendantes sont interconnectées *via* la protéine pro-apoptotique BH3 only, Bid.

VI-1-1- Structure

VI-1-1-1- Caractéristiques générales

Afin d'assurer un déclenchement rapide de l'apoptose, les caspases sont synthétisées dans toutes les cellules, à des niveaux différents selon les tissus (Krajewska et al., 1997, Earnshaw et al., 1999), sous la forme de précurseurs inactifs (pro-enzyme ou zymogènes), les pro-caspases. Ces dernières sont constituées de 3 domaines (Wilson et al., 1994, Thornberry et Lazebnik, 1998; Earnshaw et al., 1999; Fuentes-prior et Salvesen, 2004) (**Figure 28**):

- i) un prodomaine amino-terminal de taille variable
- ii) un domaine comprenant la dyade histidine-cystéine du site catalytique qui deviendra après clivage la grande sous unité p20 de 17-21 kDa
- iii) un domaine qui deviendra après clivage la petite sous unité p10 de 10-13 kDa

Généralement, les sous unités p10 et p20 sont séparées par une petite séquence inter-domaine ou linker. Selon la structure du pro-domaine et leur fonction, les pro-caspases sont généralement divisées en deux groupes. Les pro-caspases avec un long prodomaine sont les caspases initiatrices de la mort cellulaire alors que les pro-caspases avec un court prodomaine de 20 à 30 acides aminés forment les caspases effectrices ou exécutrices.

VI-1-1-2- Caractéristiques des prodomaines

Le large prodomaine des pro-caspases initiatrices contient des motifs structuraux qui appartiennent à la superfamille des domaines de mort (Weber et al., 2001). Les domaines de mort sont de longs motifs de 80 à 100 acides aminés impliqués dans la transduction du signal apoptotique. Cette superfamille regroupe le domaine de mort ou DD (Death Domain), le domaine effecteur de mort ou DED (Death Effector Domain), et le domaine de recrutement des caspases ou CARD (Caspase Recruitment Domain). Chacun de ces motifs interagit avec d'autres protéines par des interactions homotypiques. Les pro-caspases 8 et 10 possèdent deux DED en tandem dans leur prodomaine (Muzio et al., 1996) alors que la pro-caspase 9 présente un motif CARD. Les motifs DED et CARD sont responsables du recrutement des caspases initiatrices au sein de complexes multiprotéiques.

VI-1-1-3- Structures des caspases hétérotétramériques actives

Pour initier l'apoptose et aboutir à la mort de la cellule, les pro-caspases requièrent un changement biochimique pour être activées. Les pro-caspases sont activées durant l'apoptose par deux clivages protéolytiques successifs. Tous les sites de maturation sont de type Asp-X (avec *Asp* pour acide aspartique et *X* pour n'importe quel acide aminé).

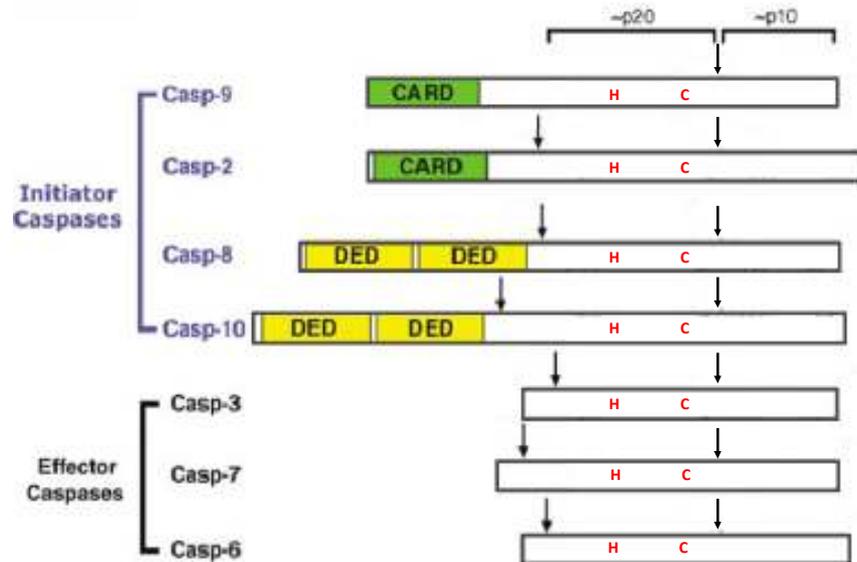


Figure 28 : Caspases initiateuses et exécutoires. Les deux sites de clivages sont représentés par des flèches. Les pro-domaines des caspases initiateuses contiennent des motifs d'interaction homotypique CARD et DED. La dyade histidine-cystéine du site catalytique est représentée par H et C.

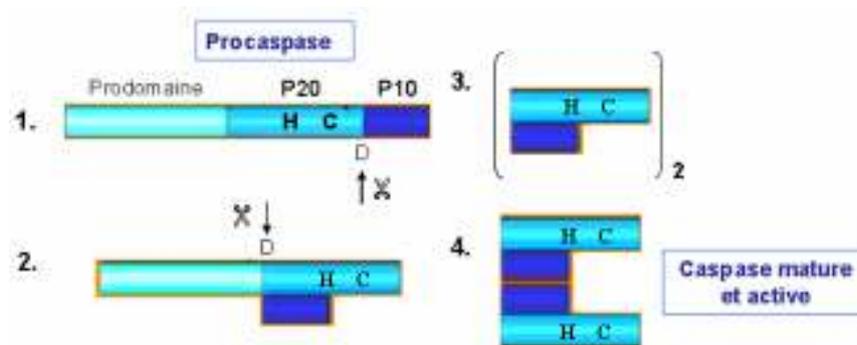


Figure 29 : Activation des caspases. 1. Premier clivage entre les deux sous-unités ; 2. Second clivage entre le pro-domaine et la grande sous-unité ; 3. Formation des hétérodimères ; 4. Formation de l'hétérotétramère ou caspase active. Abréviations : D : acide aspartique ; H : histidine ; C : cystéine.

La première coupure a lieu entre la grande sous-unité p20 et la petite p10, puis la seconde coupure libère le prodomaine de la grande sous-unité (**Figure 29**). La caspase va pouvoir s'assembler sous sa forme active. Les structures cristallographiques de la caspase mature 3 (Riedle et al., 2001), de la caspase 7 (Wei et al., 2000), de la caspase 8 (Blanchard et al., 1999) et de la caspase 9 (Renatus et al., 2001) présentent une architecture similaire. En effet, l'enzyme mature est un tétramère composé de 2 hétérodimères eux-mêmes issus de l'association de 2 sous-unités (p20/p10) et possède donc deux sites catalytiques actifs (Walker et al., 1994). Si la structure des caspases actives est maintenant bien connue, il n'en est pas de même pour les mécanismes biochimiques permettant cette activation.

VI-1-2- Activation des caspases

VI-1-2-1- Activation d'une caspase initiatrice à motifs DED

Les caspase 8 et 10 sont les caspases associées à la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort cellulaire. Certains récepteurs sont capables de transmettre un signal apoptotique lorsqu'ils sont liés à leur ligand. Ce sont les récepteurs de la superfamille du Tumor Necrosis Factor Receptor ou TNFR (Ashkenazi et Dixit, 1998; Locksley et al., 2001). Ils sont également appelés récepteurs de mort car ils possèdent un motif DD intracellulaire. La fixation du ligand (Fas Ligand, TNF) à un récepteur (Fas / APO-1 / CD95, TNFR-1) présent à la surface des cellules induit la formation du complexe multi-protéique DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Ce volumineux complexe est constitué d'un tétramère ligand / récepteur / protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain) / pro-caspase 8 (Scott et al., 2009). Les interactions entre les différentes molécules au niveau du DISC sont basées sur des contacts homotypiques. En effet, le DD du récepteur interagit avec le DD de FADD, tandis que le DED de FADD interagit avec le tandem DEDs en amino-terminal des pro-caspases 8. De ce fait, la formation du complexe DISC induit un rassemblement des pro-caspase 8 qui sont très proches les unes des autres.

L'activation des pro-caspases 8 suivrait un modèle dit « d'induction de proximité » dans lequel une haute concentration locale et une orientation favorable des molécules de pro-caspase 8 au niveau du complexe DISC conduirait à leur dimérisation suivie de leur auto-protéolyse (Muzio et al., 1998 ; Boatright et al., 2003 ; Chang et al., 2003 ; Donepudi et al., 2003 ; Pop et al., 2006 ; Kang et al., 2008 ; Hughes et al., 2009 ; Oberst et al., 2010). En effet, les pro-enzymes présentent une faible activité enzymatique leur permettant de s'auto-cliver quand elles sont à proximité les unes des autres (Salvesen et Dixit, 1999). Comme je l'ai expliqué précédemment, l'activation des pro-caspases 8 nécessite deux clivages successifs et la formation d'un

hétérotétramère de caspase 8 actif. Consécutivement les caspases 8 matures vont être libérées dans le cytosol pour déclencher le processus apoptotique.

VI-1-2-3- Activation d'une caspase initiatrice à motif CARD

La caspase 9 est la caspase initiatrice associée à la voie intrinsèque ou mitochondriale. Son activation est induite par l'apoptosome qui est un complexe multimérique impliquant Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1), le cytochrome c et le cofacteur dATP ou ATP. L'étape cruciale de construction de l'apoptosome est la libération du cytochrome c par la mitochondrie et sa liaison à Apaf-1, qui est sous forme inactive dans le cytoplasme. La protéine Apaf-1, qui est le composant central de l'apoptosome, a trois domaines distincts: un domaine CARD à son extrémité amino-terminale, un domaine de régulation constitué de 13 répétitions WD40 à son extrémité carboxy-terminale et un domaine de liaison aux nucléotides (domaine ATPase) et d'oligomérisation (ou NOD pour Nucleotide binding and Oligomerization Domain) au centre (**Figure 30**). La liaison du cytochrome c au domaine de répétitions WD40, induit un large changement conformationnel de Apaf-1 conduisant à son activation. Néanmoins, son activation complète nécessite l'hydrolyse d'un triphosphate (dATP ou ATP) *via* le domaine ATPase du NOD (Saleh et al., 1999 ; Acehan et al., 2002 ; Kim et al., 2005).

Suite à leur activation, les molécules d'Apaf-1 vont s'oligomériser, *via* leur domaine NOD, dans un large complexe heptamérique en forme de roue appelé apoptosome (Li et al., 1997; Saleh et al., 1999; Cain et al., 2000; Kim et al., 2005; Yu et al., 2005; Danot et al., 2009). Chaque molécule est positionnée de sorte que leur domaine CARD soit au centre de cette roue. Ce domaine permet une liaison homotypique avec celui de la pro-caspase 9 et donc le recrutement et l'activation de cette dernière au sein du complexe.

Deux mécanismes possibles d'activation de la pro-caspase 9 au sein de l'apoptosome ont été proposés (**Figure 31**) qui ne sont pas nécessairement mutuellement exclusifs :

i) Modèle dit « d'induction de proximité » (Renatus et al., 2001, Acehan et al., 2002 ; Boatright et al., 2003 ; Shiozaki et al., 2003 ; Pop et al., 2006 ; Malladi et al., 2009) dans lequel l'apoptosome peut recruter, *via* Apaf-1, plusieurs pro-caspases 9 monomériques induisant donc une forte concentration locale de ces pro-enzymes. Ceci favoriserait leur activation par dimérisation et un auto-clivage au niveau de l'intrachaîne entre les deux sous unités. Cette coupure permettrait la constitution et la stabilisation de l'hétérotétramère et donc l'activation de la caspase 9.

ii) Modèle dit « d'induction de conformation » ou modèle allostérique (Rodriguez et Lazebnik, 1999 ; Shiozaki et al., 2002 ; Chao et al., 2005 ; Yin et al., 2006) dans lequel le terme d'holoenzyme a été introduit pour qualifier le complexe apoptosomal. Dans cette holoenzyme, la

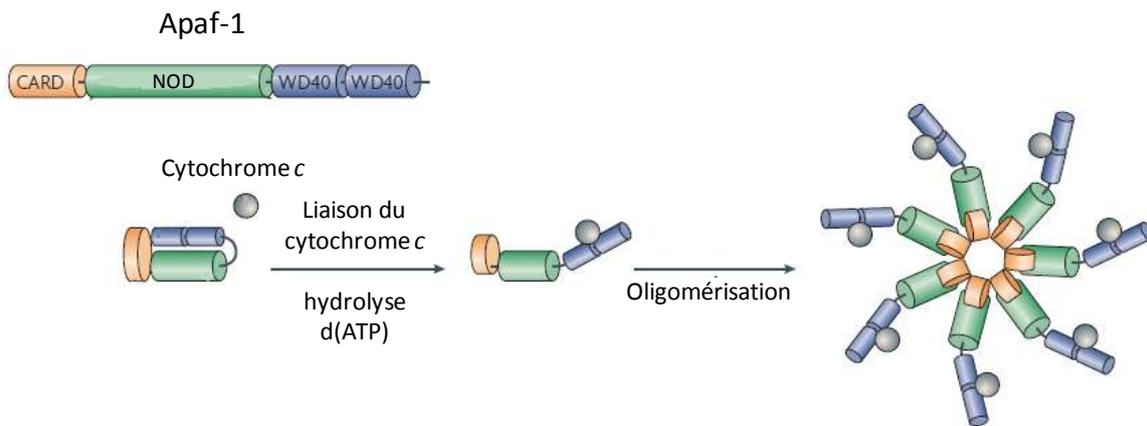


Figure 30 : Formation de l'apoptosome (d'après Riedl et Salvesen, 2007). La liaison du cytochrome c au domaine de répétitions WD40 accompagnée de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet l'activation d'Apaf-1 suivi de son oligomérisation *via* les domaines CARD.

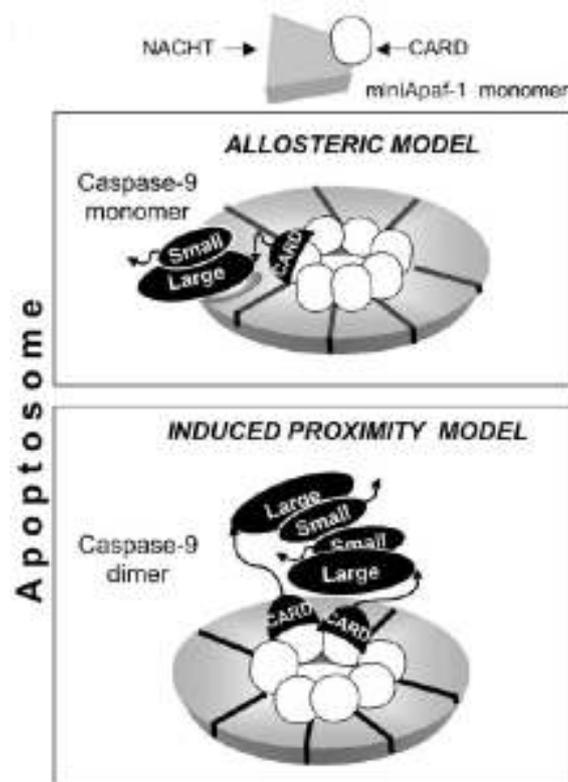


Figure 31 : Les deux modèles d'activation de la caspase 9 : modèle allostérique et modèle d'induction de proximité (d'après Pop et al., 2006).

caspase 9 monomérique serait la sous unité catalytique et Apaf-1 son régulateur allostérique. L'apoptosome pourrait directement activer le monomère de pro-caspase 9 à travers une modification de son site actif. Il se lierait au monomère par la même interface qui est requise pour l'homodimérisation de la pro-caspase induisant un auto-clivage et stabilisant ainsi la conformation du site actif et permettant l'activation de la caspase 9.

D'autre part, il a été montré que le clivage entre les deux sous unités n'est pas nécessaire à l'activation de la pro-caspase 9 (Stennicke et al., 1999 ; Bratton et al., 2001 ; Srinivasula et al., 2001). Ceci peut s'expliquer par le fait que la chaîne entre les deux sous unités de la pro-caspase 9 est relativement longue et de ce fait, en absence de clivage, il n'y aurait pas de contrainte stérique pour la formation du site actif et donc pour l'activation de l'enzyme (Riedl et Salvesen, 2007).

VI-1-2-4- Activation des caspases effectrices

Les caspases effectrices ou exécutrices sont impliquées dans la transduction du signal de mort et sont responsables de l'auto-destruction de la cellule durant la phase effectrice. Leur activation se fait en cascade. L'activation de la cascade de caspases effectrices diffère suivant les voies conduisant à la mort de la cellule. Dans l'apoptose liée aux récepteurs de mort (voie extrinsèque), deux voies de transduction du signal ont été décrites suivant les types cellulaires (Scaffidi et al., 1998). Les cellules dites de type I (comme les thymocytes) sont caractérisées par une concentration en DISC élevée donc une quantité de caspase 8 active élevée. Les caspases 8 peuvent alors directement activer les caspases effectrices 3, 6 et 7 par clivage. Dans les cellules dit de type II (comme les hépatocytes), il y a une faible concentration de DISC donc une faible quantité de caspase 8 actives. Dans ce cas, la voie de signalisation requiert une boucle d'amplification additionnelle impliquant le clivage de la protéine Bid, un membre de la famille Bcl-2 par la caspase 8, pour générer la protéine tBid et donc la libération du cytochrome c par la mitochondrie (Korsmeyer et al., 2000) (**Figure 27**). Cette voie active la voie mitochondriale ou intrinsèque mais peut être bloquée par les protéines membres de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2 et Bcl-x_L (voir Par. VI-2). Dans la voie intrinsèque de mort cellulaire, la libération du cytochrome c par la mitochondrie conduit à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la pro-caspase 9. Consécutivement la caspase 9 active, clive les pro-caspases effectrices 3 et 7, déclenchant la cascade de mort (Jiang et Wang, 2000).

Contrairement aux pro-caspases initiatrices, les pro-caspases effectrices existent constitutivement sous forme d'homo-dimère avant et après le clivage au niveau de l'interchaîne entre les deux sous unités et ne possèdent pas de domaines d'interaction protéine-protéine leur permettant d'être recrutées et de s'oligomériser (**Figure 28**). Bien que le mode d'activation des

caspases initiatrices reste encore à éclaircir, celui des caspases effectrices est très clair. Sans rentrer dans les détails, la structure cristallographique de la caspase 7, une caspase représentative des caspases effectrices, a révélé l'existence d'un changement conformationnel au niveau du site actif après clivage entre les deux sous unités (Chai et al., 2001 ; Riedl et al., 2001 ; Shi, 2002; Riedl et al., 2004).

VI-1-3- Les substrats des caspases

Une fois activées, les caspases sont capables de se cliver entre elles, ce qui permet une amplification du signal de mort. La caspase 3 peut cliver les caspases 2, 6, 8 et 9, la caspase 9 active les caspases 3 et 7 et la caspase 8 active les caspases 3, 6, et 7. Cependant, les caspases impliquées dans l'apoptose ont d'autres substrats. A ce jour près de 400 protéines impliquées dans différentes fonctions cellulaires et potentiels substrats des caspases ont été identifiées (Luthi et Martin, 2007) et répertoriées sur le site The Casbah (www.casbah.ie).

VI-1-3-1- Spécificité de substrat

Les caspases sont des cystéines protéases spécifiques possédant un site catalytique divisé en sous-sites désignés par la lettre S suivi d'un numéro, retenant chacun par de multiples interactions, un résidu de la chaîne peptidique du substrat, désigné par la lettre P suivi d'un numéro (Fuentes-prior et Salvesen, 2004; Lavrick et al., 2005) (**Figure 32**). Toutes les caspases coupent leur substrat en carboxy-terminal après l'acide aminé en position P1. Le site de clivage reconnu spécifiquement par les caspases serait X-Glu-X-Asp avec l'acide aspartique en position P1, l'acide glutamique en position P3 et X un acide aminé quelconque en positions P2 et P4. Une liste des spécificités de substrat de caspases est présentée à droite de la **Figure 32**.

VI-1-3-2- Exemples de substrats de caspase effectrices

Plusieurs types de protéines sont connus comme étant des substrats de ces caspases :

i) Protéines du cytosquelette: actine, gelsoline, fodrine, keratine (Kothakota et al., 1997). Par exemple, le clivage par la caspase 3 de la gelsoline provoque la formation des corps apoptotiques.

ii) Protéines nucléaires : PARP (Poly ADP-Ribose polymérase) est une enzyme nucléaire, impliquée dans la réparation de l'ADN. Elle est clivée par les caspases 3 et 7 activées durant l'apoptose (Earnshaw, 1999). L'endonucléase CAD (Caspase-Activated DNase) existe dans la cellule sous la forme d'un complexe inactif avec son inhibiteur ICAD (Inhibitor Caspase-Activated DNase). Le clivage de ICAD par la caspase 3 se traduit par la libération de la sous-

unité catalytique active de CAD responsable du clivage de l'ADN dit en "barreaux d'échelle" lorsque les fragments sont séparés par électrophorèse (Enari et al., 1998).

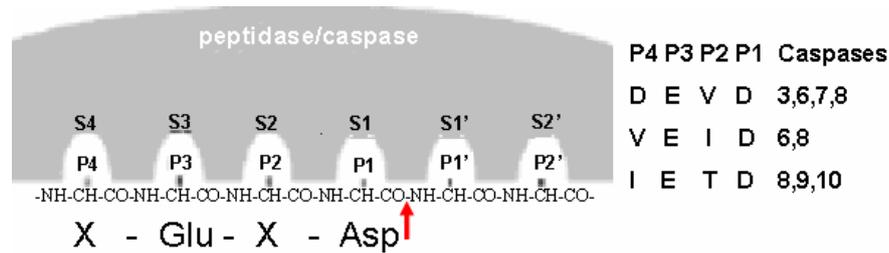


Figure 32 : Substrats peptidiques des différentes caspases et sites de liaison aux caspases (d'après Vachova et Palkova, 2007). Les sites au niveau de l'enzyme sont nommés par la lettre S et les sites au niveau du substrat par la lettre P. Le site de clivage est représenté par une flèche rouge. Abréviations : D : acide aspartique ; E : acide glutamique ; V : valine ; I : isoleucine ; T : thréonine ; X : acide aminé quelconque.

En effet, la CAD permet la libération de fragments oligonucléosomiaux de 180-200 pb typiques de l'apoptose (Wyllie et al., 1980; Wyllie et al., 1984 ; Widlak et Garrard, 2005). Cette fragmentation de l'ADN des cellules apoptotiques correspond à une étape finale de la mort cellulaire et est consécutive des modifications morphologiques nucléaires (bourgeonnement et condensation chromatiniene). La désorganisation du noyau ainsi que les phénomènes de bourgeonnement des corps nucléaires sont dus à la destruction du réseau formé par les lamines nucléaires, protéines également substrats des caspases.

iii) De nombreuses protéines kinases, des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, l'expression des gènes et des protéines ayant un rôle direct dans l'apoptose comme les facteurs de survie Bcl-2 et Bcl-X_L et les protéines pro-apoptotiques Bid et Bax (Earnshaw et al., 1999).

VI-1-4- Inhibiteur des caspases

Il existe des inhibiteurs synthétiques spécifiques de certaines caspases permettant d'étudier les mécanismes moléculaires des voies de mort cellulaire tels que Z-VAD-fmk ou encore Ac-DEVD-CHO (Schotte et al., 1999). Cependant, il existe également des inhibiteurs naturels présents dans les cellules afin d'empêcher une activation inopinée des caspases. Voici les plus connus :

i) La famille des IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins). Chez l'homme au moins 5 protéines de cette famille ont été identifiées : cIAP-1 (Rothe et al., 1995), cIAP-2, XIAP (Uren et al., 1996 ; Liston et al., 1997), NAIP (Liston et al., 1996), et la survivine. La famille des IAPs a

pour fonction de bloquer les processus de mort, même à des stades relativement avancés. Ils peuvent bloquer l'activation des pro-caspases, et inhiber l'activité des caspases matures *via* un domaine leur permettant de se lier directement aux caspases. Lors du déclenchement de l'apoptose, ces protéines peuvent aussi être inhibées par des protéines libérées par la mitochondrie dans le cytosol, en même temps que le cytochrome c. Ce sont les protéines Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low pI) (Srinivasula et al., 2000 ; Verhagen et al., 2000) et HtrA2/Omi (High temperature requirement) (Suzuki et al., 2001, Hegde et al., 2002; Srinivasula et al., 2003). Elles se lient aux IAPs empêchant ainsi leur action protectrice, et permettent aux pro-caspases de s'activer (Liston et al., 1996; Silke et al., 2001).

ii) Les inhibiteurs viraux : CrmA (cytokine response modifier A), une protéine synthétisée par le virus de la vaccine, fut le premier inhibiteur de caspase découvert. Elle inhibe fortement l'activité protéolytique des caspases 8 et 10 et dans une moindre mesure celle des caspases 3, 6 et 7 (Zhou et al., 1997). FLIP, identifiée chez le virus de l'herpes possède deux domaines DED qui lui permettent d'entrer en compétition avec la pro-caspase 8 pour la fixation sur le domaine DED de la protéine adaptatrice FADD (Irmeler et al., 1997).

VI-2- Facteurs de régulation de l'apoptose : la famille des protéines Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs clés de l'apoptose puisque leur principale fonction est de contrôler la perméabilité membranaire de la mitochondrie et particulièrement, la libération de protéines apoptotiques par cet organelle. Ils sont donc des acteurs principaux de la voie intrinsèque de l'apoptose. La protéine Bcl-2 a été la première identifiée en lien avec le lymphome folliculaire humain d'où son nom B-cell lymphoma-2 (Tsujimoto et al., 1985). En effet, le gène codant Bcl-2 a un effet oncogénique mais à l'inverse des oncogènes connus, il ne favorise pas la prolifération cellulaire, mais bloque la mort cellulaire (Vaux et al., 1988). Chez les mammifères il existe une grande famille de protéines Bcl-2 avec environ 25 membres (Adams et Cory, 1998 ; Reed, 2000), qui peuvent être divisées en deux classes : ceux qui inhibent l'apoptose et ceux qui la favorisent.

VI-2-1- Structure

Ces protéines se caractérisent par la présence d'au moins un domaine homologue à Bcl-2 (BH domain). Il existe 4 domaines BH conservés notés BH-1 à BH-4 (pour revue voir Petros et al., 2004). La famille de protéines Bcl-2 peut être divisée en 2 groupes, basés sur leurs caractéristiques structurales et leur rôle dans l'apoptose (**Figure 33**):

i) Les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, MCL-1 qui se caractérisent par la présence de 4 domaines BH (BH-1 à BH-4).

ii) Les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bok qui contiennent trois domaines BH (BH-1 à BH-3). Certaines de ces protéines ne contiennent que le domaine BH-3 comme Bid, Bim, Bik, Bad, Noxa, Puma, et Hrk.

La plupart de ces protéines possède un domaine transmembranaire potentiel en C-terminal, et sont donc typiquement associées aux membranes des organelles telles que celles de la mitochondrie (membrane externe mitochondriale ou MEM), le réticulum endoplasmique (RE) et le noyau (Krajewski et al., 1993 ; Akao et al., 1994 ;). Par exemple, Bcl-2 réside principalement sur la face cytoplasmique du RE, et en moindre quantité sur la MEM et l'enveloppe nucléaire (Monaghan et al., 1992; Krajewski et al., 1993) alors que Bcl-xL est plus prédominante sur la MEM (Kaufmann et al., 2003, Wilson-Annan et al., 2003). Au contraire, Bak va s'incruster au niveau de la MEM qu'après activation. Ces protéines peuvent former des homo-dimères et/ou hétérodimères, essentiellement à travers l'interaction entre leurs domaines BH-3 (Oltvai et al., 1993 ; Chittenden et al., 1995).

VI-2-2- Mode d'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

Ces protéines vont principalement agir au niveau de l'intégrité de la membrane mitochondriale et vont donc influencer sur la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c ou encore l'AIF (Apoptosis Inducing Factor). La mitochondrie est donc au centre de la décision vie/mort de la cellule. Ces protéines peuvent aussi interagir avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et inhiber leur fonction.

VI-2-2-1- Bax et Bak

La première protéine pro-apoptotique, Bax, fut identifiée par son interaction avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Oltvai et al., 1993). Bcl-2 s'associerait avec Bax pour exercer son activité répressive sur la mort mais le contraire est également vrai puisque Bax peut s'associer avec Bcl-2 pour exercer son activité pro-apoptotique. Ainsi la décision de vivre ou mourir, résiderait dans l'équilibre entre « protéines de vie / protéines de mort » (Yang et Korsmeyer, 1996) (**Figure 34**). Oltvai et al. (1993) ont aussi proposé un modèle de « rhéostat » selon lequel le ratio Bcl-2 / Bax fixerait le seuil de sensibilité ou de résistance à l'apoptose.

Plusieurs scénarios ont été proposés quant à l'implication de Bax dans la libération des protéines pro-apoptotiques par la mitochondrie (pour revues voir Kumarswamy et Chandna, 2009 ; Chipuk et al., 2010). Sans rentrer dans les détails, Bax pourrait induire l'ouverture d'un important pore non spécifique, le MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore), un

Protéines anti-apoptotiques BH1-4 : Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, MCL-1



Protéines pro-apoptotiques

- BH1-3 : Bax, Bak, Bok



- BH3 seul : Bid, Bim, Bik, Bad, Noxa, Puma, Hrk, etc.

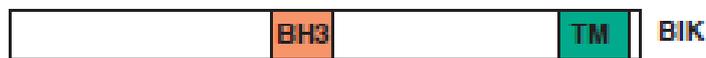


Figure 33 : Protéines de la famille Bcl-2 (d'après Lomonosova et Chinnadurai, 2008). Les structures des domaines des membres représentatifs de chaque sous-famille sont indiquées.

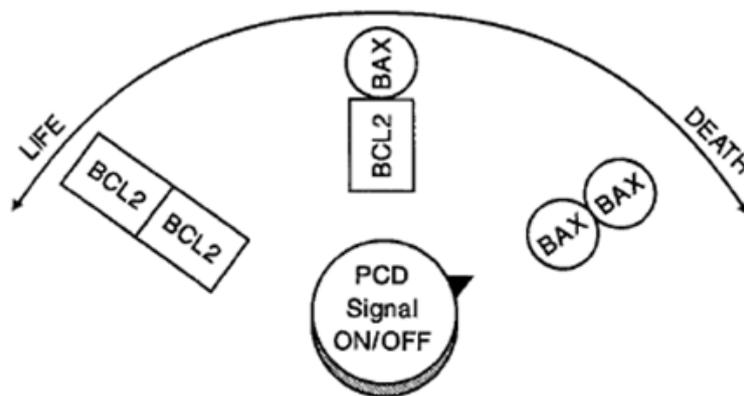


Figure 34 : Susceptibilité de la mort cellulaire programmée (d'après Yang et Korsmeyer, 1996). Le ratio relatif d'homodimères ou d'hétérodimères de Bcl-2 et Bax détermine la susceptibilité à la MCP.

complexe multi-protéique présent dans la MEM (Marzo et al., 1998 ; Halesrtap et al., 2003). Cela entraînerait une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial suivie d'une entrée massive d'eau et de molécules de faibles masses moléculaires responsables du gonflement de la mitochondrie. Il s'en suivrait une dislocation de la MEM et donc une libération des protéines inter-membranaires pro-apoptotiques (Feldmann et al., 2000). Cependant, il a aussi été montré que Bax pouvait induire cette libération sans dislocation de la MEM, et indépendamment des MPTP (Eskes et al., 1998 ; Kuwana et al., 2002). Après la survenue d'un signal de mort, Bax subit un changement de conformation et une relocalisation au niveau de la mitochondrie (**Figure 35**). Il s'associerait alors avec d'autres Bax pour former des homo-oligomères dans la MEM. Ces oligomères constitueraient des pores qui provoqueraient la fuite des protéines présentes dans l'espace inter-membranaire mitochondrial (Antonsson et al., 2000 ; Er et al., 2006). Un mode d'activation identique est retrouvé chez son homologue fonctionnel, Bak, déjà présent au niveau de la MEM. En parallèle, Bax et Bak sont aussi impliqués dans l'apoptose *via* le relargage du calcium (Ca^{2+}) par le RE. En effet, les mitochondries mais surtout le RE constituent un lieu de stockage pour le Ca^{2+} servant à réguler sa concentration (Rizzuto et al., 1993). C'est pourquoi, une altération des membranes de ces organites ou de la membrane plasmique peut conduire à une élévation incontrôlée de cette concentration et provoquer la mort cellulaire (Scorrano et al., 2003). L'activation de l'IP₃R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor), situé à la surface du RE, cause la libération du Ca^{2+} par le RE dans le cytosol. Ce Ca^{2+} est rapidement capté par la mitochondrie, localisée à proximité du RE (Rizzuto et al., 2002). Dans une cellule viable, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L localisés au niveau de la membrane du RE, maintiennent l'homéostasie calcique dans la cellule en régulant l'activité des IP₃R (Rong et al., 2009). Mais dans des conditions d'apoptose, Bax et Bak vont inactiver la fonction inhibitrice de Bcl-2 et Bcl-x_L sur IP₃R, et ainsi stimuler la libération du Ca^{2+} (Scorrano et al., 2003 ; Oakes et al., 2005). La recapture massive du Ca^{2+} par les mitochondries provoque une dépolarisation de la membrane mitochondriale, un arrêt des synthèses d'ATP et l'ouverture du MPTP entraînant ainsi les changements morphologiques décrits précédemment et la libération des protéines pro-apoptotiques (Bernardi, 1999; Boehning et al., 2003). La libération massive de Ca^{2+} entraîne également d'autres modifications dans la cellule indépendantes de la mitochondrie, aboutissant à la mort de cette dernière par apoptose.

VI-2-2-2- Protéines BH-3 only

Les membres de la famille BH-3 only agissent en tant que « sentinelles » et sont activés en réponse à divers stress cellulaires. Ils ont tous le même but c'est-à-dire permettre l'activation des protéines pro-apoptotiques à multidomains notamment Bax et Bak.

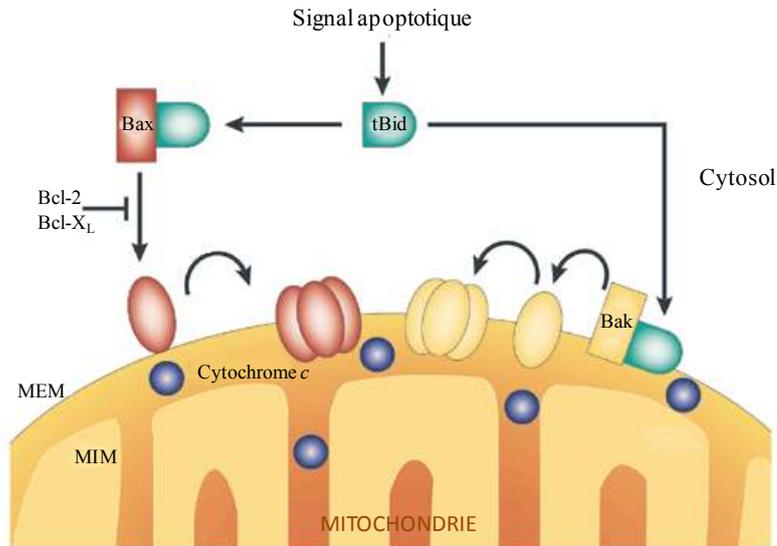


Figure 35 : Activation de Bax et Bak par tBid (d'après Martinou et Green, 2001). Après avoir interagi avec tBid, Bax subit un changement de conformation, s'insère dans la membrane externe, s'oligomérisse et libère le cytochrome c et d'autres facteurs de mort à partir de l'espace intermembranaire mitochondrial. tBid peut aussi se transloquer dans la mitochondrie où il active Bak lequel est constitutivement ancré à la membrane mitochondriale. Bak subit aussi un changement de conformation, s'oligomérisse et entraîne la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2 inhibent le changement de conformation de Bax et/ou son insertion.

Ils sont séparés en 2 classes suivant leur capacité à interagir avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou avec les protéines pro-apoptotique de cette même famille. En effet, il a été montré que les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL, Bcl-w et Bcl-2 changent de localisation et/ou de conformation durant l'apoptose, les rendant ainsi inactives. Ce changement serait dû à leur liaison avec les protéines BH-3 only comme par exemple Bcl-w avec Bim et Bcl-xL avec Bad (Wilson-Annan et al., 2003 ; Jeong et al., 2004). D'autre part, tBid, une forme de Bid activée par clivage par la caspase 8, se lie aux protéines pro-apoptotiques Bak et Bax déclenchant leur activation et leur oligomérisation pour former les canaux mitochondriaux (Desagher et al., 1999) (**Figures 27 et 35**). Dans ce cas, Bid constituerait un lien entre les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

VI-2-3- Libération extra-mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques

La mitochondrie est considérée comme un centre décisionnel de vie ou de mort. Si les signaux de mort sont plus importants que ceux de vie alors la MEM est perméabilisée par un

mécanisme qui n'est pas encore bien défini et qui est encore un sujet de controverse comme décrit précédemment. La mitochondrie renferme des protéines pour la plupart impliquées dans le bon fonctionnement de cette dernière mais lorsque la cellule reçoit un signal de mort, ces protéines peuvent être libérées dans le cytosol et avoir un tout autre rôle : déclencher la mort de la cellule.

VI-2-3-1- Le cytochrome c

Le cytochrome c est un composant essentiel de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et participe activement à la production d'énergie dans la cellule et au maintien du potentiel membranaire mitochondrial. Il est associé à la membrane interne mitochondriale *via* sa liaison à un phospholipide anionique spécifique des mitochondries, la cardiolipine. Suite à un signal de mort, le cytochrome c se détache de la membrane pour devenir soluble dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, puis est libéré dans le cytoplasme suite à la perméabilisation de la MEM (Ott et al., 2001). En se liant à Apaf-1, le cytochrome c va provoquer l'activation d'une cascade de caspases conduisant à la mort de la cellule (Li et al., 1997). La chute du potentiel transmembranaire mitochondrial accompagne souvent la libération du cytochrome c. Cependant, Goldstein et al. (2000) ont montré qu'après libération du cytochrome c, la cellule pouvait conserver son potentiel transmembranaire. Ceci indique que soit le cytochrome c n'est pas libéré dans sa totalité ou soit qu'il est re-capté librement par la mitochondrie pour participer au transport d'électrons (Kluck et al., 1999). Goldstein et al. (2000) spéculent sur le fait que les cellules maintiennent un potentiel transmembranaire et une concentration en ATP normale jusqu'à ce que les caspases soient activées. En effet, l'ATP est requis pour l'oligomérisation d'Apaf-1 et donc, la création de l'apoptosome.

VI-2-3-2- Apoptosis Inducing Factor

L'Apoptosis Inducing Factor ou AIF est une flavoprotéine à activité NADH oxydase, ancrée au niveau de la membrane interne mitochondriale (Norberg et al., 2010), où elle exerce une fonction vitale dans la bioénergétique et la défense anti-oxydante (Susin et al., 1999; Miramar et al., 2001). C'est une protéine phylogénétiquement ancienne avec des orthologues chez les Archae, les eubactéries, les métazoaires, les champignons et les plantes. En réponse à un stimulus de mort cellulaire spécifique, le processus de libération de l'AIF est le même que celui du cytochrome c, c'est-à-dire décrochage de la membrane et libération dans le cytosol (Norberg et al., 2010). Il va alors migrer au niveau du noyau et se lier à l'ADN par des interactions électrostatiques (Vahsen et al., 2006). Il induit une condensation de la chromatine et une dégradation de l'ADN en gros fragments de l'ordre de 50 Kpb (Susin et al., 1999) induisant la

mort de la cellule. Cande et al. (2004) ont montré que l'AIF nécessitait une association avec la cyclophiline A pour former une DNase active.

VI-2-3-3- Endonucléase G

Cette protéine interviendrait dans les processus de régénérations intracellulaires tels que la réparation de l'ADN nucléaire endommagé et la réplication de l'ADN mitochondrial (Cote et Ruiz-Carrillo, 1993 ; Lorenzo et Susin, 2004). Lors d'un signal apoptotique, elle est libérée dans le cytosol en même temps que les autres protéines mitochondriales responsables de l'apoptose. Elle induirait une fragmentation oligonucléosomale de l'ADN, aboutissant à la mort de la cellule (Li et al., 2001). Cependant, il est possible qu'il existe d'autres protéines qui agiraient avec elle pour aboutir à ce résultat (pour revue voir Widlack et Garrard, 2005). La mort cellulaire induite par l'endonucléase G ou l'AIF ne fait pas intervenir les caspases et représente donc une voie d'apoptose caspases-indépendante.

VI-2-3-4- Smac/DIABLO et HtrA2/Omi

Ces deux protéines mitochondriales, libérées lors de la perméabilisation de la MEM, sont impliquées dans la régulation de l'activité de certaines caspases (pour revue voir Saelens et al., 2004). L'activité catalytique des caspases activées peut être directement inhibée par la famille d'inhibiteur de caspases, les protéines IAP (voir Par. VI-1-4). Cependant, cette inhibition peut être levée grâce aux protéines Smac/DIABLO et HtrA2/Omi qui vont interagir avec ces protéines *via* des domaines spécifiques et vont donc permettre le déroulement de l'apoptose. Contrairement à Smac/DIABLO dont l'action anti-IAP repose sur une liaison stœchiométrique et réversible, HtrA2/Omi agit de façon catalytique et irréversible (Srinivasula et al., 2000 ; Srinivasula et al., 2003 ; Althaus et al., 2007).

VII- MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE CHEZ LES EUCARYOTES UNICELLULAIRES

La MCP est essentielle pour le développement, l'homéostasie et la défense des organismes multicellulaires. Cependant, chez les organismes eucaryotes unicellulaires, elle conduit de fait à la mort de l'unique cellule. Néanmoins, des formes variées de MCP ont été décrites chez plusieurs eucaryotes unicellulaires phylogénétiquement distants. Ceci inclue les organismes non parasites tels que le mixomycète *Dictyostelium discoideum* (Arnoult et al., 2001 ; Tresse et al., 2008), le dinoflagellé *Peridinium gatunense* (Vardi et al., 1999), le cilié *Tetrahymena thermophila* (Kobayashi et Endoh, 2005) et les champignons *Saccharomyces cerevisiae* (Madeo et al., 1999 ; Ludovico et al., 2001 ; Sharon et al., 2009), et *Candida albicans*

(Philips et al., 2003 ; 2006 ; Andres et al., 2008). Chez les organismes parasites, la MCP a été décrite pour les kinétoplastidés des genres *Trypanosoma* et *Leishmania* (pour revues voir Duszenko et al., 2006 ; Shaha et al., 2006), la diplomonadine *Giardia lamblia* (Chose et al., 2003), le straménopile *Blastocystis hominis* (Nasirudeen et al., 2004, Yin et al., 2010a, b), et l'apicomplexa du genre *Plasmodium* (Picot et al., 1997 ; Al-Olayan et al., 2002 ; Deponte et al., 2004 ; Totino et al., 2008) (**Tableau 2**).

VII-1- Voies de mort cellulaire chez les eucaryotes unicellulaires

La machinerie de mort cellulaire chez les eucaryotes unicellulaires semble être similaire à celle des métazoaires mais moins complexe et plus ancienne. Chez les métazoaires, et comme je l'ai décrit précédemment, il existe deux voies principales d'apoptose dépendantes des caspases: la voie extrinsèque *via* les récepteurs de mort et la voie intrinsèque *via* les mitochondries. Il existe également une voie indépendante des caspases dont les principaux acteurs sont l'AIF et l'endonucléase G. Chez les eucaryotes unicellulaires, des gènes codant des homologues de protéines de métazoaires impliquées dans ces différentes voies ont été identifiés (pour revue voir Shemarova, 2010). Néanmoins, tout reste à découvrir concernant la transduction du signal de mort et la réalisation du programme de mort aboutissant au « suicide » de ces organismes.

Parmi ces protéines homologues, citons tout d'abord les récepteurs « Fas-like », qui ont été identifiés à la surface de quelques espèces de ciliés tel que *Tetrahymena thermophila* (Jasofriedmann et al., 2000 ; Xu et al., 2006). Cependant, la majorité des eucaryotes unicellulaires ne présentent pas de récepteurs spécialisés capables de percevoir un signal suicidaire. En revanche, ce signal semble être exécuté par des protéines sensibles aux changements physico-chimiques de l'environnement. Elles sont localisées dans la membrane plasmique et seraient capables de déclencher les voies de signalisation activées par le stress ou des agents toxiques *via* un changement de l'homéostasie du Ca^{2+} et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En d'autres termes, ces protéines transformeraient un signal suicidaire extracellulaire en signal intracellulaire qui conduirait à l'induction de l'apoptose (pour revue voir Shemarova, 2010). Il a été montré que chez les eucaryotes unicellulaires comme d'ailleurs chez les organismes multicellulaires, une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire et des ERO peut déclencher une MCP dépendante de la mitochondrie avec libération de facteur pro-apoptotiques (Ridgley et al., 1999 ; Murkherjee et al., 2002 ; Burhans et al., 2003 ; Lemaster et al., 2009 ; Sharon et al., 2009).

Citons également les protéines à activité caspase ou les caspases-like présentes chez de nombreux eucaryotes unicellulaires et qui semblent avoir la même fonction que les caspases dans la MCP.

Table 1. Programmed cell death in protozoa

Species	Live cycle stage	Signs of PCD	Induced by	Refs
<i>Plasmodium</i> spp.	Ookinetes	DNA fragmentation PS exposure	Reactive oxygen species	[30]
	Liver stage	Parasite disintegration	Not known	[26,49]
	Blood stage	DNA fragmentation	Chloroquine H ₂ O ₂	[20]
<i>Leishmania</i> spp.	Promastigotes	Cell shrinkage Nuclear chromatin condensation DNA fragmentation Membrane blebbing Mitochondrial transmembrane potential loss Cytochrome c release Apoptotic bodies PS exposure	Reactive oxygen species Drugs Heat shock Differentiation Flavonoids Respiratory chain inhibition LPS	Reviewed in Refs [15,16]
	Amastigotes	DNA fragmentation PS exposure Nuclear chromatin condensation Membrane blebbing Protease activation	Reactive oxygen species Drugs Differentiation	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Bloodstream trypomastigotes and epimastigotes	DNA fragmentation Nuclear chromatin condensation PS exposure Mitochondrial transmembrane potential loss Cytochrome c release Protease activation	Complement Late stationary phase culture <i>Bothrops jararaca</i> venom Drugs Aromatic diamidines Heat shock	Reviewed in Refs [18]
<i>Trypanosoma brucei</i>	Procyclic form and bloodstream form	DNA fragmentation PS exposure Mitochondrial transmembrane potential loss Nuclear chromatin condensation Cytoplasmic condensation	Drugs Prostaglandin D ₂ Reactive oxygen species High density culture	Reviewed in Ref. [16]
<i>Blastocystis hominis</i>	Vacuolar, granular, amoeboid form	Cellular shrinkage PS exposure Apoptotic bodies Cytoplasmic vacuolization DNA fragmentation	Monoclonal antibody Metronidazole	Reviewed in Ref. [73]
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Trophozoite	DNA fragmentation Nuclear chromatin condensation Apoptotic bodies	Drugs	Reviewed in Ref. [74]
<i>Giardia lamblia</i>	Trophozoite	DNA fragmentation Nuclear chromatin condensation Apoptotic bodies Cytoplasmic vacuolization	Drugs	Reviewed in Ref. [17]
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Amoeba	Vacuolization Cytoplasmic condensation Nuclear chromatin condensation Delayed plasma membrane disruption DNA degradation, no DNA fragmentation Mitochondrial transmembrane potential loss PS exposure	Starvation	[12,75]
<i>Peridinium gatunense</i>	Flagellate	DNA fragmentation Cytoplasmic condensation	CO ₂ limitation Reactive oxygen species	[13]
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Ciliate	Nuclear chromatin condensation DNA fragmentation Protease activation	Drugs C ₂ ceramide Fas-ligand	[76]

Tableau 2 : Processus de mort cellulaire décrits chez les protozoaires (d'après Shemarova, 2010).

Par exemple chez *Leishmania donovani*, Sen et al. (2004) ont mis en évidence la présence d'une caspase-3 like (métacaspase). Il s'est avéré que l'augmentation de l'activité de cette protéase était accompagnée d'une libération par la mitochondrie (les kinetoplastides possèdent une seule mitochondrie) de cytochrome c et de l'activation de nucléases nucléaires aboutissant à la dégradation de l'ADN. Ces protéases caspase-like feront l'objet d'une description plus approfondie ci-dessous. Enfin, nous pouvons citer, l'AIF et l'endonucléase G. En effet, des homologues de l'AIF ont été identifiés chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* (Wissing et al., 2004 ; Lorenzo et al., 1999) ainsi que chez *D. discoideum* (Arnoult et al., 2001) tandis que des homologues de l'endonucléase G ont été identifiés chez *S. cerevisiae* (Fahrenkrog et al. 2004), *Leishmania infantum* et *T. brucei* (Gannavaram et al., 2008 , Rico et al., 2009). Ces protéines auraient les mêmes fonctions que celles de leurs homologues mammaliens. Notons également la présence chez *S. cerevisiae*, d'un homologue de HtrA2/omi (Padmanabhan et al., 2009).

Une mort par autophagie a également été observée chez plusieurs eucaryotes unicellulaires. En effet, suite à différents traitements, les caractéristiques morphologiques de cette MCP, notamment la présence de vacuoles autophagiques, ont été observées chez *S. cerevisiae* (Ohsumi, 1994 ; Kraft et al., 2009), chez *P. anserina* (Pinan-Lucarré et al., 2005), chez *D. discoideum* (Tresse et al., 2008), *T. thermophila* (Christensen et al., 1998), *L. donovani* (Bera et al., 2003), *Acanthamoeba castellanii* (Moon et al., 2009), *T. cruzi* (Menna-Barreto et al., 2009) et *Blastocystis hominis* (Yin et al., 2010a). Les gènes ATG sont les principaux acteurs de l'autophagie et donc de la mort cellulaire autophagique. Chez les eucaryotes unicellulaires, des homologues de ces gènes ont été découverts. Chez la levure *S. cerevisiae*, 30 gènes ATG ont été identifiés comme étant impliqués dans l'autophagie (Suzuki et Ohsumi, 2007). Un seul gène, TbATG8, a été identifié chez *T. brucei* (Koopman et al., 2009). Chez *T. cruzi*, plusieurs gènes potentiels de l'autophagie ont été identifiés et il semblerait que quelques un soient impliqués dans la différenciation du parasite (Alvarez et al., 2008a, b). Chez *L. major*, la mort cellulaire autophagique a été jugée essentielle pour sa différenciation et sa virulence et 2 gènes homologues à ATG4 et Vsp ont été identifiés (Besteiro et al., 2006). Enfin, cette MCP a été jugée comme jouant un rôle important dans la prolifération et la différenciation des protozoaires *Entamoeba invadens* (Picazarri et al., 2008) et *Acanthamoeba* (Moon et al., 2009).

VII-2- Métacaspases dans la MCP des eucaryotes unicellulaires

Les métacaspases (MCAs) ou caspases-like constituent une nouvelle famille de protéines homologues aux caspases, récemment identifiées par Uren et al. (2000). Elles ont été identifiées chez les plantes, champignons et protozoaires. Les MCAs sont des cystéine peptidases appartenant à la famille C14 du clan CD qui inclue les caspases (chez les métazoaires) et les

paracaspases (chez les métazoaires et *Dictyostelium discoideum*) (Mottram et al., 2003). Les MCAs possèdent la dyade histidine-cystéine caractéristique du domaine catalytique des caspases, mais cependant elles ont une similarité de séquence faible avec celles des caspases. Les MCAs de levures et de quelques plantes contiennent une région riche en proline à leur extrémité amino-terminale. Les MCAs de plantes peuvent être séparées en deux sous groupes « type I » ou « type II » selon la présence d'une extension amino-terminale ou d'une insertion entre les sous unités putatives p20 et p10 (Uren et al., 2000).

Chez les eucaryotes pluricellulaires, comme décrit précédemment, les caspases jouent un rôle central dans les mécanismes moléculaires de l'apoptose et sont responsables de nombreux changements biochimiques et morphologiques qui l'accompagnent. Pourtant aucun gène codant des caspases n'a pu être identifié chez les plantes, champignons et protozoaires parasites. Or, puisque des caractéristiques morphologiques semblables à l'apoptose ont été décrites lors de la mort cellulaire de plusieurs organismes unicellulaires (**Tableau 2**) et certaines plantes, il est probable que les MCAs puissent jouer un rôle similaire à celui des caspases chez ces organismes. D'ailleurs il a été montré récemment que les MCAs de *S. cerevisiae* nommée YCA1 (Madeo et al., 2002 ; Mazzoni et al., 2005 ; Silva et al., 2005), du champignon *Podospora anserina* nommées PaMCA1 et PaMCA2 (Hamann et al., 2007), de la plante *Norway spruce* nommée mcII-Pa (Bozhkov et al., 2004 ; Suarez et al., 2004) et de *L. donovani* nommée LdMC (Lee et al., 2007), seraient impliquées directement dans la MCP de ces organismes.

En utilisant un système hétérologue en levure, il a été montré que les MCAs AtMCP1b, AtMCP2b et AtMC8 de la plante *A. thaliana* (Watanabe et Lam, 2005 ; He et al., 2007), que la MCA LmjMCA de *L. major* (Gonzalez et al., 2007) et que la MCA TbmMCA4 de *T. brucei* (Szallies et al., 2002), sont impliquées dans la MCP puisque capables d'induire la mort de *Saccharomyces* par complémentation. Plusieurs de ces MCAs s'auto-cliveraient pour être activées tout comme les caspases (Madeo et al., 2002 ; Vercammen et al., 2004 ; Watanabe et Lam, 2005 ; Gonzalez et al., 2007 ; Meslin et al., 2007 ; Moss et al., 2007). Cependant, elles n'ont pas la même spécificité enzymatique que les caspases. En effet, ces protéases sont incapables de couper des substrats spécifiques de caspases (acide aspartique en position P1) mais en revanche elles présentent une forte activité enzymatique avec des substrats contenant une arginine ou une lysine en position P1 (Madeo et al., 2002 ; Bozhkov et al. 2004 ; Vercammen et al., 2004 ; Watanabe et Lam, 2005, Gonzalez et al., 2006 ; Hamann et al., 2007 ; Lee et al., 2007). De plus, l'activité enzymatique de ces protéines n'est pas modifiée en présence d'inhibiteurs spécifiques de caspases, incluant le Z-VAD-fmk. Par contre ces protéases sont hautement sensibles aux inhibiteurs de protéases arginine ou lysine spécifique telles que la leupeptine et l'antipaine.

VII-3- Mort cellulaire chez le protiste parasite *Trichomonas vaginalis*

Il y a quelques années, notre équipe a montré qu'il était possible d'induire une forme de MCP chez *T. vaginalis*, l'agent de la trichomonose humaine, par l'utilisation de différents effecteurs comme des drogues pro-apoptotiques telle que la staurosporine qui a la particularité d'inhiber différentes protéines kinases, des drogues bloquant la polymérisation des tubulines comme la griseofulvine, le métronidazole ou un stress nutritif (Chose et al., 2002, Chose et al., 2003). Certaines caractéristiques morphologiques de cette forme de mort cellulaire chez *T. vaginalis* sont communes à celles décrites lors des MCP chez les eucaryotes pluricellulaires incluant l'exposition des phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane, la condensation chromatinienne, une fragmentation nucléaire, une vacuolisation intense et la formation de corps apoptotiques alors que d'autres semblent spécifiques à ce protiste comme le mode de fragmentation de l'ADN (**Tableau 3**). Ces observations ont été confirmées par des travaux menés sur une espèce voisine parasite des bovins, *Tritrichomonas foetus* (Mariante et al., 2003, Mariante et al., 2006) après un stress oxydatif ou après contact avec la griseofulvine. Ces auteurs ont aussi relevé une fragmentation du complexe axostyle-pelta, des hydrogénosomes anormaux et une internalisation irréversible des flagelles (perte de la mobilité).

	Nécrose	Apoptose	Paraptose	Autophagie	MCP chez <i>T. vaginalis</i>
Condensation chromatinienne	-	+	+/-	+	+
Fragmentation internucléosomale de l'ADN	-	+	-	-	+/?
Corps apoptotiques	-	+	-	-	+
Vacuolisation cytoplasmique	+	-	+	+	+
Gonflement mitochondriale	+	Quelques fois	Tard	-	ND
Activité caspase	-	+	-	-	-

Tableau 3 : Principales caractéristiques morphologiques de la mort cellulaire chez les métazoaires comparées à celles observées chez *Trichomonas vaginalis* (d'après Chose et al., 2003).

A ce jour, aucune donnée n'est encore disponible sur les molécules impliquées dans ce processus de mort cellulaire excepté l'implication potentielle de protéases. En effet, nos deux équipes travaillant respectivement sur *T. foetus* et *T. vaginalis* ont montré par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-caspase 3 et d'inhibiteurs de caspases, la présence de protéases pouvant être assimilées à des caspases chez ces parasites.

Préambule : Dans ce chapitre seuls les matériels et méthodes utilisés dans la seconde partie de ma thèse traitant de la mort cellulaire sont détaillés. Concernant la première partie de ma thèse focalisée sur l'identification moléculaire et la phylogénie des Parabasalia, toutes les informations sont disponibles dans les articles et n'ont donc pas été de nouveau mentionnées ici.

I- RECHERCHE *IN SILICO* DANS LE GENOME DE *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Dans un premier temps, nous avons recherché dans la base de données de la GenBank (NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) les séquences de protéines connues comme étant impliquées dans l'apoptose chez divers organismes eucaryotes (**Tableau 4**). Puis dans un deuxième temps, nous avons, en utilisant les séquences précédemment extraites, recherché par homologie des protéines potentiellement impliquées dans l'apoptose chez *T. vaginalis* souche G3 en interrogeant le site du programme de séquençage du génome de ce parasite (The Institute for Genome Research ou TIGR : <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/> puis Computational Biology and Functional Genomics Laboratory : http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=t_vaginalis) (Carlton, et al. 2007). Ces recherches ont été réalisées en utilisant différents programmes BLAST (Altschul, et al. 1997) directement accessibles sur ces sites. En parallèle, une recherche de domaines fonctionnels pour chaque protéine d'intérêt identifiée *in silico* a été réalisée *via* le programme CDD ou Conserved Domain Database du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

II- ANALYSE PHYLOGENETIQUE

Les 11 séquences identifiées dans notre recherche comme étant des métacaspases potentielles (**Tableau 5**) ont été incluses dans une analyse phylogénétique englobant 27 autres séquences de métacaspases caractérisées chez d'autres protozoaires mais aussi chez des plantes et des champignons (**Tableau 4**). L'alignement des séquences est réalisé à l'aide du logiciel BioEdit v7.0.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). L'analyse s'est limitée aux positions communes et non ambiguës dans l'alignement (166 positions prises en compte correspondant globalement au domaine peptidase C14) entre toutes les séquences utilisées. Cette analyse a été réalisée à l'aide du programme MrBayes v3_0b4 (Huelsenbeck et Ronquist, 2001) pour deux millions de générations en utilisant le modèle Jones-Taylor-Thornton (JTT) (Jones et al., 1992). Les valeurs de « burn in » ont été fixées à 10000 générations et les arbres ont été obtenus toutes les 100 générations. Les « Bayesian Posterior Probabilities » ou BPP ont été calculées en utilisant l'approche MCMC (Markov Chain Monte Carlo) (Green, 1995).

Protéines apoptotiques	Numéros d'accès à la Genbank
AIF (Apoptosis Inducing Factor)	Aspergillus fumigatus XP_753086.1, Dictyostelium discoideum CAC14872.1, Mus musculus AAD16435.1, Homo sapiens AAD16436.1, Caenorhabditis elegans NP_499564.2
AMID (AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of death)	Homo sapiens AAM77596.1, Mus musculus AAH38129.1, Aspergillus fumigatus EAL87121.
XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)	Homo sapiens CAC37338.1, Rattus norvegicus AAC32497.1, Schistosoma japonicum AAV97787.1, Mus musculus AAB58376.1
Métacaspases	Trypanosoma cruzi AAY84579.1, Trypanosoma cruzi AAY84580.1, Trypanosoma cruzi AAY84581.1, Trypanosoma cruzi AAY84582.1, Trypanosoma cruzi AAY84583.1, Arabidopsis thaliana AAP84706.1, Arabidopsis thaliana AAP84707.1, Arabidopsis thaliana AAP84708.1, Arabidopsis thaliana AAP84709.1, Arabidopsis thaliana AAP84713.1, Arabidopsis thaliana AAP84714.1, Arabidopsis thaliana AAP84710.2, Arabidopsis thaliana AAP84711.1, Arabidopsis thaliana AAP84712.1, Lycopersicon esculentum AAM51555.1, Aspergillus nidulans AAO13381.1, Leishmania major XP_843263.1, Schizosaccharomyces pombe AAY82367.1, Trypanosoma brucei CAD24802.1, Trypanosoma brucei CAD24803.1, Trypanosoma brucei CAD24804.1, Trypanosoma brucei CAD24805.1, Trypanosoma brucei CAD55946.1, Plasmodium berghei CAD88480.1, Acanthamoeba castellanii AAL87229.3, Plasmodium falciparum ABC84559.1, Saccharomyces cerevisiae AAT92851.1
BAK (BCL2-antagonist/killer)	Homo sapiens AAH04431.1, Mus musculus CAA73684.1, Rattus norvegicus AAF71760.1
BAX (Bcl2-associated X protein)	Rattus norvegicus AAA75200.1, Rattus norvegicus NP_058755.1, Mus musculus NP_031553.1, Canis familiaris BAC53619.1, Homo sapiens NP_004315.1, Homo sapiens NP_000648.2, Mus musculus NP_803129.1, Rattus norvegicus NP_058689.1,
Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)	
Bcl-XI	Homo sapiens Q07817, Mus musculus AAC53459.1, Bos taurus AAK31307.1, Canis familiaris BAB71819.1

BID (BH3 interacting domain death agonist)	Homo sapiens CAG30275.1, Homo sapiens AAH22072.2, Mus musculus AAC71064.1
HtrA2 (High temperature requirement protein A2) / Omi	Mus musculus AAD50499.1, Homo sapiens NP_659540.1
SMAC (Second mitochondria-derived activator of caspase)/DIABLO	Homo sapiens AAF87716.1, Mus musculus NP_075721.3
Endonuclease G	Mus musculus NP_031957.1, Rattus norvegicus BAE44115.1, Trypanosoma brucei XP_825169.1, Trypanosoma cruzi XP_813011.1, Homo sapiens CAI15412.1
Granzyme A	Mus musculus NP_034500.1, Homo sapiens NP_006135.1
Granzyme B	Homo sapiens NP_004122.1, Mus musculus NP_038570.1
HMG2 (High mobility group protein 2)	Homo sapiens CAA44395.1, Rattus norvegicus BAA12350.1
NM23-H1	Homo sapiens AAO85436.1
PP32	Homo sapiens AAH07200.1, Mus musculus NP_033802.2
SET	Homo sapiens NP_003002.1, Mus musculus BAA34736.1
Ape1 (apurinic/aprimidinic endonuclease 1)	Rattus norvegicus NP_077062.1, Homo sapiens AAB50212.1, Mus musculus NP_033817.1
CAD (Caspase Activated DNase) / DFF40 (DNA fragmentation factor, 40 kD, beta polypeptide)	Drosophila melanogaster BAA97120.1, Mus musculus BAA24977.1, Homo sapiens BAA32250.1
p53	Homo sapiens NP_000537.2, Mus musculus BAA82344.1

Tableau 4 : Numéros d'accès à la Genbank des différentes séquences de protéines connues comme étant impliquées dans l'apoptose chez différents organismes eucaryotes et utilisées dans notre recherche *in silico*. Les séquences de MCAs incluses dans ce tableau sont celles utilisées dans l'analyse phylogénétique.

Noms	Numéro d'accès dans la GenBank pour les séquences nucléotidiques	Numéro d'accès dans la GenBank pour les séquences protéiques
M1	XM_001318574	XP_001318609
M2	XM_001314672	XP_001314706
M3	XM_001328044	XP_001328079
M4	XM_001323498	XP_001323533
M5	XM_001582760	XP_001582810
M6	XM_001320974	XP_001321009
M7	XM_001321630	XP_001321665
M8	XM_001321614	XP_001321649
M9	XM_001302005	XP_001302006
M10	XM_001579203	XP_001579253
M11	XM_001313442	XP_001313443

Tableau 5 : Numéros d'accès à la GenBank des séquences nucléiques et protéiques des métacaspases de *Trichomonas vaginalis* identifiées dans notre recherche *in silico*. Un nom a été donné à chacune de ces métacaspases (M1 à M11) et est indiqué dans la colonne de gauche.

III- CULTURE ET RECOLTE DES PARASITES

La souche G3 de *T. vaginalis* est cultivée axéniquement à 37°C en milieu TYM (trypticase / yeast extract / maltose) de Diamond (1957) supplémenté avec 10% de sérum de cheval décomplémenté (Gibco, Invitrogen) et des antibiotiques (50 U/ml de pénicilline G et 25 mg/ml de streptomycine sulfate (Sigma). Les parasites sont mis en culture dans des tubes Falcon de 50 ml et les repiquages ont lieu toutes les 48 h.

IV- ETUDE DE L'EXPRESSION RELATIVE DES GENES DE METACASPASES DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* PAR PCR QUANTITATIVE APRES INDUCTION DE LA MORT PAR LA STAUROSPORINE

IV-1- Induction de la mort cellulaire

Dans des boîtes 6 puits (Nunclon), 4 ml de milieu TYM ont été déposés dans chaque puits additionné de 3.10^6 parasites. Une drogue pro-apoptotique, la staurosporine (STS, Sigma), est ajoutée dans la moitié des puits à une concentration finale de 5 μ M. Les puits restants contiennent les parasites non traités ou contrôles. Les temps d'incubation à 37°C sont de 3 h, 5 h, 7 h, 9 h et 11 h. Au bout de chaque temps d'incubation, les contenus des 2 puits (contrôle et STS) sont prélevés et centrifugés 4 min à 2800 tr/min. Les culots cellulaires sont ensuite lavés 2 fois au PBS en vue de l'extraction des ARN totaux et des analyses par cytométrie en flux.

IV-2- Extraction des ARN totaux et obtention des ADN complémentaires

L'extraction des ARN totaux (ARN_T) est réalisée après l'ultime centrifugation à partir de chaque culot à l'aide du kit RiboPure (Ambion) selon les instructions du fabricant. Les ARN messagers (ARN_m) sont par la suite obtenus en utilisant le kit MicroPoly(A) Purist (Ambion). La quantité et la pureté des ARN_m et des ARN_T extraits sont déterminées par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm et en déterminant le rapport d'absorbance A₂₆₀/A₂₈₀ qui doit se situer entre 1,8 et 2. Pour l'étude en PCR quantitative, nous avons rétrotranscrit pour chaque temps et chaque condition 1 μ g d'ARN_T en ADN complémentaires (ADN_c) en utilisant le kit ThermoScript RT-PCR (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. La quantité d'ADN_c obtenue est approximativement la même que celle des ARN_T de départ. Les ADN_c obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

IV-3- PCR quantitative

Les amplifications par PCR quantitative (Q-PCR) sont réalisées à l'aide du kit SYBR Green Master Mix qui comprend le SYBR Green I Dye, le Rox (fluorophore de référence), l'ADN

polymérase AmpliTaq Gold activable à 95°C, le tampon permettant son fonctionnement (avec MgCl₂) et les dNTP. Dans les mélanges réactionnels, nous avons utilisé 12,5 µl de solution SYBR Green Master Mix, auxquels s'ajoutent les amorces sens et anti-sens (70 nM de chaque), l'ADNc (50 ng) et l'eau pour un volume final de 25 µl. Pour ce qui est de l'ADNc, deux pools ont été utilisés (un contrôle et un traité à la STS) constitués de la mise en commun en même quantités des ADNc obtenus pour chaque temps d'incubation (3 h, 5 h, 7 h, 9 h et 11 h). Les couples d'amorces ont été choisis à l'aide du logiciel Primer Express (Applied Biosystems) et synthétisés par la société Eurogentec. Ces couples d'amorces sont spécifiques de chacun des gènes de métacaspase identifiés chez *T. vaginalis* (**Tableau 6**). En parallèle, un couple d'amorces spécifiques du gène de l'actine de ce parasite (gène de référence, numéro d'accèsion à la GenBank de la séquence: U63122) est également utilisé.

Ces amplifications sont réalisées à l'aide d'un Thermocycler ABI Prism 7000 programmé de la manière suivante: une étape d'activation de l'enzyme et de dénaturation de l'ADN (95°C, 10 min), puis 40 cycles de dénaturation (95°C, 15 s) et d'hybridation/élongation (60°C, 1 min) suivis d'une étape finale de dissociation (par montée progressive de la température de 60 à 95°C) permettant de vérifier la pureté du fragment amplifié. Les résultats sont exprimés en Cp (Crossing point), qui représente le nombre de cycles de PCR nécessaires pour atteindre un seuil de fluorescence fixé, la mesure se faisant dans la partie exponentielle de la courbe. Les réactions sont réalisées en triplicata et la valeur moyenne des Cp est calculée. Pour chaque échantillon d'ARN_T, l'absence de contamination d'ADN génomique est vérifiée lors de la Q-PCR en utilisant comme matrice l'ARN_T n'ayant pas subi de rétrotranscription et le couple d'amorces du gène de référence, l'actine. De plus, des contrôles sans matrice ADN (contrôle H₂O) sont réalisés pour chaque mélange réactionnel de Q-PCR pour vérifier l'absence de contamination. L'expérience, depuis l'extraction d'ARN_T jusqu'à la Q-PCR, est réalisée à 3 reprises.

IV-4- Quantification relative des niveaux d'expression

Afin de déterminer l'efficacité d'amplification (E) de chaque produit de PCR, des courbes étalons sont réalisées en utilisant des dilutions sérielles (1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 et 1:3125) d'un échantillon du pool d'ADNc contrôle. Les courbes (non montrées) sont générées par le logiciel 7000 System SDS et basées sur les valeurs de Cp et de log des dilutions d'ADN. L'efficacité d'un cycle pendant la phase exponentielle d'amplification est calculée à partir de la pente de la courbe étalon selon l'équation $E = 10^{(-1/\text{pente})}$. Pour chaque échantillon, l'expression relative (R_{rel}) du gène cible qui correspond à la différence d'expression du gène cible entre l'échantillon et le contrôle ($(E_{\text{cible}})^{\Delta C_p \text{ cible (ctl-éch)}}$) divisé par la différence d'expression du gène de référence (actine) entre l'échantillon et le contrôle ($(E_{\text{actine}})^{\Delta C_p \text{ actine (ctl-éch)}}$) est calculée. Ceci

correspond au modèle mathématique, $R_{rel} = (E_{cible})^{\Delta C_p \text{ cible (ctl-éch)}} / (E_{actine})^{\Delta C_p \text{ actine (ctl-éch)}}$, développé par Pfaffl (2001).

Nom	amorce sens (5'=>3')	amorce anti-sens (5'=>3')
M1	GCAAGAACCCAACATGACAGC	GAGATGGCGTTGTTGAAGCAA
M2	CACCGAAGGTGATATGCCAA	CATTGTCTGGACCAAGTGCCA
M3	GATTGCTGCCATTCAGGCTC	TTATCGTTTGCAGCACTCACG
M4	CACATTCGGCTTCGACTGCT	GAGCCATGTGCTTTGTGACGT
M5	AATGTCAATGGCAGAAGTCTTC	CCTTGCTCTTGCCCTCAGC
M6	TCCCGGTTTCTAAGCTTCCC	ATTCA TCGGACCATCACCAAG
M7	GTTAATGGCCGCAAGCTTCA	ATACCTTGCTCGACTCTATCTGC
M8	TCCTTCTTTCAGATTGCTGCC	TTGCTTATCCTGAGCAGCTGAG
M9	CTTACTTTGGGTGTTGCCCC	GCTTGCGTAGGGTTGTGGAT
M10	TACCGATGTTGCCACTCAG	CGTAGCAGCAGAAATCGAA
M11	ATGTCAGATTGCTGCCATGG	TTCGTTGCAGCAACAGAAAGA
Actine	TACTCCCTTCCACACGCCAT	GTGTTGAAAGCATTGCCACG

Tableau 6 : Liste des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification par Q-PCR des différents gènes de métacaspases de *Trichomonas vaginalis*.

V- ANALYSE DE LA MORT CELLULAIRE DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* PAR CYTOMETRIE EN FLUX

V-1- Marquages à l'annexine V et à l'iodure de propidium

Les cultures de parasites en présence ou non de STS (conditions de la cinétique décrites ci-dessus) sont diluées pour obtenir une concentration d'environ 10^6 cellules/ml avant d'être centrifugées. Les culots cellulaires sont lavés 2 fois au PBS puis repris dans 1 ml de tampon annexine V (0,1 M HEPES (pH 7,4), 1,4 M NaCl et 25 mM CaCl₂). 130 µl de cette suspension cellulaire sont ensuite marqués avec 5 µl de FITC-annexine V (BD Pharmingen) et 10 µl d'iodure de propidium (IP) (Sigma) (50 µg/ml) pendant 15 min à l'obscurité et à température ambiante. Les cellules sont analysées par un cytomètre en flux FACSCalibur (Becton Dickison). Les fluorescences FITC et IP sont enregistrées pour 10000 événements et analysées avec le logiciel CellQuest.

V-2- Marquage TUNEL

Pour ce marquage (Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling), les cultures de parasites en présence ou non de STS (conditions de la cinétique décrites ci-dessus) sont diluées pour obtenir une concentration d'environ $2,7 \cdot 10^6$ cellules/ml avant d'être

centrifugées. Les culots cellulaires sont lavés 2 fois au PBS, fixés avec 2% de paraformaldéhyde à température ambiante puis lavés dans du PBS avant perméabilisation avec 0,1 % de Triton X-100 dans 0,1 % de citrate de sodium pendant 2 min sur de la glace. Les cellules perméabilisées sont ensuite marquées avec le mélange de la réaction TUNEL (In Situ Cell Death Detection kit Fluorescein, Roche) pendant 1 h à 37°C. Des contrôles négatifs et positifs (traitement des cellules avec une DNase) sont réalisés en parallèle afin de confirmer la validité du marquage. Après deux lavages au PBS, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. La fluorescence FITC est enregistrée pour 10000 événements et analysée avec le logiciel CellQuest.

VI- PRODUCTION DES METACASPASES DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* EN SYSTEME BACTERIEN

VI-1- Amplification et clonage des gènes dans le vecteur pGex-6-P2

Les gènes codant pour les métacaspases M5, M6, M8 et M9 de *T. vaginalis* (**Tableau 5**) sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces sens permettant d'introduire le site de restriction *Bam*HI et des amorces anti-sens permettant d'intégrer le site *Eco*RI (**Tableau 7**). Les amplifications sont réalisées dans un volume final de 50 µl selon les conditions standards décrites pour la Platinum *Taq* High Fidelity DNA polymerase (Invitrogen) en utilisant comme matrice l'ADN génomique de *T. vaginalis*. Après une étape de dénaturation à 94°C pendant 5 min, 40 cycles d'amplification sont effectués avec l'appareil GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) comme suit : 1 min à 94°C, 1 min à 50°C et 3 min à 68°C. Enfin, une étape d'extension finale est réalisée pendant 10 min à 68°C. Les produits d'amplification ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les bandes correspondantes aux tailles attendues (environ 750 pb pour M6 et M5 et 890 pb pour M8 et M9) sont découpées sur gel et les produits de PCR correspondants sont purifiés à l'aide du kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega). Ces produits purifiés sont clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen) et amplifié dans des bactéries compétentes TOP10 (Invitrogen) après transformation de celles-ci par choc thermique selon les instructions du fournisseur. Les clones sélectionnés ayant intégré un plasmide sont mis en culture en milieu LB liquide plus ampicilline (100 µg/ml) une nuit à 37°C, sous agitation. Les plasmides sont extraits à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) puis dosés au spectrophotomètre. Après vérification de la présence d'un insert par digestion du plasmide par l'enzyme de restriction *Eco*RI, deux clones positifs ont été arbitrairement sélectionnés pour chaque clonage et séquencés sur les deux brins (Société Genoscreen, Lille). Une fois les séquences vérifiées, les plasmides sont ensuite doublement digérés par les enzymes de restriction *Eco*RI et *Bam*HI. Les produits de ces deux digestions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les inserts sont extraits du gel, purifiés puis

Noms	amorce sens (5'=>3') <i>Bam</i> HI	amorce anti-sens (5'=>3') <i>Eco</i> RI
M5	CATTATTCGAAGGGATCCATGAGCTCTAG	AATTTTAATAATGAATTCCTTAACATAGGTTAAAC
M6	CATTTCTCACTTGGATCCATGAGTGCTAAAAC	CTAAATTTCTTTGAATTCCTCAAACCAAGTT
M8	CATTCTAAGAGGATCCATGGGAAACATCC	GTAATACATAATTCATTTAGTGAATTCCTTAAAGCAAAG
M9	TCGCAACCAGGATCCATGGGAAGCATCATC	AAAAATATTGAATTCGTCATAAGAAAC

Tableau 7 : Liste des amorces sens et anti-sens, comprenant les sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI (soulignés), utilisées pour l'amplification et le clonage des gènes de métacaspases dans le vecteur d'expression pGEX-6-P2.

Noms	amorce sens (5'=>3') C/A	amorce anti-sens (5'=>3') C/A
M5	CCTTATTAGCGACTGCGCCACAGTGGAAGCATTGGG	CCCAAATGCTTCCACTGTGGCGCAGTCGCTAATAAGG
M6	CAAGCTTATTTGATTCTGACTGCGCCATTGAGAACTG	CAGTTCCTGAATGGCGCAGTCAGAAATCAAATAAGCTTG
M8	CCTTCTTTCAGATTGCGCCACTCTGGTACAATTTGGGATC	GATCCCAAATTTGTACCAGAGTGGCGCAATCTGAAAGAAGG
M9	GTCTTCTTTCTGACTGTGCCCATAGTGGAACAATTTGGG	CCCAAATGTTCCACTATGGGCACAGTCAGAAAAGGAAGAC

Tableau 8 : Liste des amorces sens et anti-sens, comprenant le site à muter (souligné, mutation cystéine en alanine) dans chaque gène de métacaspase et utilisées pour la mutagenèse dirigée.

Noms	amorce sens (5'=>3') H/A	amorce anti-sens (5'=>3') H/A
M5	GGCTGTTTACTATGTCGGAGCTGGAACAAGTGTGTTGATAC	GTATCAACAACACTTGTTCAGCTCCGACATAGTAAACAGCC
M6	GCCTTCTTCTATGTTGGCGCCGGTACAAATGTTGCTG	CAGCAACATTTGTACCGGCGCCAACATAGAAGAAGGC
M8	CATATTACACAGGCGCCGGTACTCAAGTTGATGGCGG	CCGCCATCAACTTGAGTACCGGCGCCTGTGTAATATG
M9	CACATATTACACAGGCGCCGGCACACAGCTCG	CGAGCTGTGTGCCGGCGCCTGTGTAATATGTG

Tableau 9 : Liste des amorces sens et anti-sens, comprenant le site à muter (souligné, mutation histidine en alanine) dans chaque gène de métacaspase et utilisées pour la mutagenèse dirigée.

Nom	amorce sens (5'=>3') <i>Eco</i> RI	amorce anti-sens (5'=>3') <i>Cl</i> aI
M6	CATTTCTCACTTGAATTCATGAGTGCTAAAAC	CTAAATTTCTTTCAATCGATCTCAAACCAAGTT
M9	TCGCAACCAGAATTCATGGGAAGCATCATC	AAAAATATTCAATCGATGTCATAAGAAAC

Tableau 10 : Liste des amorces sens et anti-sens, comprenant les sites de restriction *Eco*RI et *Cl*aI (soulignés), utilisées pour l'amplification et le clonage des gènes de métacaspases dans le vecteur d'expression pESC-HIS.

clonés dans le vecteur d'expression bactérien pGEX-6P-2 (Amersham) (**Figure 36 A**), préalablement linéarisé par digestion enzymatique avec *EcoRI* et *BamHI*. Ce clonage est réalisé à l'aide de la T4 DNA ligase (Biolabs) selon les instructions du fabricant. Les inserts sont clonés ainsi en phase avec la glutathione S-transférase (GST) à leur extrémité amino-terminale. Les séquences de ces constructions sont vérifiées à l'aide d'amorces internes.

VI-2- Mutagenèse dirigée

Les mutations ponctuelles des résidus cystéine et histidine du site catalytique en alanine (M5^{H99A}, M5^{C151A}, M6^{H99A}, M6^{C151A}, M8^{H141A}, M8^{C198A}, M9^{H142A} et M9^{C199A}) ont été introduites par mutagenèse dirigée à partir des plasmides purifiés correspondant (pGEX-6-P2 / métacaspase) en utilisant le kit QuickChange Site-directed Mutagenesis (Stratagene), selon les recommandations du fabricant. Les huit paires d'amorces utilisées pour cette mutagenèse sont indiquées dans les **Tableaux 8 et 9**. L'incorporation des mutations a été vérifiée par séquençage.

VI-3- Production des métacaspases recombinantes

Les bactéries de la souche compétente BL21/DE3 de *E. coli* (Invitrogen) ont été transformées par les plasmides pGEX-6-P2 dans lesquels ont été clonés les gènes codant les métacaspases sauvages (WT pour wild type) ou mutées. Comme contrôle, la même souche BL21/DE3 a également été transformée avec le vecteur pGEX-6-P2 vide. Les colonies résistantes à l'ampicilline ont été sélectionnées sur boîte d'agar. Une colonie de chaque construction a été mise en culture jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,5 avant induction de la production des protéines correspondantes par 0,2 mM d'IPTG toute une nuit à 20°C sous agitation. Après centrifugation des bactéries, le culot est repris dans du PBS contenant 1% de Triton X-100 puis traité par sonication sur glace pendant 3 min. Les débris cellulaires résiduels sont éliminés par centrifugation à 14000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est alors récupéré et mélangé avec des billes de glutathion-agarose (Sigma) à 4°C toute une nuit sous agitation continue. Après cette incubation, les billes liées aux protéines couplées à la GST sont lavées trois fois dans une solution de PBS / 1% Triton X-100 / NaCl 500 mM. Les métacaspases recombinantes sont ensuite éluées avec une solution de 10 mM de glutathion réduit et dialysées contre du PBS à 4°C toute une nuit. La concentration finale des protéines est déterminée avec le kit BCA™ Protein Assay (Pierce). Les protéines ainsi purifiées sont séparées sur gel SDS-PAGE 12 %, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose PROTAN (Interchim). Les membranes sont ensuite saturées pendant 1 h à température ambiante dans du tampon PBS-lait 5% -Tween 20 0,1% afin de bloquer les liaisons non spécifiques, puis incubées avec un anticorps primaire monoclonal anti-GST produit chez la souris (Euromedex) à la dilution de 1:1000ème

dans du PBS-lait 5% - Tween 20 0,1%, une nuit à 4 °C. Après 3 lavages dans du PBS - Tween 20 0,1%, les membranes de nitrocellulose sont incubées avec un anticorps secondaire de lapin anti-souris couplé à la peroxydase à la dilution de 1:5000ème (ABcys) dans du PBS - lait 5% - Tween 20 0,1%, 1 h à température ambiante. Après 3 lavages dans du PBS - Tween 20 0,1%, l'activité peroxydase est révélée sur la membrane de nitrocellulose par addition du HRP Color Development Reagent (Biorad) contenant le substrat de la peroxydase.

VII- PRODUCTION DES METACASPASES DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* EN SYSTEME LEVURE

Les gènes codant les métacaspases M6 et M9 de *T. vaginalis* sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces sens incorporant le site de restriction *EcoRI* et des amorces anti-sens incorporant le site de restriction *ClaI* (**Tableau 10**). Les produits d'amplification purifiés sont ensuite clonés dans le vecteur PCR2.1-TOPO comme décrit précédemment et les constructions vérifiées par séquençage. Après purification et double digestion des plasmides, les inserts sont clonés entre les sites *ClaI* et *EcoRI* du vecteur pESC-His (**Figure 36 B**) préalablement digéré par ces mêmes enzymes pour générer les plasmides pESC-M6 et pESC-M9. Les gènes codant M6 et M9 sont clonés en phase dans ce vecteur et les protéines correspondantes sont ainsi couplées à un tag FLAG à leur extrémité carboxy-terminale. Une souche de *S. cerevisiae* déficiente pour le gène YCA1 ($\Delta yca1$) (MAT a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YOR197w:kanMX4) est transfectée par la méthode au chlorure de calcium suivi d'un choc thermique avec le plasmide pESC-His vide, le plasmide pESC-M6, le plasmide pESC-M9 et le plasmide pFM21 (ou PESC-YCA1 codant la protéine YCA1-FLAG). Le plasmide pFM21, le plasmide pESC-His vide ainsi que la souche $\Delta yca1$ nous ont été gracieusement fournis par le Dr. F. Madeo, Université de Tübingen, Allemagne. Les levures transfectées sont étalées sur boîte dans un milieu de culture spécifique SD/DO (synthétique / drop out = 0,67 % yeast nitrogen base, Becton Dickinson), une solution d'acides aminés sans histidine (20 mg/l adénine, arginine, méthionine, tryptophane et uracile; 30 mg/l isoleucine, lysine et tyrosine; 50 mg/l phénylalanine; 100 mg/l leucine; 150 mg/l valine et 200 mg/l thréonine) et 2 % de glucose (Sigma) comme source de carbone. Les boîtes sont incubées 3-4 jours à 30 °C. Puis, 10 ml de milieu SD/DO sont ajoutés à une colonie prélevée sur boîte et laissés une nuit à 30°C sous agitation à 230 rpm. Les cultures sont ensuite diluées dans du milieu SD/DO pour atteindre une DO_{600} de 0,1 puis agitées jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,5. Les cultures sont centrifugées et les culots cellulaires sont repris dans 50 ml de milieu SD/DO, contenant 2 % de galactose (Sigma) à la place du glucose afin d'induire l'expression des protéines. Pour cela, les cultures sont incubées à 30°C sous agitation pendant 24 h. Les levures sont ensuite broyées en vortexant les cellules avec environ 200 μ l de billes en

verres (Invitrogen). Les débris cellulaires et les billes sont éliminés par centrifugation à 14000 rpm pendant 20 min à 4°C. La concentration finale des protéines totales est déterminée avec le kit BCA™ Protein Assay (Pierce). Les protéines totales sont alors séparées sur gel SDS-PAGE 12% et transférées sur membrane de nitrocellulose. La membrane est incubée avec un anticorps primaire monoclonal de souris anti-FLAG (Invitrogen) à une dilution de 1:2000ème, puis avec un anticorps secondaire de lapin anti-souris couplé à la peroxydase à une dilution de 1:5000ème (ABCys). L'activité peroxydase est révélée avec un kit de chimiluminescence (ECL, Amersham Bioscience) selon les instructions du fabricant avant détection des protéines marquées par contact avec des films radiographiques (Kodak).

VIII- SPECTROMETRIE DE MASSE: PREPARATION DES ECHANTILLONS ET ANALYSE

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec Hervé Drobecq (Institut de Biologie de Lille) et Guy Vandebussche (Université Libre de Bruxelles). Les bandes protéiques d'intérêt (numérotées sur la Figure 44) sont excisées du gel SDS-PAGE 12 % et réduites en morceaux d'environ 1 mm³. Les résidus cystéine sont alkylés en présence de 55 mM d'iodoacetamide après réduction avec 10 mM de DTT. Les morceaux de gel sont ensuite lavés avec une solution contenant 50% CH₃CN / 25 mM NH₄HCO₃, déshydratés sous vide (SpeedVac) puis réhydratés dans 10 µl d'un tampon de digestion contenant 25 mM NH₄HCO₃, et 10 ng/µl de trypsine modifiée (Sequencing grade modified trypsin, Promega). La digestion est réalisée pendant une nuit à 37°C. Les surnageants sont collectés et les peptides sont extraits par lavage à l'aide de 50% CH₃CN / 0,1% acide trifluoroacétique. Les surnageants et les lavages sont rassemblés et évaporés sous vide (SpeedVac). Préalablement à l'analyse par spectrométrie de masse, les échantillons sont dessalés sur ZipTip C18 (Millipore), élués dans une solution contenant 6 mg / ml de matrice (acide α-Cyano-4-hydroxycinnamique) dans 50% acétonitrile / 0,1% acide trifluoroacétique (v/v) et déposés directement sur la cible. Le spectromètre de masse MALDI-TOF utilisé est un Voyager DE STR (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) équipé d'un laser à 337 nm. Les spectres sont obtenus en mode réflecteur sous un voltage de 20Kv, grille d'accélération à 61%, extraction retardée 125 nanosecondes. Le spectromètre de masse est calibré à partir d'un mélange de peptides obtenus par digestion tryptique de la BSA. Les masses obtenues sont attribuées aux peptides correspondants en utilisant le logiciel FindMod (Expasy proteomics tools : <http://www.expasy.ch/tools/findmod/>).

IX- DETERMINATION DE LA SPECIFICITE DE SUBSTRAT DES METACASPASES DE *TRICHOMONAS VAGINALIS*

IX-1- Substrats et inhibiteurs synthétiques

Tous les substrats fluorogènes utilisés sont commercialisés par la société Bachem. Les inhibiteurs ont été fournis par la société Sigma-Aldrich à l'exception du Z-VAD-cmk qui nous a été fourni par le Dr. David Tulasne (Institut de Biologie de Lille) et du z-FK-cmk (Bachem). Les tests d'activité enzymatique des métacaspases recombinantes purifiées sont réalisés dans 200 μ l de tampon d'activation avec 1 μ g de protéine recombinante purifiée et 50 μ M (concentration finale) de substrat fluorogène : Boc-Gly-Arg-Arg-7-amino-4-méthylcoumarin (Boc-GRR-AMC), Boc-Val-Leu-Lys-7-amino-4-méthylcoumarin (Boc-VLK-AMC) et N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-méthylcoumarin (Ac-DEVD-AMC). Pour le test d'activité de la caspase 3 humaine purifiée (aimablement fournie par le Dr. D. Tulasne), le tampon d'activation est constitué de 50 mM HEPES (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 % sucrose, 0,1 % CHAPS et 10 mM DTT. Pour la détermination des profils de pH des activités enzymatiques des métacaspases, le tampon d'activation est réalisé avec 50 mM acide acétique, 50 mM MES, 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 10% glycerol, 0,1% CHAPS et 10 mM DTT. Pour tester l'activité des métacaspases à partir d'extraits cellulaires bruts provenant de cultures (50 ml) de levures, les cellules récupérées par centrifugation sont reprises dans du tampon de lyse (50 mM de phosphate de potassium, pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 1% (w/v) CHAPS et 5 g/ml aprotinine) et lysées en présence de billes de verre. Les lysats cellulaires sont centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C. La concentration finale des protéines totales est déterminée avec le kit BCA™ Protein Assay (Pierce). L'activité enzymatique des surnageants est déterminée à partir d'environ 40 μ g de protéines totales comme décrit précédemment. Les effets des inhibiteurs de protéases sont testés dans les mêmes conditions réactionnelles. Ces composés sont utilisés aux concentrations finales suivantes : 2 μ M pour le Z-FK-cmk ; 5 μ M pour l'antipaine et la leupeptine ; 20 μ M pour le Z-VAD-cmk. Dans tous les cas, la libération d'AMC est mesurée à 37°C toutes les 10 min pendant 2h par spectrofluorimétrie en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 355 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm. Les activités enzymatiques sont déterminées par la pente obtenue par régression linéaire et exprimée en unités arbitraires de fluorescence par minutes et par μ g de protéine (UF/min/ μ g). Les résultats sont exprimés en activité relative, c'est à dire par rapport à l'activité du vecteur vide. Les expériences depuis l'induction des protéines jusqu'à la mesure de l'activité enzymatique ont été réalisées 3 fois.

IX-2- Substrat potentiel de M6: le facteur d'élongation EF-tu de *Escherichia coli*

Afin de produire le facteur d'élongation EF-tu de *E. coli*, le plasmid pGEXtufAwt, codant cette protéine couplée à la GST, nous a été gracieusement fourni par le Professeur Charlotte Knudsen (Aarhus University, Danemark). Cette protéine est produite et purifiée comme décrit précédemment pour les métacaspases de *T. vaginalis* (Par. VI-3). Nous avons ensuite mis en contact environ 2 µg de protéines M6 WT ou mutée (C/A) avec 2 µg de protéines EF-tu dans le même tampon d'activation décrit précédemment pour la caractérisation enzymatique des métacaspases, ou dans du PBS (contrôle). Les mélanges réactionnels sont incubés pendant 2, 5, 8 et 15 min à 37°C puis analysés par western blot avec un anticorps monoclonal anti-GST. Le western blot et la révélation de l'activité peroxydase sont réalisés comme décrit précédemment (Par. VI-3 et VII).

X- INDUCTION DE L'AUTOCLIVAGE DES METACASPASES DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* PAR LE CALCIUM

Les métacaspases recombinantes purifiées (M5, M6, M8 et M9) sont incubées avec du tampon d'activation avec ou sans 10 mM d'EGTA, un chélateur du calcium, pendant 15 min à 37°C. Les échantillons sont analysés par immunoblotting avec un anticorps monoclonal anti-GST comme décrit précédemment (Par. VI-3 et VII).

XI- ETUDE FONCTIONNELLE DES METACASPASES DE *TRICHOMONAS VAGINALIS*

XI-1- Clonage des gènes codant les protéines M6 et M9 dans le vecteur pBSneo

Des constructions sont réalisées en clonant les gènes M6 et M9 en sens (S) ou en anti-sens (AS) dans le vecteur pBSneo (**Figure 37**). Ces constructions permettent selon que le gène d'intérêt soit cloné en phase en sens ou en anti-sens, de détecter la protéine correspondante couplée à un tag HA à l'aide d'un anticorps anti-HA ou bien d'invalider ce même gène par ARN anti-sens (Mundodi et al., 2004). Pour cela les gènes d'intérêt sont amplifiés par PCR avec des couples d'amorces spécifiques permettant d'intégrer les sites de restriction adéquates *KpnI* et *NdeI* (**Tableaux 11 et 12**) dans les conditions suivantes : après une étape de dénaturation initiale pendant 5 min à 94°C 40 cycles d'amplification sont effectués (1 min à 94°C, 1 min à 50°C et 3 min à 68°C). Enfin, une étape d'extension finale est réalisée pendant 10 min à 72°C. Les produits d'amplification sont ensuite purifiés et digérés par les enzymes *KpnI* et *NdeI*. Le plasmide initial pBSneo-AP65 contenant le gène codant l'adhésine AP65 nous a été fourni par le Pr. Alderete (Université du Texas).

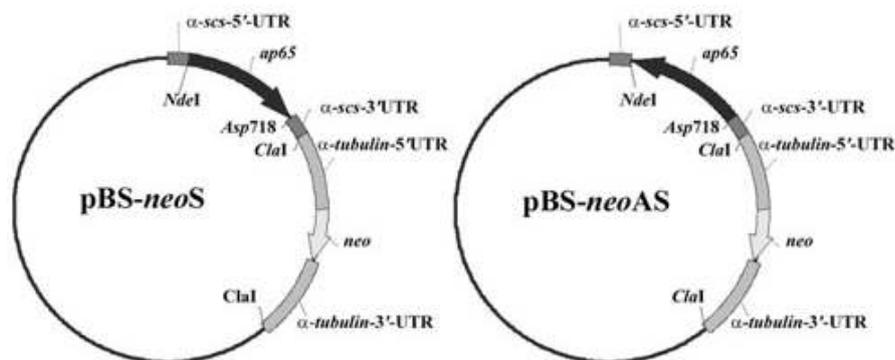


Figure 37 : Carte du vecteur pBSneo (d'après Mundodi et al., 2004). Le gène d'intérêt (ici celui codant l'AP65) est cloné en sens ou en anti-sens au niveau des sites *NdeI* et *KpnI* (ou *Asp718*). Dans le cas du clonage en sens, le gène est cloné en phase avec celui d'un tag HA. La transcription du gène cloné comme celle du gène de la néomycine/généticine est sous la dépendance des domaines 3' et 5' UTR de l' α -succinyl coA synthétase et de l' β -tubuline.

Nom	amorce sens (5'=>3') <i>NdeI</i>	amorce anti-sens (5'=>3') <i>KpnI</i>
M6 sens	CATTTCTCACTT <u>CATATG</u> AGTGCTAAAAC	CTAAATTTCTTTTT <u>CAGGTACCA</u> ACCAAGTTG
M9 sens	CAAGTGATCGCAACC <u>CATATG</u> GGAAGC	GCATTGAACAAAAAATATTT <u>CAGGTACCT</u> AAGAAAC

Tableau 11 : Liste des amorces incluant les sites de restriction *NdeI* et *KpnI* (soulignés), utilisées pour l'amplification et le clonage en sens des gènes codant les métacaspases M6 et M9 dans le vecteur pBSneo.

Nom	amorce sens (5'=>3') <i>KpnI</i>	amorce anti-sens (5'=>3') <i>NdeI</i>
M6 anti-sens	CATTTCTCACTT <u>GGTACC</u> ATGAGTGCTAAAAC	CTAAATTTCTTTTT <u>CACATATG</u> AACCAAGTTG
M9 anti-sens	CAAGTGATCGCAACC <u>AGGTACC</u> ATGGAAGC	GCATTGAACAAAAAATATTT <u>CACATATG</u> TAAGAAAC

Tableau 12 : Liste des amorces incluant les sites de restriction *NdeI* et *KpnI* (soulignés), utilisées pour l'amplification et le clonage en anti-sens des gènes codant les métacaspases M6 et M9 dans le vecteur pBSneo.

Nom	amorce sens (5'=>3')	amorce anti-sens (5'=>3')
pBSneo	CCATCTTGTTCAATCATCGTCCCGTCTCAAGGCAGTAG	CTACTGCCTTGAGCACGGGACGATGATTGAACAAGATGG

Tableau 13 : Amorces sens et anti-sens utilisées pour la mutagenèse dirigée de la boîte néomycine du vecteur pBSneo.

Le gène AP65 a d'abord été retiré de la construction initiale pBSneo-AP65 par digestion enzymatique par *KpnI* et *NdeI* et remplacé par clonage avec l'enzyme T4 DNA ligase (Invitrogen) par les amplifias M6S, M6AS, M9S ou M9AS obtenus ci-dessus. Au préalable, nous avons réalisé une mutagenèse dirigée au niveau de la cassette de résistance à la néomicine/généticine du pBSneo (**Tableau 13**) en utilisant le kit QuickChange Site-directed Mutagenesis (Stratagene) selon les recommandations du fabricant. Ceci a permis d'éliminer un site de restriction *KpnI* qui rendait nos clonages plus délicats. Des bactéries compétentes *E. coli* TOP 10 sont transformées par choc thermique avec les constructions M6S, M6AS, M9S et M9AS. Les préparations de ces ADN plasmidiques pour la vérification par séquençage des constructions et la transfection des parasites sont réalisées avec le kit Maxi prep columns (Qiagen).

XI-2- Transfection et sélection des parasites

La transfection de parasites en phase logarithmique de croissance est réalisée par électroporation (Tsai et al., 2002) à 350 volts et 950 microfarads de capacitance en utilisant l'appareil Genepulser Xcell (Biorad). Environ 4.10^7 parasites sont centrifugés à 1800 rpm à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 400 µl de milieu TYM avant d'être transféré dans une cuve de 4 mm (Biorad). Environ 25 µg d'ADN plasmidique sont ajoutés pour chaque transfection dans la cuvette et le tout est incubé 15 min dans la glace. Les cellules sont ensuite reprises dans 50 ml de milieu TYM et incubées à 37°C pendant 4 h. La généticine (MP biomedical) est ensuite ajoutée au milieu à une concentration finale de 200 µg/ml et les cellules sont incubées 24 h à 37°C. Les repiquages des cellules transfectées ont lieu toutes les 48 h dans du milieu avec généticine.

XI-3- Immunoblotting à partir des lysats de parasite

2.10^6 parasites transfectés avec PBSneo-M6 ou M9 sens sont lysés dans de l'eau puis les lysats sont déposés sur gel SDS-PAGE 12%. Après séparation sur gel, les protéines totales sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est incubée avec un anticorps primaire monoclonal de souris anti-HA (Invitrogen) à une dilution de 1:2000ème, puis avec un anticorps secondaire de lapin anti-souris couplé à la peroxydase à une dilution de 1:5000ème (ABCys). L'activité peroxydase est révélée comme décrit précédemment (Par. VII).

XI-4- Induction de la mort cellulaire des cellules transfectées

3.10^6 parasites transfectés avec les constructions S et AS ou non transfectés (contrôles) sont incubés avec la ménadione (Sigma), une drogue cytotoxique induisant la production d'anions superoxyde, à une concentration finale de 0,5 µM dans 4 ml de milieu TYM pendant 2,

4 et 6 h. A chaque temps, les parasites sont récupérés et centrifugés à 2800 tr/min. Les culots sont repris dans 100 µl de PBS. Une dilution au demi est réalisée pour chaque échantillon avec du bleu trypan à 4% (Sigma). Les cellules mortes et vivantes sont comptées sur cellules de Thoma à raison de 250 cellules au total par échantillon. L'expérience depuis l'induction de la mort jusqu'au comptage a été réalisée 3 fois.

I-1- Introduction

Comme indiqué précédemment, quatre espèces de trichomonadines sont majoritairement retrouvées chez l'humain : *Trichomonas vaginalis*, dans le tractus uro-génital; *Trichomonas tenax*, que l'on retrouve dans la cavité buccale ; *Pentatrichomonas hominis*, dans le gros intestin et *Dientamoeba fragilis* dans le côlon. Parmi elles, seules *T. vaginalis* et *D. fragilis* sont considérées comme pathogènes même si la virulence de *P. hominis* reste encore incertaine.

Jusqu'à ces dernières années, ces espèces étaient généralement considérées comme sites-spécifiques même si quelques études faisaient état de trichomonadines retrouvées principalement dans les poumons (Honigberg, 1990). Récemment, plusieurs travaux de notre équipe ont montré la fréquence importante des trichomonadines dans l'appareil respiratoire de patients atteints de différentes pathologies pulmonaires (pour revue voir Duboucher et al., 2008). Cependant, leur identification morphologique reste difficile puisque ces protozoaires ont la particularité de prendre souvent une forme amiboïde avec une plasticité exagérée les rendant méconnaissables.

Les séquences des gènes codant pour l'ARNr 18S comme pour le domaine ITS1-ARNr 5,8S-ITS2 sont disponibles dans les bases de données, pour chacune des espèces de trichomonadines retrouvées chez l'humain. Ces molécules sont donc des outils précieux pour l'identification moléculaire au niveau de l'espèce, de ces protistes dans des localisations parfois inhabituelles. En collaboration avec le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, nous avons ainsi cherché à identifier par des approches moléculaires les trichomonadines présentes i) dans les poumons d'un patient atteint d'un empyème pleural et ii) dans les selles de deux patients présentant des symptômes gastro-intestinaux.

I-2- Résultats

Article 1

Mantini C, Souppart L, Noël C, Duong TH, Mornet M, Carroger G, Dupont P, Masseret E, Goustille J, Capron M, Duboucher C, Dei-Cas E and Viscogliosi E.

Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in a patient with empyema.

Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47: 2336-2339.

Article 2

Meloni D, Mantini C, Goustille J, Desoubieux G, Maakaroun-Vermesse Z, Chandener J, Gantois N, Duboucher C, Fiori PL, Dei-Cas E, Duong TH and Viscogliosi E.

Molecular identification of *Pentatrichomonas hominis* in patients with gastrointestinal symptoms.

Journal of Clinical Microbiology, 2010, soumis.

I-3- Conclusions

Dans l'article 1, nous avons par des techniques moléculaires, détecté la présence de *Tetratrichomonas* sp. dans les poumons d'un patient atteint d'empyème pulmonaire. De plus, d'après notre analyse phylogénétique, cet isolat correspond à une nouvelle espèce qui n'a pour l'instant été trouvée que chez l'homme. Cette observation pose aussi la question du potentiel zoonotique des trichomonadines. Cette étude avait donc pour but de poursuivre la sensibilisation des professionnels de santé sur l'importance de ces microorganismes qui peuvent avoir des localisations inhabituelles. Il est clair que ce cas, comme ceux qui pourraient être reportés dans l'avenir, permettront de mieux définir l'incidence, la pathogénicité et les mécanismes d'invasion de ces microorganismes tout comme leurs liens possibles avec d'autres pathologies.

Dans l'article 2, nous avons identifié *P. hominis* chez deux patients ayant des douleurs intestinales et des diarrhées. Se posait alors principalement la question du pouvoir pathogène de ce parasite. D'après notre étude et le peu de données disponibles dans la littérature, il est clair que *P. hominis* peut être pathogène surtout chez les enfants. D'autre part, nous avons montré que *P. hominis* était capable de survivre pour de longues périodes sous forme de pseudokystes dans l'eau distillée (culture de selles) ce qui témoigne du fort potentiel de transmission de ce parasite par de l'eau contaminée. De plus, ce parasite est aujourd'hui considéré comme pathogène chez les chiens et les chats (Kim et al., 2010). Il est de plus assez fréquemment retrouvé chez ces animaux tout comme d'ailleurs chez les bovins et nos données moléculaires indiquent que l'on a à faire à la même espèce. On peut alors s'interroger sur l'origine « humaine » de ce microorganisme et/ou sur son potentiel zoonotique.

II-1- Introduction

Du fait du nombre important de séquences du gène de l'ARNr 18S disponibles dans les bases de données pour les Parabasalia, on peut donc utiliser cette molécule pour identifier les trichomonadines présentes chez l'homme comme chez l'animal. Chez les bovins, *Tritrichomonas foetus* est l'espèce la plus fréquente et l'agent responsable de la trichomonose bovine. Cette parasitose a des conséquences économiques importantes puisque responsable de nombreux avortements (BonDurant, 1997). La transmission se faisant par voie sexuelle, le diagnostic de cette parasite se fait par analyse d'un lavage de la cavité préputiale des taureaux. Cependant, d'autres trichomonadines isolées de cette même cavité et similaires à *T. foetus* par leurs formes et leurs tailles peuvent fausser le diagnostic qui se fait généralement par observation microscopique. Il est donc nécessaire de pouvoir identifier par des outils moléculaires toutes les trichomonadines pouvant être potentiellement présentes dans cet environnement. Nous avons donc identifié par séquençage du gène de l'ARNr 18S 12 isolats de trichomonadines ayant une morphologie similaire à celle de *T. foetus* et provenant de la cavité préputiale de 12 taureaux.

Le même type de problématique a été abordé chez les volailles. En effet, *Histomonas meleagridis* est capable de parasiter de nombreux groupes d'oiseaux et fait des ravages dans les élevages de volailles. Il est en effet l'agent responsable de l'histomonose ou « blackhead disease ». Cependant, là encore, le diagnostic peut être faussé par la présence d'autres espèces de trichomonadines préalablement identifiées par génotypage (Van der Heijden et al., 2006). Ce génotypage a permis l'identification de 3 génotypes (types I, II et III) sans que l'on sache à quelle espèce de trichomonadine correspond chacun de ces génotypes. Nous avons donc caractérisé par séquençage du gène de l'ARNr 18S chacun de ces 3 génotypes.

II-2- Résultats

Article 3

Dufernez F, Walker RL, Noël C, Caby S, Mantini C, Delgado-Viscogliosi E, Ohkuma M, Kudo T, Capron M, Pierce RJ, Villanueva MR and Viscogliosi E.

Morphological and molecular identification of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad protozoa from the bovine preputial cavity.

Journal of Eukaryotic Microbiology, 2007, 54: 161-168.

Article 4

Mantini C, Dalia-Cornette J, Noda S, Van der Heijden HMJF, Capron M, Dei-Cas E, Landman WJM, Ohkuma M and Viscogliosi E.

Molecular identification and phylogenetic relationships of trichomonad isolates of galliform birds inferred from nuclear small subunit rRNA gene sequences.

Parasitology Research, 2009, 106: 163-170.

II-3- Conclusions

Dans l'article 3, nous avons identifié par séquençage du gène de l'ARNr 18S 12 isolats de trichomonadines prélevés dans la cavité préputiale de taureaux. Sept d'entre eux correspondent à *Tetratrichomonas* sp. Dans notre analyse phylogénétique, les 7 séquences correspondantes sont séparées en deux groupes, chacun de ces groupes pouvant correspondre à une espèce suggérant ainsi qu'au moins deux espèces de *Tetratrichomonas* peuvent être présentes dans la cavité préputiale. Quatre autres isolats ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *Pentatrichomonas hominis*. Ces deux premiers genres ne colonisent très probablement que secondairement la cavité préputiale et leur provenance ou origine doivent être recherchées dans le tube digestif de leur hôte. Enfin le dernier isolat a été identifié comme appartenant au genre *Honigbergiella*, une trichomonadine libre. En parallèle, à des fins de diagnostique, nous avons testé un couple d'amorces désignées TFR3 et TFR4 par Felleisen et al. (1998) et sensées n'amplifier que l'ADN de *T. fetus*. Il s'avère que ce couple d'amorces n'amplifie pas les autres trichomonadines potentiellement présentes.

Dans l'article 4, nous avons pu identifier les 3 génotypes préalablement caractérisés par Van der Heijden et al. (2006). Les génotypes I et II correspondent à *H. meleagridis* ce qui est en accord avec les observations microscopiques des isolats correspondants. Par contre, le génotype III correspond à des cellules beaucoup plus larges en taille que celles de *Histomonas* et a été identifié comme étant *Parahistomonas wenrichii* dont l'existence n'avait été proposée que sur la base de quelques observations préalables. En outre, du fait de ses forts liens de parenté avec plusieurs trichomonadines pathogènes (*Histomonas*, *Dientamoeba*, *Tritrichomonas*), il est très probable que *Parahistomonas* ait perdu secondairement son caractère pathogène.

III-1- Introduction

La molécule d'ARNr 18S est couramment utilisée dans la construction de phylogénies moléculaires des Parabasalia. Celles récemment publiées et englobant un échantillonnage d'espèces important sont globalement en conflit avec la systématique classique basée sur les données morphologiques d'où les différents essais de refonte de la systématique de ce groupe. Le dernier essai en date est celui de Adl et al. (2005) qui propose une classification des Parabasalia en 4 ordres. Cependant, il était difficile de pouvoir se fixer sur une taxonomie durable de ce groupe de protistes du fait du nombre encore assez important de taxons restant à intégrer dans ces analyses et de l'utilisation d'un seul indicateur moléculaire. Aussi nous avons cherché à augmenter le nombre de taxons analysés en se focalisant surtout sur l'ordre des Cristamonadida et à reconstruire des phylogénies basées sur plusieurs indicateurs moléculaires à des fins de comparaison.

III-2- Résultats

Article 5

Noël C, Noda S, Mantini C, Dolan MF, Moriya S, Delgado-Viscogliosi P, Kudo T, Capron M, Pierce RJ, Ohkuma M and Viscogliosi E.

Molecular phylogenetic position of the genera *Stephanonympha* and *Caduceia* (Parabasalia) inferred from nuclear small subunit rRNA gene sequences.

Journal of Eukaryotic Microbiology, 2007, 54: 93-99.

Article 6

Noda S, Mantini C, Bordereau C, Kitade O, Dolan MF, Viscogliosi E, and Ohkuma M.

Molecular phylogeny of parabasalids with emphasis on the order Cristamonadida and its complex morphological evolution.

Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 52: 217-224.

Article 7

Noda S, Mantini C, Inoue JI, Kitade O, Viscogliosi E, and Ohkuma M.

Molecular phylogeny and evolution of Parabasalia with new protein markers and improved taxon sampling.

Version préliminaire, en rédaction.

III-3- Conclusions

Dans les articles 5 et 6, nous avons obtenu les séquences d'ARNr 18S de nombreux genres appartenant d'après Adl et al. (2005) à l'ordre des Cristamonadida et intégré ces séquences dans de larges phylogénies des Parabasalia. Comme dans les arbres des articles 3 et 4, nous confirmons d'abord la monophylie des Cristamonadida. Cet ordre très hétérogène englobe les trichomonadines appartenant aux familles des Calonymphidae et Devescovichidae et les hypermastigines appartenant au groupe des Lophomonadida. Le regroupement initial par Brugerolle et Patterson (2001) de la plupart de ces taxons sur la base de données morphologiques comme la présence d'une cresta et des 4 cinétosomes privilégiés auxquels s'ajoutent pour les Lophomonadida des centaines ou milliers de flagelles supplémentaires se trouve donc clairement confirmé par les données moléculaires. Au sein de cet ordre, nous avons en particulier mis en évidence la polyphylie des Calonymphidae et Devescovichidae. Si nous comparons globalement nos arbres à la classification de Adl et al. (2005), il est clair que la création des Cristamonadida a entraîné la polyphylie ou paraphylie des Trichomonadida. Par contre, nos données supportent la création des deux autres ordres Trichonymphida et Spirotrichonymphida indiquant que les hypermastigines sont séparées en trois grands groupes distincts.

Les contradictions observées ci-dessus avec la classification de Adl et al. (2005) pouvaient être levées en particulier par l'utilisation d'autres indicateurs moléculaires. Ce fut notre démarche dans l'article 6 par l'utilisation de la GAPDH comme marqueur. Il est intéressant de noter que la phylogénie présentée pour la GAPDH est très similaire à celle basée sur la comparaison des séquences de l'ARNr 18S et confirme globalement la monophylie des Cristamonadida, la polyphylie des Calonymphidae, Devescovichidae, Trichomonadida et hypermastigines.

Dans l'article 7, nous avons d'abord complété cette phylogénie basée sur la GAPDH par l'addition d'autres taxons et nous confirmons les résultats obtenus précédemment. En parallèle, les trois ordres Cristamonadida, Spirotrichonymphida et Trichonymphida sont bien retrouvés sur la base de deux autres indicateurs comme l'actine et l'EF-1a. Par contre, comme pour l'ARNr 18S et la GAPDH, les Trichomonadida forment un groupe poly ou paraphylétique. Ceci est confirmé sur l'arbre basé sur la concaténation des séquences de ces 4 indicateurs.

IV-1- Recherche *in silico* de protéines potentiellement impliquées dans la mort cellulaire chez *Trichomonas vaginalis*

A ce jour, aucune protéine intervenant dans la mort cellulaire chez *T. vaginalis* n'avait été identifiée. En utilisant les séquences de protéines connues comme étant impliquées dans l'apoptose chez différents organismes, nous avons recherché des protéines homologues par BLAST dans le programme de séquençage du génome de ce parasite. En particulier, nous n'avons trouvé aucune protéine apparentée aux protéines mitochondriales connues comme intervenant dans l'apoptose telles que AIF, XIAP, HtrA2/Omi, SMAC/diablo, Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-Xl, Bid...Cependant, nous avons pu identifier 11 séquences protéiques potentiellement intéressantes qui s'avèrent être des protéines homologues aux métacaspases (MCAs) (**Tableau 5**).

IV-2- Analyse des séquences protéiques des métacaspases de *Trichomonas vaginalis*

Les séquences complètes de ces métacaspases ont été alignées entre elles et cet alignement est présenté **Figure 38**. Ces séquences protéiques sont composées de 241 à 290 acides aminés et montrent entre elles, dans leur région commune (231 positions comparées), des pourcentages d'identité compris entre 34,6 et 99,5%. Leurs poids moléculaires théoriques sont compris entre 27,4 et 33 kDa (calculés avec le programme ProtParam : <http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam>). Sur la base de cet alignement, on peut subdiviser ces 11 séquences protéiques en deux groupes. Le premier est composé des protéines M8 et M9 qui toutes deux présentent une extension amino-terminale d'un peu plus d'une quarantaine d'acides aminés. Cette extension est absente dans le second groupe composé des protéines M1 à M7 et M10 et M11. L'analyse de ces deux extensions amino-terminales ne révèle pas la présence de domaines d'interaction protéine-protéine tels que CARD et DED retrouvés dans les extensions amino-terminales des caspases initiateuses des métazoaires et de la MCA PfMCA1 de *P. falciparum* (Meslin et al., 2007). D'autre part, les extensions des protéines M8 et M9 ne présentent pas non plus les motifs ML(S/T/A)X_(1...15)R(N/F/E/XF), MSLX_(1...15)R(N/F/XF) ou MLR(S/N)F correspondant aux préséquences nécessaires à la translocation des protéines dans les hydrogénomosomes (Carlton et al., 2007). Cependant, *via* le serveur SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), nous avons identifié un peptide signal dans ces extensions amino-terminales dont les sites de coupure se situent entre les résidus 28 et 29 (GL/NF) pour M9 et entre 23 et 24 (MS/KL) pour M8. En outre, ces extensions ne sont pas riches en résidus proline ou glutamine, et elles ne présentent pas non plus de structure en doigt de zinc comme c'est le cas pour les MCAs de type I de *A. thaliana* (Vercammen et al., 2004). On note de plus deux insertion/délétion de plusieurs résidus qui renforcent cette séparation des MCAs de *T. vaginalis* en deux groupes.

Toutes ces séquences de MCAs présentent deux domaines majeurs : une région amino-terminale d'environ 150 acides aminés qui pourrait correspondre à la sous-unité p20 des caspases de métazoaires et une région carboxy-terminale de 70 à 80 résidus qui pourrait être l'équivalent du domaine p10 des caspases. Entre ces deux domaines, on peut délimiter une région de 10 à 15 résidus très variable entre les deux groupes de MCAs de *T. vaginalis*. En plus de probables homologues au niveau structural, la désignation des MCAs comme homologues des caspases de métazoaires est basée sur la présence du domaine catalytique peptidase C14 et de la dyade histidine-cystéine du site catalytique présente au niveau du domaine putatif p20. L'analyse des séquences des MCAs de *T. vaginalis* par le programme CDD révèle sans ambiguïté la présence de ce domaine peptidase C14 pour chacune des protéines analysées. D'autre part, sur notre alignement, on retrouve la dyade histidine-cystéine caractéristique des caspases pour chaque MCA de ce parasite en positions 99 et 151 (position des résidus déterminée d'après la séquence de la MCA M4).

IV-3- Phylogénie des métacaspases de *Trichomonas vaginalis*

Une analyse phylogénétique a été réalisée englobant la plupart des séquences de MCAs disponibles dans les bases de données ainsi que les 11 séquences de MCAs identifiées chez *T. vaginalis*. Les regroupements indiqués sur la **Figure 39** sont ceux proposés par Kosec et al. (2006). Ces protéases sont classées comme type I ou type II selon la présence d'un prodomaine ou d'une insertion entre les sous-unités p20 et p10 de ces protéines (Uren et al., 2000). Dans notre analyse, nous retrouvons certains de ces regroupements. C'est le cas des deux clades englobant les séquences de MCAs des Trypanosomatidae. Il en est de même pour les MCAs de type II de plantes. Par contre, le groupe des MCAs de type I de plantes et champignons n'est pas monophylétique et sa composition semble beaucoup plus complexe vu les positions des séquences de *Plasmodium* et *Acanthamoeba*. En ce qui concerne les séquences identifiées chez *T. vaginalis*, elles forment un groupe monophylétique dont l'émergence est supportée par une valeur de BPP maximale de 100%. Ce groupe est d'ailleurs très éloigné des autres groupes de MCAs déjà identifiés. On note, au sein de ce groupe, une séparation des MCAs en 3 sous-groupes : 1) M2, M4 et M10, 2) M1, M3, M5, M6, M7 et M11 et 3) M8 et M9. Les deux premiers sous-groupes sont constitués de MCAs sans extension amino-terminale (aussi appelées MCAs courtes) alors que le 3ème sous-groupe ne comprend que les deux MCAs ayant une extension amino-terminale (aussi appelées MCAs longues). Il est très probable que tous les gènes correspondants aient une même origine et que l'existence de cette famille multigénique soit liée à des duplications successives. Au regard des pourcentages d'identité observés entre certaines MCAs de *T. vaginalis*, on peut aussi suggérer que plusieurs de ces duplications soient

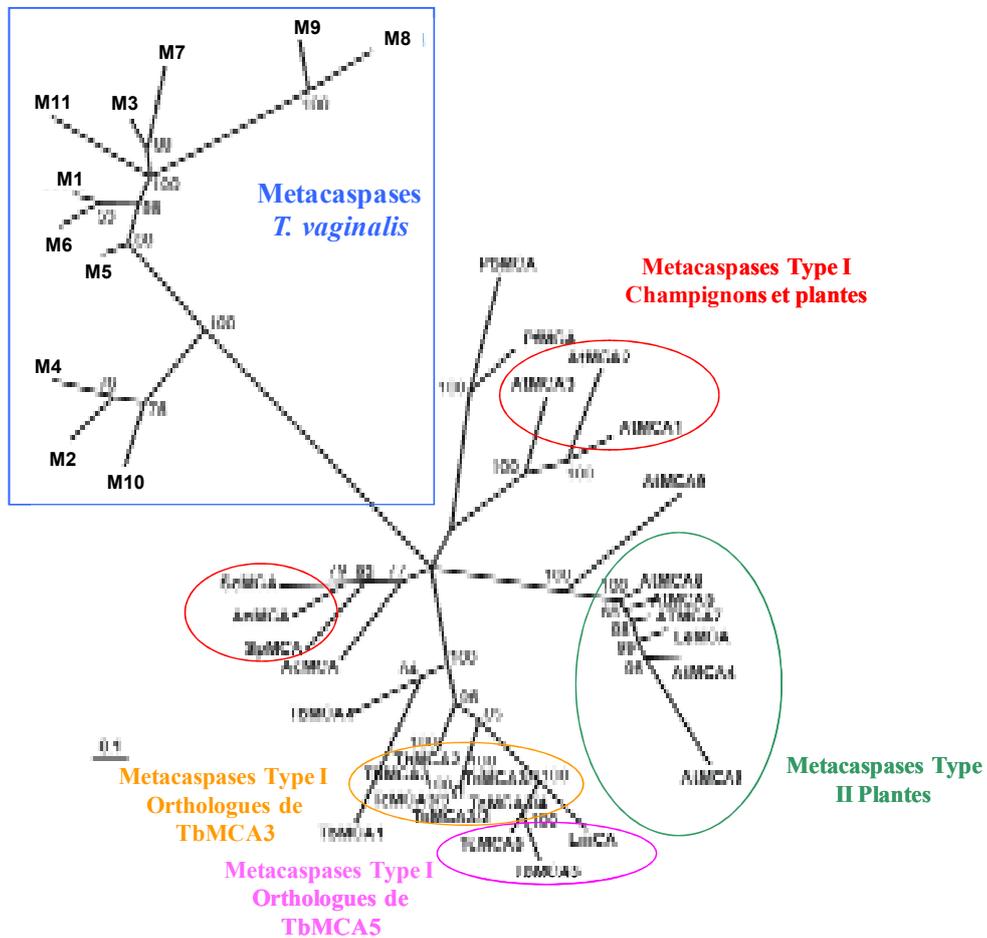


Figure 39 : Analyse phylogénétique des 11 métacaspases de *Trichomonas vaginalis*.
 Abréviations : MCA : métacaspase ; Pf : *Plasmodium falciparum* ; At : *Arabidopsis thaliana* ;
 Lm : *Leishmania major* ; Tb : *Trypanosoma brucei* ; Tc : *Trypanosoma cruzi* ; Le : *Lycopersicon
 esculentum* ; Ac : *Acanthamoeba castellanii* ; Sp : *Saccharomyces pombe* ; Sc : *Saccharomyces
 cerevisiae* ; An : *Aspergillus nidulans*.

très précoces au cours de l'évolution. De plus, il est intéressant de constater que les MCAs courtes sont ancestrales au sein de ce groupe suggérant que l'extension amino-terminale présente pour les MCAs longues n'est apparue que très tardivement selon un mécanisme qui reste encore à définir.

IV-4- Cinétique de la mort cellulaire induite par la staurosporine chez *Trichomonas vaginalis*

Pour réaliser cette cinétique, les parasites ont été incubés à 37°C en présence (5 µM final) ou non de STS (contrôle) et observés après 3 h, 5 h, 7 h, 9 h et 11 h de contact avec la drogue. En parallèle, des marquages de ces deux populations ont été réalisés et analysés par cytométrie en flux.

IV-4-1- Observation microscopique directe des parasites traités

Les modifications morphologiques au sein de la population cellulaire traitée par rapport à la population contrôle apparaissent progressivement et deviennent clairement visibles après 7 h de contact avec la drogue. Sur la **Figure 40A**, après 7 h en culture, les parasites non traités par la STS ont pour la plupart une forme pyriforme classique et sont très mobiles. Certains ont une forme amiboïde qui est probablement la conséquence de leur adhésion au plastique au fond des puits. Après 7 h de contact avec la STS, on voit que les cellules traitées ont tendance à se regrouper pour former de gros amas cellulaires (**Figure 40B**). Nous observons également un changement important au niveau de la forme des cellules par rapport aux cellules contrôles. En effet, elles ont une forme arrondie avec une taille plus ou moins importante et présentent des vacuoles cytoplasmiques. De plus, ces cellules n'ont pas de flagelles visibles et ont perdu leur mobilité. On note aussi la présence de corps apoptotiques.

IV-4-2- Analyse des cellules traitées par cytométrie en flux

IV-4-2-1- Marquage à l'annexine V / iodure de propidium

Avant de passer aux résultats de notre étude, il est important de signaler qu'il a été depuis longtemps démontré que dans les cellules en début d'apoptose, les phosphatidylsérines (PS), phospholipides membranaires normalement présents sur le feuillet interne de la membrane plasmique, subissent une translocation sur le feuillet externe. L'annexine V, une protéine ayant une haute affinité pour les PS, peut ainsi, en étant couplée à un fluorochrome comme le FITC, marquer les cellules en apoptose. Ce marquage à l'annexine V-FITC précède la perte d'intégrité membranaire qui accompagne les stades tardifs de la mort cellulaire résultant soit d'un processus apoptotique soit d'un processus nécrotique.

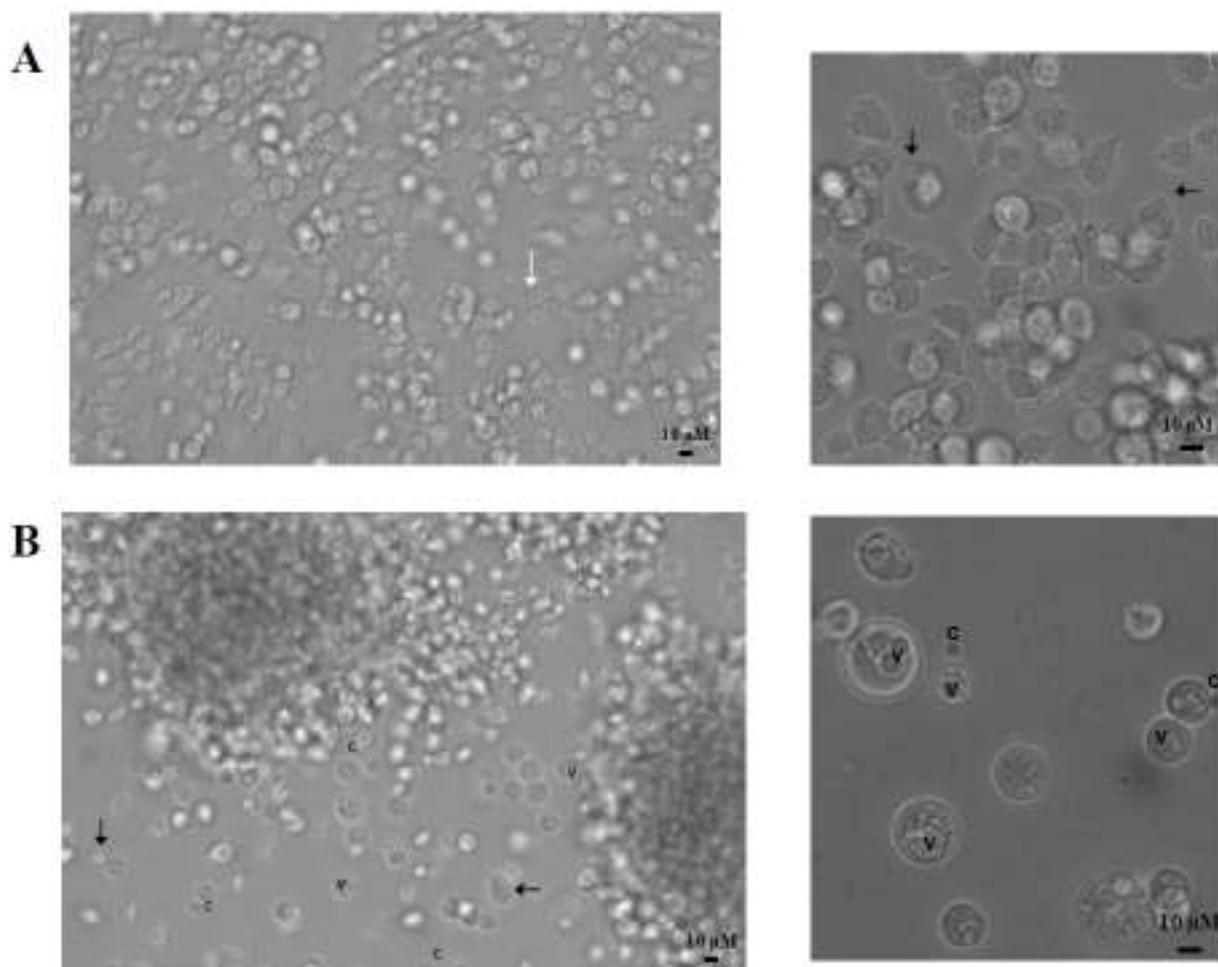


Figure 40: Observation microscopique directe des cellules de *Trichomonas vaginalis* traitées (A) et non traitées (B) à la staurosporine après 7 h d'incubation. **A.** Cellules contrôles. La flèche blanche indique une cellule en cours de division. Les flèches noires indiquent des cellules amiboïdes présentant des flagelles. **B.** Cellules traitées à la STS. Les flèches noires indiquent des cellules ayant conservé une forme pyriforme avec flagelles. Un grand nombre de cellules sont arrondies et présentent des vacuoles. Abréviations : V : vacuole ; C : corps apoptotique.

En utilisant un colorant vital comme l'iodure de propidium (IP), on peut identifier les cellules en apoptose, et plus précisément les cellules en fin d'apoptose. Les cellules viables ayant leur membrane plasmique intacte excluent l'IP tandis que les cellules mortes ou endommagées sont perméables à l'IP. Ainsi, les cellules sont considérées comme viables si elles sont non marquées (cadran 1, **Figure 41D**). Les cellules en début d'apoptose sont seulement marquées positivement à l'annexine V-FITC (cadran 2, **Figure 41D**) et les cellules qui sont en fin d'apoptose ou déjà mortes (nécrose ou apoptose) sont doublement positives aux marquages à l'annexine V-FITC et à l'IP (cadran 3, **Figure 41D**).

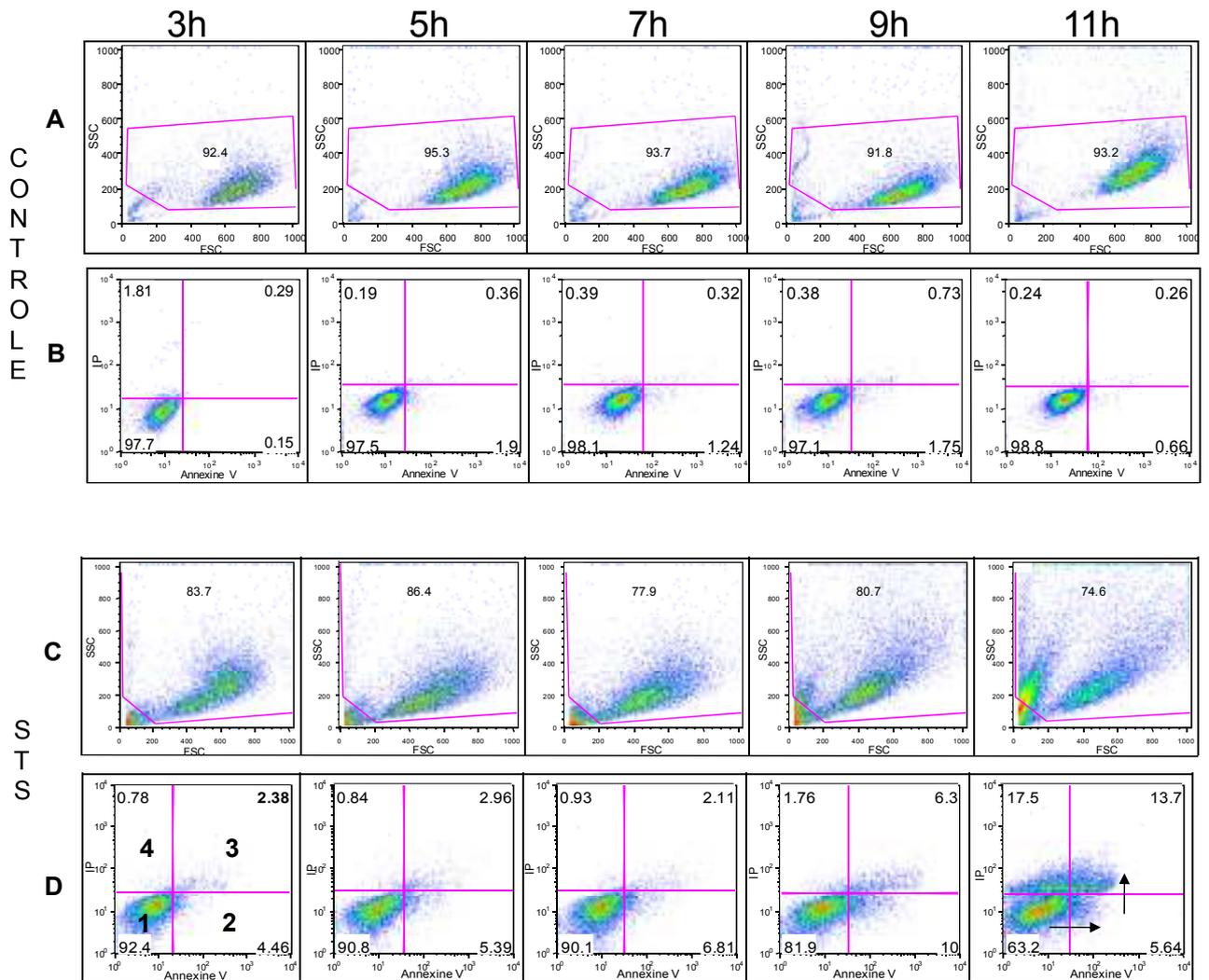


Figure 41: Cinétique des cellules de *Trichomonas vaginalis* mises en contact avec la staurosporine (STS). Une même population cellulaire n'est pas mise en contact avec la drogue (contrôle). Après différents temps d'incubation (3 h, 5 h, 7 h, 9 h et 11 h), les cellules sont marquées avec de l'annexine V-FITC et de l'iodure de propidium (IP) et analysées par cytométrie en flux. **A** et **C** montrent les caractéristiques FSC et SSC des cellules contrôles et traitées par la STS. **B** et **D** montrent les marquages annexine V et IP des cellules contrôles et traitées par la STS. Cadran 1 : cellules viables notées Annexine V- et IP - ; Cadran 2 : cellules en début d'apoptose notées Annexine V + et IP - ; Cadran 3 : cellules en fin d'apoptose ou de nécrose ou déjà mortes notées Annexine V+ et IP + ; 4 : statut cellulaire non défini. Les résultats sont présentés en pourcentage de la population globale. Abréviations : FSC : Forward scatter faisant référence à la taille et au volume des cellules ; SSC : Side scatter faisant référence à la granularité des cellules (contenu cytoplasmique : forme du noyau, rugosité cytoplasmique...).

Dans notre étude, les cellules de *T. vaginalis* traitées par la STS ont des tailles (FSC) et des contenus cytoplasmiques (SSC) différents de celles de la population contrôle (**Figures 41A et C**). Au cours du temps, la population traitée devient de plus en plus diffuse et se sépare en deux sous-populations à partir de 9 h d'incubation (**Figure 41C**) alors que la population contrôle reste homogène (**Figure 41A**). Ces résultats sont globalement en accord avec l'évolution morphologique des cellules traitées décrite ci-dessus. D'après la **Figure 41D**, nous constatons que la proportion de cellules viables (cadran 1) chute de 30% entre 3 h et 11 h d'incubation avec la drogue (92,4% à 63,2%). Par ailleurs, la proportion de cellules en début d'apoptose (cadran 2, **Figure 41D**) augmente légèrement jusqu'à 9 h d'incubation (de 4,46% à 3 h à 10% à 9 h) puis rechute à 5,64 % à 11 h. D'autre part, le pourcentage de cellules mortes doublement marquées (cadran 3, **Figure 41D**) est multiplié par 7 entre 7 h et 11 h (2,11% à 13,7%). A 11 h d'incubation, on note une forte proportion (17,5%) de cellules uniquement marquées l'IP (**Figure 41D**). Or, le statut de ces cellules n'est pour l'instant pas encore défini dans ce genre d'analyse. Les cellules non traitées à la STS restent quant à elles viables (cadran 1, **Figure 41B**) tout au long de l'expérience.

IV-4-2-2- Détection de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL

La fragmentation de l'ADN est connue pour être une caractéristique de fin d'apoptose. Pour visualiser ce phénomène, la méthode TUNEL est couramment utilisée. Les analyses portant sur les mêmes populations cellulaires que celles décrites précédemment sont réalisées par cytométrie en flux. Nos résultats montrent d'abord une augmentation significative du pourcentage de cellules présentant une fragmentation au niveau de l'ADN (marquées positivement par la méthode TUNEL) au cours du temps (de 3,2% à 3 h à 22,6 % à 11 h) (**Figure 42A**). Ce pourcentage reste quant à lui très faible pour la population contrôle (de 3,03 % à 2,02 % à 11 h ; résultats non montrés). Ces mêmes cellules traitées à la STS ont été observées au microscope à fluorescence (**Figure 42B**). Les noyaux marqués par la méthode TUNEL présentent une fluorescence verte intense. Dans certains cas, le noyau apparaît divisé en plusieurs masses individuelles très denses par marquage au DAPI témoignant de sa fragmentation (**Figure 42B**).

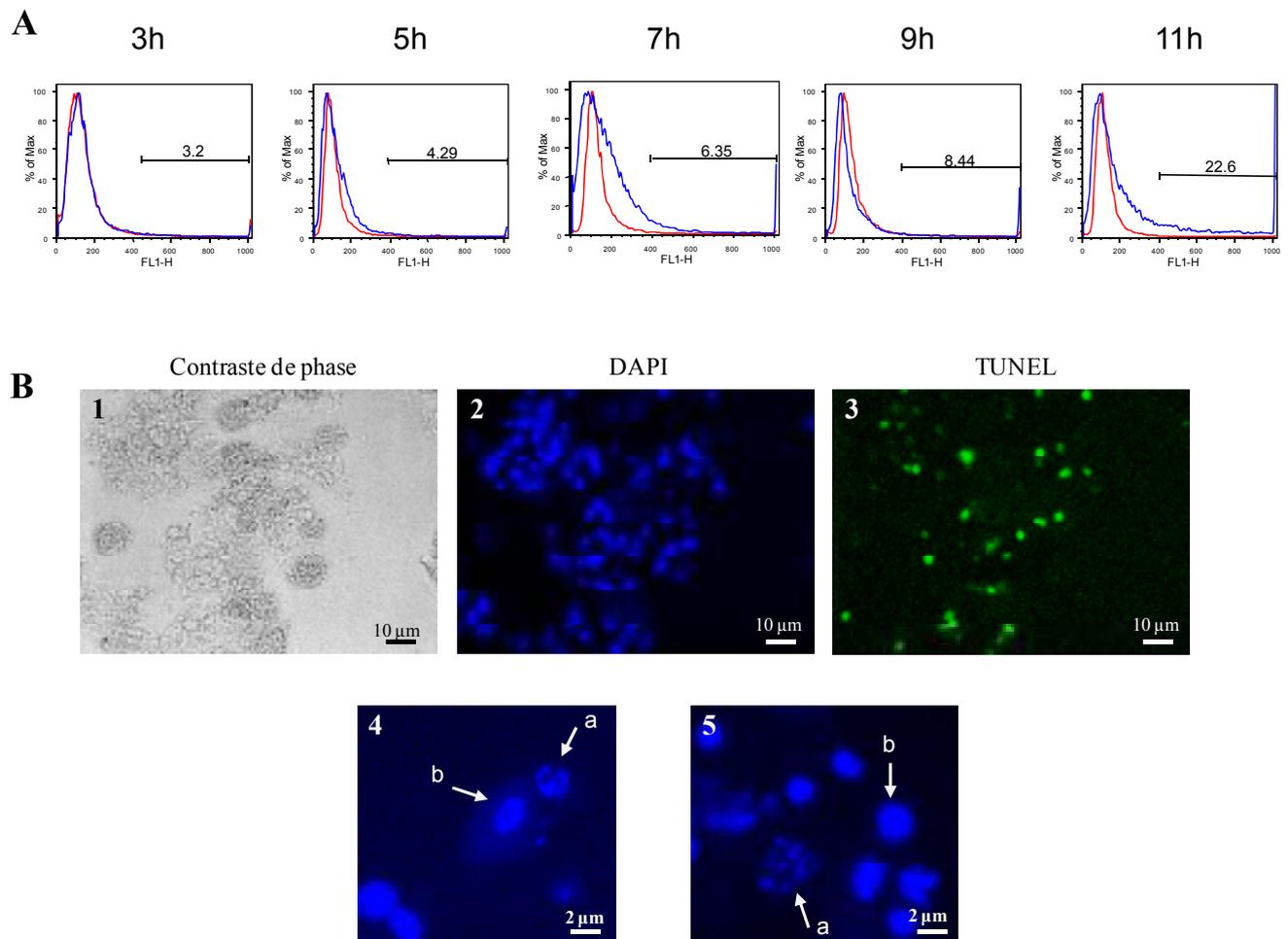


Figure 42 : Marquage TUNEL des cellules de *Trichomonas vaginalis* traitées ou non à la staurosporine. **A.** Analyse par cytométrie en flux des cellules traitées à la STS (en bleu) et non traitées (en rouge) après différent temps d'incubation. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules TUNEL positives. **B.** Cellules traitées à la STS après 9 h d'incubation. La photo 1 montre les cellules en contraste de phase; les photos 2, 4 et 5 montrent le marquage des noyaux au DAPI ; la photo 3 montre les cellules après marquage TUNEL. Les noyaux fragmentés (4a et 5a) se distinguent nettement des noyaux normaux (4b et 5b).

IV-5- Etude de l'expression relative des gènes de métacaspases de *Trichomonas vaginalis* par PCR quantitative après induction de la mort cellulaire par la staurosporine

A partir des mêmes populations cellulaires décrites précédemment, nous avons étudié l'expression relative par PCR quantitative des 11 gènes codant les MCAs de *T. vaginalis* (**Figure 43**). Pour cela les ARN_T ont été extraits à 3 h, 5 h, 7 h, 9 h et 11 h à partir des deux populations de parasites (traitée et contrôle). Ces ARN_T ont été mixés en même quantité pour chacune des deux populations avant synthèse des ADNc correspondants.

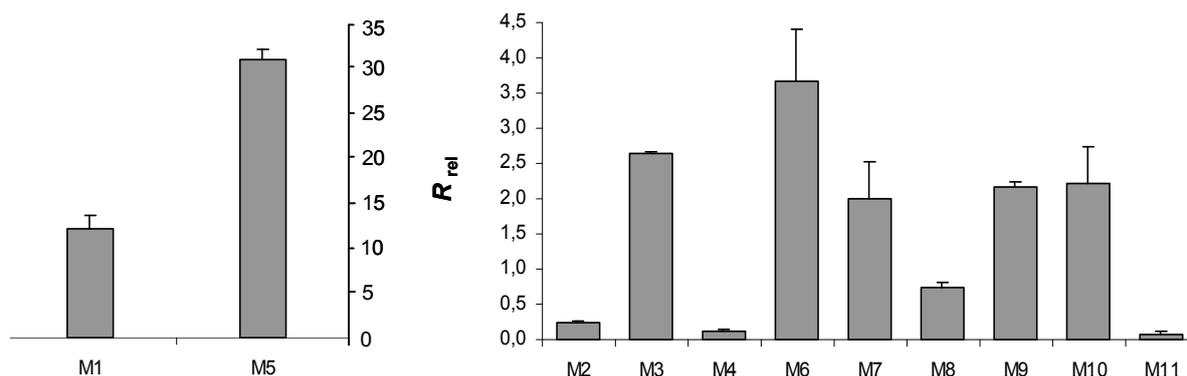


Figure 43 : Etude de l'expression relative (R_{rel}) des gènes codant les 11 métacaspases de *Trichomonas vaginalis* notés M1 à M11 (gènes cibles). Les résultats sont présentés en expression relative (R_{rel}). L'expression relative d'un gène cible correspond à la différence d'expression de ce gène entre l'échantillon (conditions d'apoptose, traité à la STS) et le contrôle (conditions normales) divisé par la différence d'expression du gène de référence (actine) entre l'échantillon et le contrôle. Significativité : R_{rel} supérieure à 2 et inférieure à 0,5. Les écarts types sont représentés (n=3).

Nous avons donc utilisé 2 mélanges d'ADNc (population traitée et contrôle) qui ont servi de matrice pour ces amplifications réalisées avec 11 couples d'amorces spécifiques de chacun des gènes de MCAs et 1 couple d'amorces spécifiques du gène de l'actine. Les efficacités d'amplification (E) de chaque transcrite de MCA sont comprises entre 1,95 et 2,06 (résultats non montrés). Nous avons calculé l'expression relative de chaque gène de MCA selon la formule $R_{rel} = (E_{cible})^{\Delta C_p \text{ cible (ctl-éch)}} / (E_{actine})^{\Delta C_p \text{ actine (ctl-éch)}}$. Il est à noter qu'avec cette formule la surexpression d'un gène dans une condition 1 par rapport à une condition 2 correspond à un R_{rel} supérieur à 1, et à l'inverse, la sous-expression d'un gène correspond à un R_{rel} inférieur à 1. Cependant, on considère généralement que l'expression d'un gène est significativement augmentée ou diminuée lorsque ce R_{rel} est supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 respectivement. Nous observons que le traitement des cellules à la STS entraîne une augmentation significative de l'expression des 6 gènes codant les MCAs M1, M3, M5, M6, M9 et M10 par rapport à celles de ces mêmes gènes dans un milieu contrôle sans drogue. D'autre part, trois gènes, codant les MCA M2, M4 et M11 sont sous-exprimés lorsque la STS est ajoutée dans le milieu d'incubation. Les autres gènes (M7 et M8) ne montrent pas de modification significative de leur expression relative.

IV-6- Caractérisation biochimique et enzymatique des métacaspases de *Trichomonas vaginalis* produites en système bactérien

Pour l'étude biochimique et enzymatique de ces protéines, nous avons travaillé sur deux représentants des deux catégories de MCAs identifiées chez ce parasite, en l'occurrence les M5 et M6 qui sont des MCAs courtes et les M8 et M9 qui sont des MCAs longues (**Figure 38**). A noter, que nous avons choisi M6 et M5 car, comme indiqué ci-dessus, les gènes codant ces protéines font partie de ceux étant les plus surexprimés après induction de la mort cellulaire par la STS. Ces quatre gènes ont été clonés dans le vecteur d'expression bactérien pGEX-6-P2. Les protéines correspondantes couplées à la GST à leur extrémité amino-terminale ont été produites dans des bactéries *E. coli* BL21/DE3, et purifiées sur billes de glutathion agarose.

IV-6-1- Analyse des profils électrophorétiques des métacaspases purifiées de *Trichomonas vaginalis*

Tout comme les caspases de métazoaires, plusieurs MCAs décrites chez différents organismes ont la particularité de s'auto-cliver lors de leur production en bactéries pour donner des protéases actives. Cet auto-clivage fait intervenir la dyade histidine-cystéine (H-C) de leur site catalytique. Nous avons donc cherché à savoir si les MCAs de *T. vaginalis*, qui possèdent ce même domaine catalytique, sont également capables de s'auto-cliver. Pour cela nous avons analysé par western blot à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-GST, les fractions protéiques purifiées des 4 MCAs de *T. vaginalis*, de leurs mutants (mutations indépendantes des résidus histidine et cystéine du site catalytique par des résidus alanine) et de la GST seule (**Figure 44**). Les fractions protéiques issues de ces mêmes cultures bactériennes mais non induites par l'IPTG ont également été analysées. Dans ce cas, nous n'avons noté la présence d'aucune protéine correspondant à celles marquées après induction (résultats non montrés).

Dans tous les échantillons analysés de MCAs, les protéines complètes, c'est-à-dire MCA WT ou mutée couplées à la GST, ont été détectées à la taille attendue, comprise entre 54 et 60 kDa (**Figure 44**; flèches noires). Il en est de même pour la GST seule, qui a un poids moléculaire théorique de 26 kDa (**Figure 44**; flèches grises). Cette bande est retrouvée sur tous les profils protéiques des échantillons analysés. Pour la protéine M6 WT, l'anticorps anti-GST reconnaît une bande majoritaire à environ 54 kDa correspondant à la protéine complète (bande 1), et 4 autres bandes à des poids moléculaires inférieurs (de 45 à 25 kDa environ, bandes 2 à 5, **Figure 44**). Ces 4 dernières bandes ont été découpées sur un même gel coloré au bleu de Coomassie et analysées par spectrométrie de masse. Cette technique a confirmé que la bande 5 correspond à la GST seule. Les 3 autres bandes correspondent à la protéine M6 clivée à son extrémité carboxy-terminale couplée à la GST.

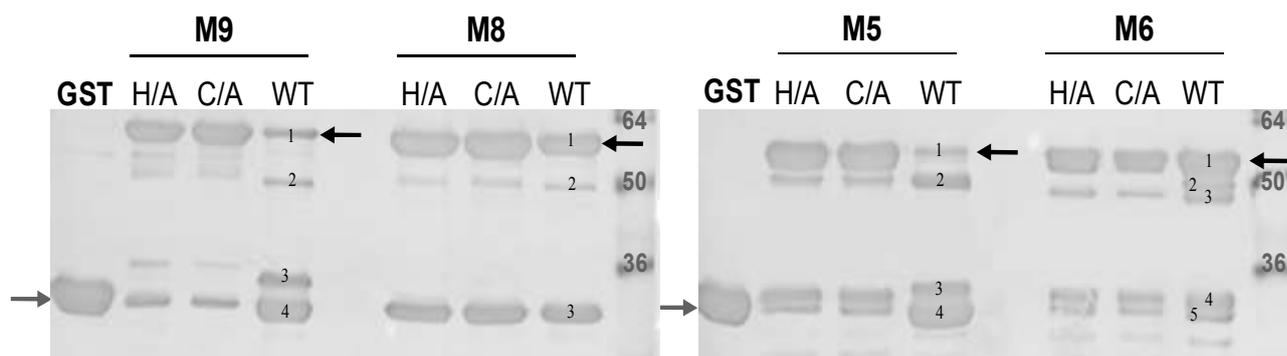


Figure 44 : Analyse de l'autoclivage des métacaspases de *Trichomonas vaginalis*. Les protéines M5, M6, M8 et M9 couplées à la GST ainsi que ces mêmes protéines mutées au niveau de leur site catalytique ont été produites en système bactérien et purifiées sur billes de glutathion agarose. Elles ont été analysées par western blot après marquage avec un anticorps monoclonal anti-GST. Les protéines non mutées sont notées WT (wild type) et les protéines mutées au niveau des résidus histidine et cystéine de la dyade du site catalytique sont notées H/A et C/A (remplacement des résidus histidine et cystéine par un résidu alanine). La GST seule représente le profil protéique obtenu à partir du vecteur vide. Les numéros 1 à 5 correspondent aux bandes ayant été analysées par spectrométrie de masse. Les flèches noires indiquent les protéines complètes sans clivage (métacaspase + GST) et les flèches grises indiquent la GST seule.

Il est intéressant de noter que la bande 3 comprend également le facteur d'élongation EF-tu de *E. coli* (environ 45 kDa). Cela suggère une co-purification de cette protéase et de l'un de ses substrats. Cette hypothèse a été vérifiée ci-dessous (Voir Par.IV-6-2-6). Lorsque la protéine M6 est mutée au niveau des résidus de la dyade H-C (M6 H/A et M6 C/A), la bande 2 disparaît et les intensités des bandes 3 et 4 diminuent (**Figure 44**). En parallèle, l'intensité de la bande 1 n'augmente pas. Ces résultats montrent donc un auto-clivage de la protéine M6.

Pour la protéine M5 WT, la production de la protéine complète (bande 1), à environ 54 kDa, est faible. Par contre, on observe une bande majeure reconnue par l'anticorps à un poids moléculaire aux alentours de 45 kDa (bande 2), une autre bande aux environs de 28 kDa (bande 3) et une troisième à environ 26 kDa (bande 4) (**Figure 44**). L'analyse par spectrométrie de masse a révélé que les bandes 2 et 3 correspondent à la protéine M5 clivée à son extrémité carboxy-terminale couplée à la GST, et la bande 4 à la GST seule. Lorsque la protéine M5 est mutée, soit au niveau de la cystéine (M5 C/A) soit au niveau de l'histidine (M5 H/A), la bande attendue à environ 54 kDa est majoritaire. La bande à 45 kDa est alors beaucoup plus faible ainsi

que la bande correspondant à la GST seule. Cela suggère comme pour M6 un auto-clivage de la protéine. Il est à noter que l'intensité de la bande à 28 kDa ne varie que très faiblement.

Pour la protéine M9 WT, en plus de la bande à environ 60 kDa correspondant à la protéine complète (bande 1), l'anticorps reconnaît 3 autres bandes à des poids moléculaires inférieurs, environ 50, 30 et 26 kDa (bandes 2 à 4) (**Figure 44**). Ces 3 bandes ont également été analysées par spectrométrie de masse. La bande 4 correspond à la GST seule. Les bandes 2 et 3 correspondent à la protéine M9 clivée à son extrémité carboxy-terminale et couplée à la GST. Lorsque la protéine M9 est mutée (M9 C/A et M9 H/A), la bande attendue à environ 60 kDa devient majoritaire et les bandes 2 et 3 disparaissent. Cela indique également un auto-clivage de la protéine M9.

Enfin, pour la protéine M8 WT, on observe une bande majoritaire à environ 60 kDa (bande 1), une bande à environ 50 kDa (bande 2) et une bande à 26 kDa (bande 3) (**Figure 44**). L'analyse par spectrométrie de masse a révélé que la bande 2 correspond à la protéine M8 clivée à son extrémité carboxy-terminale couplée à la GST alors que la bande 3 correspond à la GST seule. Pour les protéines M8 mutées (M8 C/A et H/A), on n'observe pas de modification des profils protéiques, suggérant dans ce cas une absence probable d'auto-clivage dans ces conditions expérimentales.

IV-6-2- Activité enzymatique et substrats des métacaspases de *Trichomonas vaginalis*

Les activités enzymatiques des MCAs purifiées sont mesurées *via* l'utilisation d'un substrat fluorogénique. Le principe est le suivant : la protéine purifiée est mise en contact avec un substrat couplé à l' amino-4-méthylcoumarin (AMC) dans un tampon d'activation. Si la protéine coupe le substrat, l'AMC est alors libéré et devient fluorescent lorsqu'il est excité à une longueur d'onde de 355 nm. La fluorescence émise est alors mesurée à 460 nm. Toutes les activités enzymatiques des MCAs ont été rapportées à celle du vecteur vide mesurée dans les mêmes conditions.

IV-6-2-1- Variation du pH du tampon d'activation

Nous avons tout d'abord réalisé une expérience préliminaire avec un tampon à pH=7, visant à évaluer la capacité des MCAs de *T. vaginalis* à cliver le substrat Boc-GRR-AMC (t-butyloxycarbonyl-Gly-Arg-Arg-AMC). Ce substrat du fait de sa séquence (arginine en position P1, Boc-GRR-AMC), est spécifique des protéases à activité arginine spécifique comme en particulier la trypsine (contrôle positif, non montré) et les MCAs connues chez d'autres organismes. Il s'est avéré que les 4 MCAs de *T. vaginalis* étudiées ont toutes une activité enzymatique plus ou moins importante avec ce substrat (résultats non montrés).

Nous avons ensuite cherché à déterminer le pH optimum pour l'activité enzymatique de ces MCAs avec le même substrat Boc-GRR-AMC. Comme le montre la **Figure 45**, M5 et M9 ont une activité enzymatique optimale à pH = 7. L'activité enzymatique de M5 décroît très rapidement à des pH inférieurs ou supérieurs (moins de 50% à pH=6,5 et moins de 20% à pH = 7,5) contrairement à celle de M9. M6 présente une activité enzymatique optimale à un pH autour de 6-6,5 mais à pH = 7 l'activité enzymatique reste encore importante (environ 80%). M8 à une activité enzymatique optimale à pH = 8 mais cette activité chute très fortement à pH = 9 (inférieure à 10%). Cependant, cette protéase a tout de même une activité enzymatique proche de 90% entre les pH 7 et 7,5. Curieusement, ces MCAs ont des activités enzymatiques maximales à différents pH mais ont toute une activité enzymatique supérieure à 80% à pH=7 qui est le pH physiologique du cytoplasme. Aussi, pour la suite de nos expérimentations, nous avons utilisé un tampon d'activation à pH = 7 pour mesurer l'activité enzymatique de ces différentes MCAs (voir les cinq paragraphes suivants).

IV-6-2-2- Variation de la concentration en Ca^{2+} du tampon d'activation

Nous avons ensuite voulu mesurer l'activité enzymatique des MCAs de *T. vaginalis* avec le substrat Boc-GRR-AMC en fonction de la concentration en calcium dans le tampon utilisé. La **Figure 46** montre d'abord que les activités endopeptidases de M6 et M8 sont plus importantes que celles de M5 et M9. De plus, les activités de M6 et M8 en présence de 0,1 mM de Ca^{2+} sont augmentées lors de l'addition de 10 mM de CaCl_2 dans le tampon. Cette augmentation est de l'ordre d'un facteur 3 pour M6 (**Figure 46**). En revanche les activités de M5 et M9 restent inchangées avec ou sans addition de 10 mM de CaCl_2 . En outre, les activités des 4 MCAs sont fortement inhibées en présence d'un chélateur de Ca^{2+} , l'EGTA. Ces résultats suggèrent que ces 4 MCAs ont une activité endopeptidase dépendante du Ca^{2+} . Afin de savoir si le Ca^{2+} pouvait entraîner un changement au niveau du profil protéique de ces MCAs et en particulier sur leur auto-clivage, nous avons incubé les 4 protéines purifiées avec ou sans (témoin PBS) 10 mM de CaCl_2 et en présence ou non de 10 mM d'EGTA. Nous avons réalisé un western blot avec l'anticorps monoclonal anti-GST (**Figure 47A**). En présence de Ca^{2+} , on note une diminution de l'intensité des bandes correspondant aux protéines complètes M6 et M8 (MCAs couplées à la GST) et une disparition des bandes correspondant aux protéines complètes M5 et M9 (flèches, **Figure 47A**). Cependant, nous ne voyons pas le marquage de nouvelles bandes sur le western blot. Par contre sur les gels SDS-PAGE correspondants et colorés au bleu de Coomassie, on note l'apparition de quelques bandes supplémentaires pour les différentes protéines (flèches blanches, **Figure 47B**).

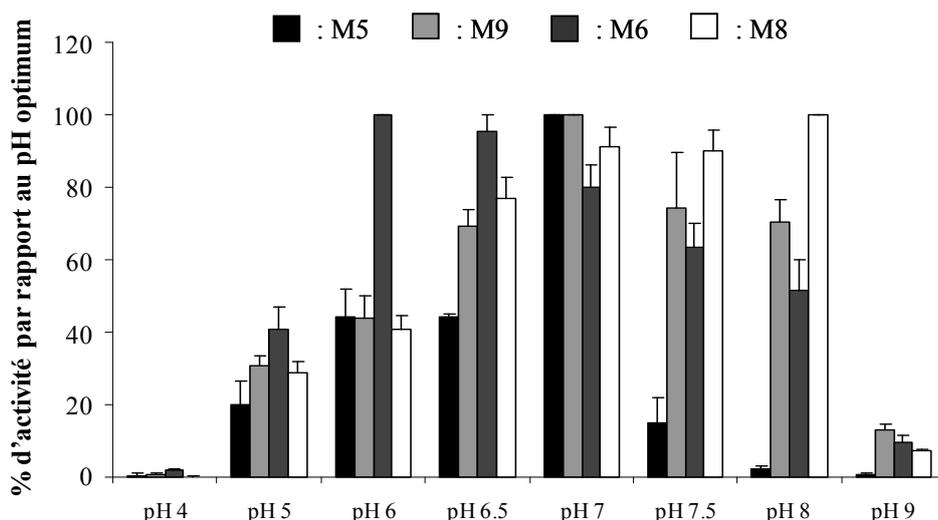


Figure 45 : pH optimum des activités protéolytiques des métacaspases M5, M6, M8 et M9. Les activités protéolytiques des métacaspases ont été mesurées à différents pH en utilisant le substrat Boc-GRR-AMC. L'activité relative (l'activité rapportée à celle du vecteur vide) est exprimée comme le pourcentage de l'activité de la métacaspase au pH optimum. Les écarts type sont représentés par des barres (n = 3).

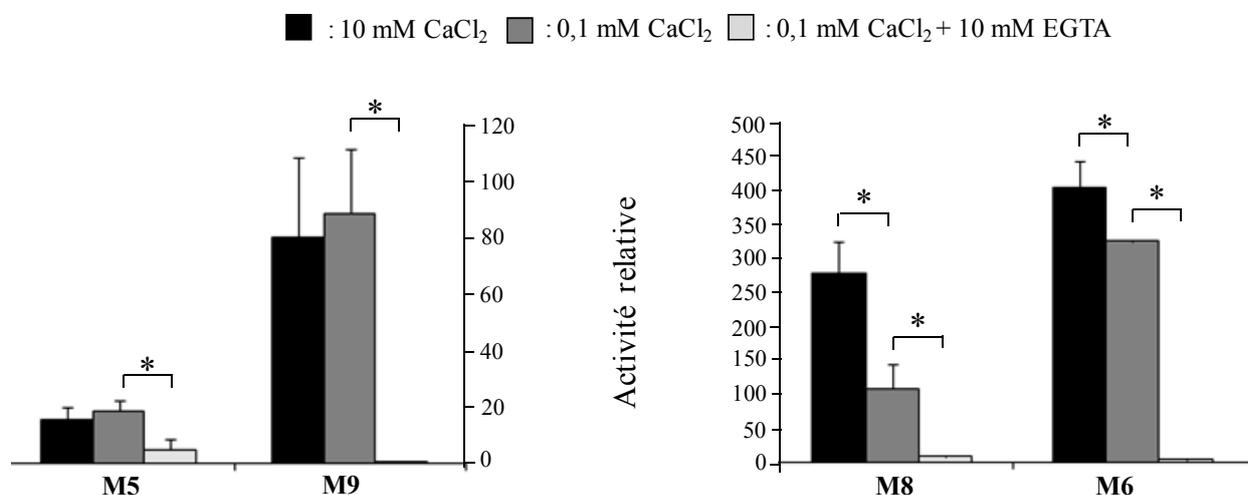


Figure 46 : Effet du Ca²⁺ sur l'activité protéolytique des métacaspases M5, M6, M8 et M9. Le clivage de Boc-GRR-AMC par les métacaspases est mesuré dans un tampon contenant 0,1 mM de CaCl₂ supplémenté avec 10 mM CaCl₂ ou 10 mM d'EGTA au pH optimum d'activité de chacune de ces protéases. L'activité de chaque métacaspase a été rapportée à celle du vecteur vide (activité relative). n= 3, la valeur de l'activité relative représente la moyenne des 3 expériences ± l'écart type. * P < 0,05.

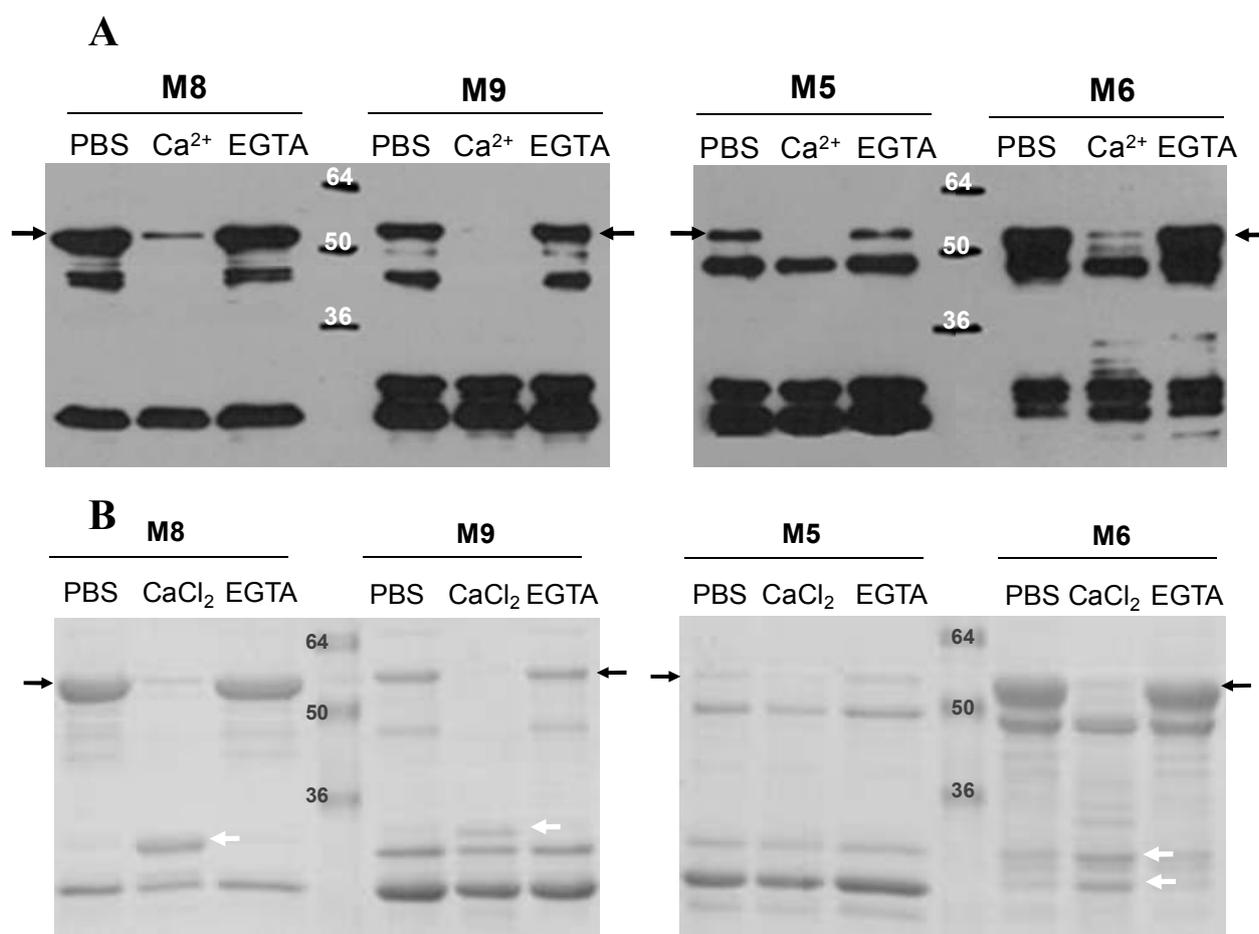


Figure 47 : Effet du Ca²⁺ sur l'activité auto-protéolytique des métacaspases M5, M6, M8 et M9. Les métacaspases ont été incubées dans du PBS (contrôle) ou du tampon contenant 10 mM de CaCl₂ avec ou sans 10 mM d'EGTA. Elles ont été analysées par western blot avec un anticorps monoclonal anti-GST (A) ou sur gel SDS PAGE 12 % coloré au bleu de Coomassie (B). Les flèches noires indiquent les protéines complètes (métacaspases couplées à la GST) et les flèches blanches indiquent les protéines apparues suite à l'addition de CaCl₂ dans le tampon.

L'absence de marquage de ces bandes supplémentaires sur le western blot peut s'expliquer probablement par le fait qu'il doit y avoir des coupures aux extrémités amino-terminales. Les protéines tronquées qui apparaissent ne sont donc plus couplées à la GST et donc plus reconnues par l'anticorps. De plus, les fractions protéiques incubées en présence d'EGTA montrent des profils protéiques identiques aux témoins. Dans le cas de la protéine M8, aucun auto-clivage n'avait été observé précédemment (**Figure 44**) lorsque la protéine était mise en solution dans du PBS. Par contre, on observe un auto-clivage de cette même protéine en solution dans le tampon d'activation en présence de Ca²⁺. Tous ces résultats suggèrent un auto-clivage basal (en PBS) de la plupart des MCAs de *T. vaginalis* qui est renforcé en présence de Ca²⁺.

IV-6-2-3- Spécificité de substrat des métacaspases

Afin de déterminer la spécificité de substrat des 4 MCAs purifiées de *T. vaginalis*, nous avons utilisé un autre substrat avec une lysine en position P1, Boc-VLK-AMC (t-butylloxycarbonyl-Val-Leu-Lys-AMC) en plus du substrat Boc-GRR-AMC déjà utilisé dans les expériences précédentes. La **Figure 48** montre que M8 et M6 ont une activité enzymatique plus importante que M5 et M9 et ce pour les 2 substrats testés. On peut ajouter que les 4 MCAs coupent ces deux substrats mais avec des efficacités différentes. Ainsi, M5 a une activité endopeptidase très faible avec le substrat Boc-VLK-AMC. Pour confirmer la spécificité de substrat des MCAs de *T. vaginalis*, nous avons aussi utilisé un substrat de caspase, l'Ac-DEVD-AMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-AMC) qui présente un acide aspartique en P1. Le substrat de caspase n'est coupé par aucune des MCAs (**Figure 48**). En revanche, le témoin positif, c'est-à-dire la caspase 3 humaine purifiée, coupe efficacement ce substrat mais pas les deux substrats des MCAs.

IV-6-2-4- Effet des inhibiteurs de protéases

Nous avons évalué l'effet de différents inhibiteurs de protéases sur les activités enzymatiques des 4 MCAs de *T. vaginalis* et de la caspase 3 humaine, avec les substrats Boc-GRR-AMC et Ac-DEVD-AMC, respectivement (**Tableau 14**). L'inhibiteur de caspases, Z-VAD-cmk, ne bloque pas les activités protéolytiques des MCAs de *T. vaginalis* (> à 89%) alors qu'il bloque complètement celle de la caspase 3. Par contre, les inhibiteurs de protéases arginine ou lysine spécifiques comme la leupeptine, l'antipaine et le Z-FK-cmk inhibent fortement les activités protéolytiques des 4 MCAs (< à 3% d'activité) alors que l'activité de la caspase 3 n'est pas modifiée.

IV-6-2-5- Activité enzymatique des métacaspases mutées

Comme nous l'avons montré précédemment par western blot (**Figure 44**), les résidus H et C de la dyade du site catalytique seraient nécessaires à l'auto-clivage des MCAs de *T. vaginalis*. La **Figure 49** montre clairement que ces deux résidus sont aussi indispensables aux activités endopeptidases des 4 MCAs. En effet les MCAs mutées au niveau de l'histidine ou au niveau de la cystéine ont une activité proche de zéro avec le substrat Boc-GRR-AMC.

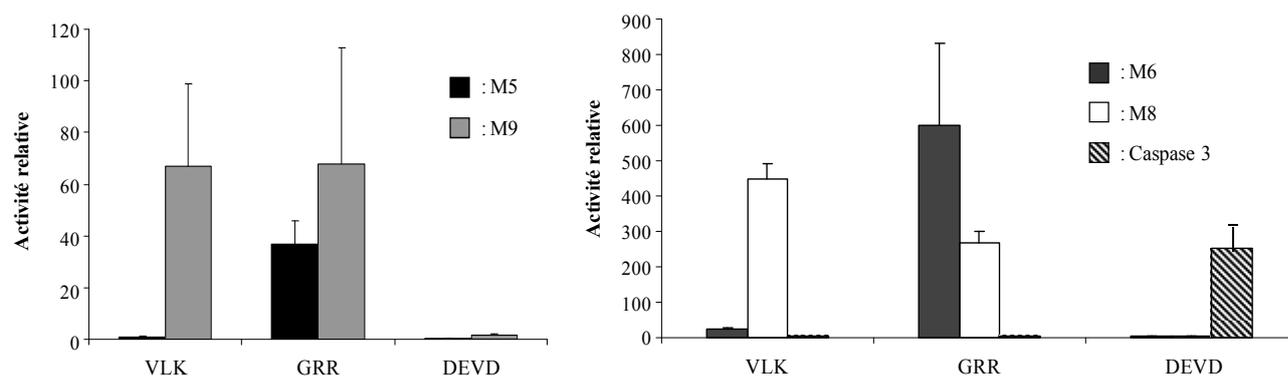


Figure 48 : Spécificité de substrat des métacaspases M5, M6, M8 et M9 de *Trichomonas vaginalis*. Les activités protéolytiques des métacaspases et de la caspase 3 humaine ont été mesurées avec les substrats Boc-GRR-AMC (GRR), Boc-VLK-AM (VLK) et Ac-DEVD-AMC (DEVD). L'activité de chaque métacaspase a été rapportée à celle du vecteur vide (activité relative). n= 3, la valeur de l'activité relative représente la moyenne des 3 expériences ± l'écart type.

Réactif	Concentration	% activité				
		M5	M6	M8	M9	Caspase3
Z-VAD-cmk	20µM	91,2 ± 2	92,6 ± 5,1	94,1 ± 13,1	89,4 ± 4,8	1,9 ± 0,1
Antipaine	5µM	1,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,4	1,1 ± 0,6	86,8 ± 6,4
Leupeptine	5µM	1,8 ± 1,2	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,3	2,8 ± 1,8	86,3 ± 7,8
Z-FK-cmk	2µM	1,2 ± 0,8	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,3 ± 1,2	89,1 ± 4,5

Tableau 14 : Effet de différents inhibiteurs de protéases sur les activités protéolytiques des métacaspases M5, M6, M8 et M9 de *Trichomonas vaginalis* avec le substrat Boc-GRR-AMC et sur la caspase 3 humaine avec le substrat Ac-DEVD-AMC. Les activités sont représentées en pourcentage d'activité par rapport à l'activité de ces mêmes protéases sans inhibiteur. n= 3, les valeurs représentent la moyenne des 3 expériences ± l'écart type.

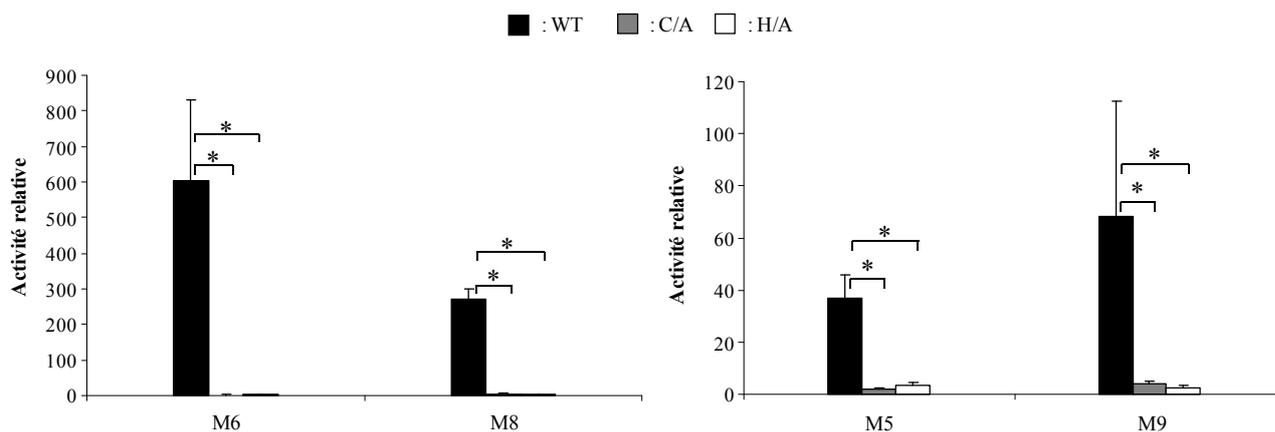


Figure 49 : Etude de l'activité protéolytique des métacaspases M5, M6, M8 et M9 de *Trichomonas vaginalis* mutées au niveau des résidus histidine et cystéine de la dyade du site catalytique. L'activité protéolytique des métacaspases sauvages WT (wild-type) et mutées au niveau des résidus histidine (H/A) et cystéine (C/A) ont été mesurées avec le substrat Boc-GRR-AMC. L'activité de chaque métacaspase a été rapportée à celle du vecteur vide (activité relative). n= 3, la valeur de l'activité relative représente la moyenne des 3 expériences \pm l'écart type. * P < 0,05.

IV-6-2-6- Identification d'un substrat de la métacaspase M6

Lors de l'analyse réalisée par spectrométrie de masse du profil électrophorétique de M6 WT, nous avons identifié une autre protéine correspondant au facteur d'élongation Tu de *E. coli* noté EF-tu. Afin de savoir s'il s'agissait d'un substrat de la protéase M6 qui aurait été co-purifié en même temps que M6 ou d'un contaminant non éliminé lors de la purification, nous avons d'abord produit la protéine EF-tu de *E. coli* couplée à la GST à son extrémité amino-terminale puis nous l'avons purifiée sur billes de glutathion agarose. Nous avons ensuite mis en contact ce substrat potentiel avec l'enzyme M6 WT ou l'enzyme M6 mutée au niveau de la cystéine du site catalytique (M6 C/A), dans un tampon d'activation de l'enzyme à 37°C. Nous avons analysé les mélanges protéiques de EF-tu et M6 WT ou M6 C/A après différents temps d'incubation par western blot *via* un anticorps monoclonal anti-GST. La **Figure 50A** montrent les témoins, à savoir les protéines M6 WT, M6 C/A et EF-tu (noté EF) incubées dans le tampon d'activation de l'enzyme (pistes indiquées en noir) ou dans du PBS (pistes indiquées en gris). Pour M6 WT et M6 C/A, on retrouve les mêmes résultats que ceux décrits précédemment puisque lorsque M6 WT est incubée pendant 2 à 15 min dans du tampon d'activation, c'est-à-dire en présence de Ca^{2+} , cette protéine s'auto-clive. Cet auto-clivage est de nouveau absent pour la protéine mutée. La protéine EF-tu couplée à la GST (26 kDa) est produite à la taille attendue, à environ 70 kDa

(45 kDa EF-tu seule plus 26 kDa de la GST) (**Figure 50A**). Quand on compare les profils électrophorétiques de EF-tu incubée dans le tampon d'activation (2 ou 15 min) avec celui de EF-tu incubée dans du PBS, une bande (bande 5) apparaît entre 36 et 50 kDa. Nous ne savons pas actuellement à quoi correspond cette bande. Il est possible que la purification n'ait pas été totale étant donné que nous n'avons fait qu'une seule étape de purification. Ainsi, il est possible qu'une protéase n'ait pas été éliminée et que celle-ci s'active dans le tampon d'activation, coupant alors le facteur EF-tu. Nous avons donc considéré cette bande 5 comme étant non spécifique.

La **Figure 50B** montre qu'après incubation de EF-tu avec M6 WT dans du PBS, seules les bandes correspondantes aux témoins, c'est-à-dire M6 WT seule et EF-tu seule incubées dans du PBS, sont présentes. Par contre, lorsque ces mêmes protéines sont incubées ensemble dans du tampon d'activation (EF-tu / M6 WT), un changement du profil électrophorétique au cours du temps est observé, comparé à celui observé en absence de tampon d'activation (EF / M6 WT). En effet, l'intensité de la bande correspondant à la protéine complète EF-tu couplée à la GST (bande 1) diminue au cours du temps. De plus, de nouvelles bandes (bandes 4, 6 et 9) sont révélées (**Figure 50B** ; EF-tu / M6 WT). Les intensités des bandes 4 et 6 diminuent au cours du temps tandis que celle de la bande 9 augmente. Les bandes 2, 3, 7 et 8 correspondent au témoin M6 WT et la bande 5 a été considérée comme non spécifique dans le profil électrophorétique de EF-tu. Cela laisse penser que M6 coupe EF-tu à plusieurs endroits. Ces résultats sont confortés par le fait que M6 C/A n'entraîne pas de changement du profil électrophorétique de EF-tu (**Figure 50B** ; EF-tu / M6 C/A) au cours du temps même après 2 h d'incubation dans le tampon d'activation (résultat non montré). Ainsi, le facteur EF-tu de *E. coli* constitue un substrat potentiel *in vitro* de la MCA M6 de *T. vaginalis*.

IV-7- Production des métacaspases M6 et M9 de *Trichomonas vaginalis* en système levure

Il était intéressant d'analyser les profils électrophorétiques et les activités enzymatiques de ces 2 MCAs exprimées en système eucaryote et de les comparer à ceux observés ci-dessus pour ces mêmes protéines en système procaryote. Pour cela, nous avons cloné en phase les gènes codant les MCAs M6 et M9, représentatives des deux sous-groupes de MCAs de *T. vaginalis* (courte et longue) dans le vecteur d'expression pESC-HIS. La souche de *S. cerevisiae* déficiente pour son seul gène de MCA YCA1 (souche notée Δ YCA1) est transfectée avec ces constructions. Elle a aussi été transfectée avec une construction contenant le gène codant YCA1 et avec le vecteur vide (témoins positif et négatif). Les protéines sont produites couplées à un tag FLAG à leur extrémité carboxy-terminale.

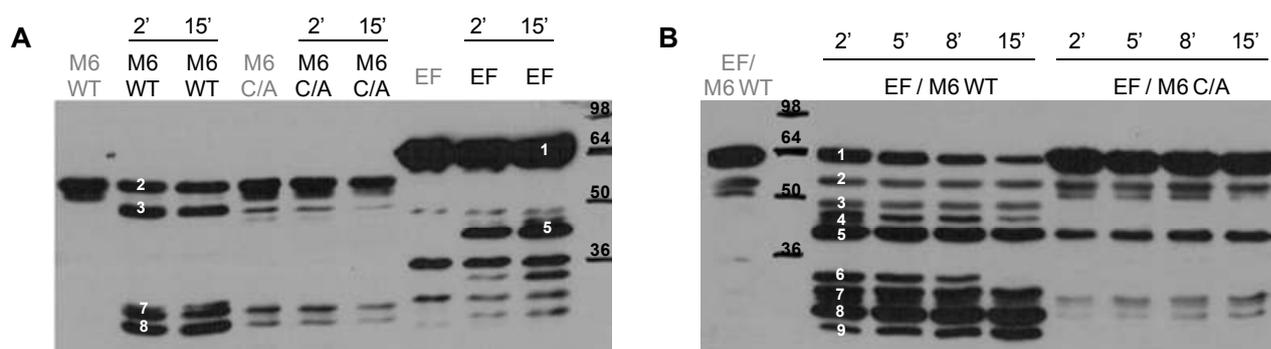


Figure 50 : Marquage par immunoblotting du facteur d'élongation Tu (EF-tu) de *Escherichia coli* après contact avec la métacaspase M6. Les protéines M6 sauvage (WT : wild type) et mutée au niveau du résidu cystéine du site catalytique (C/A) et EF-tu (EF) ont été mises en contact soit dans un tampon d'activation de l'enzyme (pistes indiquées en noir) ou dans du PBS (pistes indiquées en gris). Après différents temps d'incubation (de 2 à 15 min), les mélanges réactionnels ont été analysés par western blot avec un anticorps monoclonal anti-GST.

IV-7-1- Auto-clivage des métacaspases

Après transfert sur membrane des profils électrophorétiques des protéines contenues dans les lysats cellulaires des levures transfectés avec les MCAs M6, M9, YCA1 et le vecteur vide, un western blot a été réalisé avec un anticorps monoclonal anti-FLAG. La **Figure 51** montre clairement un auto-clivage de la MCA YCA1 de levure. En revanche, M6 et M9 ne subissent pas d'auto-clivage dans ces conditions puisque seules les bandes correspondantes aux protéines complètes à environ 27 et 33 kDa sont marquées. Ce résultat n'est donc pas en corrélation avec celui obtenu ci-dessus avec les mêmes protéines produites en bactéries.

IV-7-2- Activité enzymatique et substrats des métacaspases

L'analyse des substrats des MCAs à partir des lysats de levures transfectées a été réalisée comme pour ces mêmes protéines produites en système bactérien. On note que les MCAs M6 et M9 ont une activité plus importante avec le substrat Boc-GRR-AMC qu'avec le substrat Boc-VLK-AMC (**Figure 52**) mais n'ont pas d'activité, comme on pouvait s'y attendre avec le substrat de caspase, Ac-DEVD-AMC. De plus, leurs activités sont inhibées par l'utilisation d'inhibiteurs de protéase arginine ou lysine spécifique (leupeptine, antipaine et z-FK-cmk) et non par le z-VAD-fmk, inhibiteur de caspases (résultats non montrés). Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus pour ces mêmes MCAs produites en système procaryote et confirment que ces protéases coupent leur substrat après un résidu basique en position P1. D'autre part, bien qu'aucun auto-clivage de ces protéines n'ait été détecté par western blot, elles ont pourtant bien une activité enzymatique.

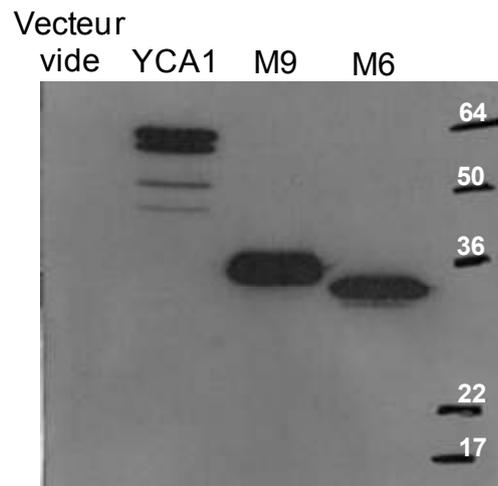


Figure 51 : Analyse du profil électrophorétique par immunoblotting des métacaspases M6 et M9 de *Trichomonas vaginalis* et YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae* produites dans une souche de levure déficiente pour le gène YCA1. Ces protéines, couplées à un tag FLAG ont été produites pendant 24 h avant lyse des cellules. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblotting avec l'anticorps anti-FLAG. Les cellules ayant été transfectées avec le vecteur vide ont aussi été analysées.

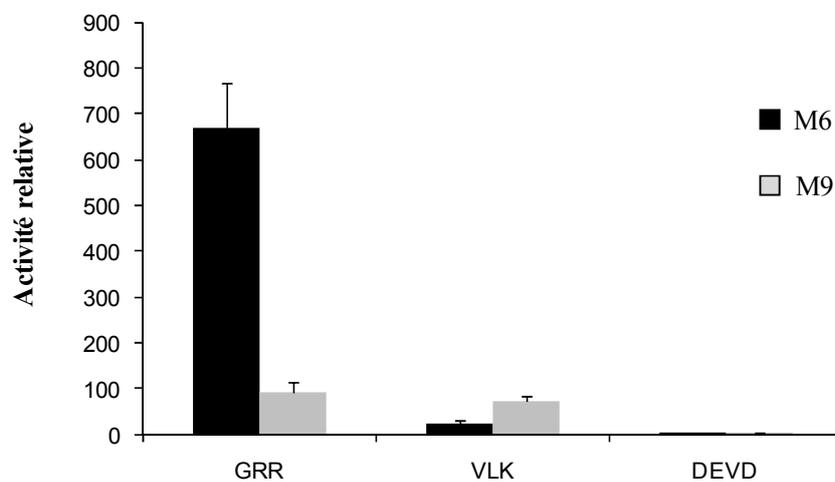


Figure 52 : Spécificité de substrat des métacaspases M6 et M9 de *Trichomonas vaginalis* produites en levure. Les activités protéolytiques de ces métacaspases ont été mesurées avec les substrats Boc-GRR-AMC (GRR), Boc-VLK-AM (VLK) et Ac-DEVD-AMC (DEVD). L'activité de chaque métacaspase a été rapportée à celle du vecteur vide (activité relative). n= 3, la valeur de l'activité relative représente la moyenne des 3 expériences \pm l'écart type.

IV-8- Etude fonctionnelle des métacaspases M6 et M9 par ARN anti-sens

Nous avons transfecté *T. vaginalis* avec le vecteur pBSneo dans lequel ont été clonés les gènes codant les MCAs M6 et M9 soit en sens soit en anti-sens. La **Figure 53** montre que les protéines M6 et M9 sens sont bien produites à la taille attendue dans les parasites transfectés. Cependant, comme c'était le cas lors de la production en levure, ces protéines ne semblent pas s'auto-cliver. En parallèle, nous avons réalisé une cinétique de la mort des parasites induite par la ménadione. Globalement, comme on pouvait s'y attendre, on observe une augmentation du pourcentage de cellules mortes au cours du temps et ce pour toutes les populations parasitaires étudiées, c'est-à-dire celles transfectées avec M6, M9 en sens et en anti-sens et celles non transfectées (**Figure 54**). Pour ce qui est de la MCA M6, on observe une différence significative d'environ 10% du nombre de cellules mortes entre les deux populations parasitaires transfectées avec les constructions sens et anti-sens et ce après 2 h et 4 h d'incubation avec la drogue. On observe ainsi moins de cellules mortes dans la population transfectée avec la construction anti-sens et donc un effet protecteur. En ce qui concerne la MCA M9, on peut faire la même constatation. Cependant, dans ce cas, les différences entre les deux populations sont significatives après 4 h et 6 h de traitement à la ménadione (**Figure 54**).

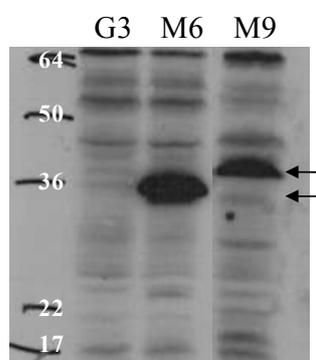


Figure 53 : Immunoblotting sur des lysats de parasites transfectés avec les métacaspases M6 et M9 en sens. Des parasites non transfectés servent de témoins (noté G3). Le marquage est réalisé avec un anticorps monoclonal anti-HA. Les protéines M6 et M9 sont indiquées par des flèches noires.

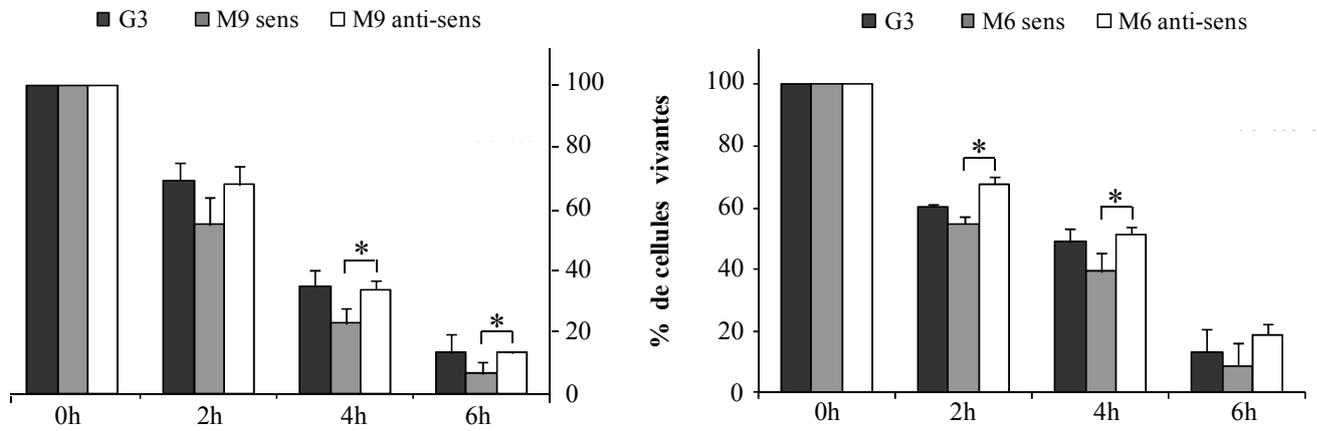


Figure 54 : Cinétique de la mort cellulaire des parasites transfectés avec les constructions M6 et M9 sens ou anti-sens. Les parasites ont été incubés en présence de ménadione. A chaque temps, ils ont été colorés au bleu vital et comptés sur cellules de Thoma. n= 3, la valeur du pourcentage de cellules vivantes représente la moyenne des 3 expériences \pm l'écart type. * P < 0,05.

Identification moléculaire et phylogénie des Parabasalia

Préambule : Dans cette première partie de ma thèse traitant en particulier de la phylogénie moléculaire des Parabasalia, nous ne développons que très peu l'évolution morphologique au sein de ce groupe de protistes qui est discutée en détails dans nos différents articles. En effet, c'est une partie qui nécessite une excellente connaissance de ces microorganismes ce qui ne sera pas obligatoirement le cas de la plupart des lecteurs de cette thèse. D'autre part, la question de la racine des Parabasalia n'étant posée que dans une partie d'un seul de nos articles et ne donnant pour l'instant que des résultats très controversés, nous avons décidé de ne pas développer cette question dans ce chapitre. Nous nous sommes donc uniquement focalisés sur l'identification et la systématique des membres de ce groupe.

I- IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE ESPECE DE TRICHOMONADINE CHEZ L'HOMME

Quatre espèces de trichomonadines sont majoritairement retrouvées chez l'homme : *T. vaginalis*, *T. tenax*, *P. hominis* et *D. fragilis*. Ces espèces étaient considérées comme site-spécifiques puisqu'elles n'avaient été trouvées qu'en de très rares exceptions en dehors de leur localisation habituelle en particulier dans les poumons de certains patients. En règle générale, dans ces contextes cliniques, ces trichomonadines ont été identifiées comme étant *T. tenax* sur la base de critères limités et plus que discutables comme la taille et la forme (Hersh, 1985 ; Stratakis et al., 1999). Plus récemment, il a été montré que les trichomonadines pouvaient coloniser avec une fréquence importante les poumons de patients atteints de pneumocystose et de SDRA (Duboucher et al., 2007a, 2007b, 2008). Par des techniques moléculaires, nous avons pu caractériser l'espèce en cause dans deux cas de co-infection par *Pneumocystis jirovecii*, en l'occurrence *T. vaginalis* (Duboucher et al., 2003) et *T. foetus* (Duboucher et al., 2006), le parasite de l'appareil uro-génital des bovins. A cela s'ajoutent l'identification chez l'homme, par d'autres auteurs, de *P. hominis* (Jongwutiwes et al., 2000) et *T. tenax* (Bellanger et al., 2008) dans des épanchements pleuraux. Ces observations indiquent clairement que l'espèce responsable des trichomonoses pleuropulmonaires humaines est loin de se limiter à *T. tenax*, le saprophyte de la cavité buccale qui peut aisément entrer dans l'appareil respiratoire par aspiration des sécrétions oropharyngiennes. D'ailleurs ces approches moléculaires ont permis récemment de découvrir, dans l'appareil respiratoire de l'homme, une espèce très proche d'une trichomonadine aviaire, *Tetratrichomonas gallinarum* (Kutisova et al., 2005). Dans notre étude, nous avons quant à nous, détecté la présence de *Tetratrichomonas* sp. dans les poumons d'un patient atteint d'empyème pulmonaire. Comme indiqué ci-dessus, ce genre avait déjà été identifié dans les poumons de patients tchèques (Kutisova et al., 2005). Cependant, d'après notre analyse phylogénétique, les isolats tchèques appartiennent à l'espèce *Tetratrichomonas*

gallinarum ce qui n'est pas le cas de l'isolat français. Nous avons ainsi identifié une nouvelle espèce du genre *Tetratrichomonas* qui est connu pour avoir une très grande diversité génétique (Cepicka et al., 2005, 2006). Cette nouvelle espèce n'a pour l'instant été trouvée que chez l'homme ce qui pose bien entendu la question du potentiel zoonotique encore inconnu des trichomonadines et suggère l'existence d'un large réservoir d'infection potentielle pour l'homme. Kutisova et al. (2005) ont tenté sans succès de transmettre leur souche de *Tetratrichomonas* à des oiseaux ce qui renforce l'idée d'une possible adaptation de cette souche d'origine animale à l'homme. C'est aussi peut être le cas pour la souche de *Tetratrichomonas* identifiée dans notre étude. Nos données confirment donc la présence possible de trichomonadines dans des localisations inhabituelles et font monter à 7 le nombre d'espèces de ce groupe de protistes identifiées jusqu'à présent chez l'homme. De plus, il est probable que cette présence soit largement sous-estimée du fait surtout d'une identification difficile sur la base de caractères morphologiques.

Il est crucial de savoir quelle peut être la signification de cette colonisation alvéolaire par les trichomonadines. D'après Duboucher et al. (2007a, 2008), le développement de trichomonadines microaérophiles dans les cas de co-infection avec *Pneumocystis* et de SDRA serait lié à un environnement local où l'anaérobiose aurait un rôle dominant. Les poches d'anaérobiose seraient créées par la prolifération du champignon (pneumocystose) ou par le comblement des alvéoles par du sang coagulé (SDRA). Ainsi le développement des trichomonadines ne serait pas lié à une immunosuppression ni probablement à une surinfection microbienne. De plus, la fréquence élevée de ces surinfections à trichomonadines soulève par ailleurs la question d'un réservoir humain pour plusieurs espèces qui seraient présentes à l'état normal à l'intérieur de niches d'anaérobiose.

Rien actuellement ne permet de confirmer une action délétère des trichomonadines dans les alvéoles pulmonaires. Néanmoins, il a été montré dans d'autres situations que la transformation amiboïde de ces microorganismes est la conséquence d'une interaction spécifique avec les cellules de l'hôte, et que cette action est associée à un comportement agressif (Arroyo et al., 1993 ; Jesus et al., 2004). De plus, *T. vaginalis* et *T. fetus* sont respectivement pathogènes chez l'homme et les bovins et sont capables d'induire l'apoptose des cellules épithéliales et des macrophages (Singh et al., 2004 ; Sommer et al., 2005 ; Chang et al., 2006). En outre, dans les lavages bronchoalvéolaires, les trichomonadines sont fréquemment en contact étroit avec les macrophages ce qui suggère une interaction directe avec les défenses immunitaires innées de l'hôte (Duboucher et al., 2003, 2004, 2006, 2007a, 2007b, 2008). Enfin, dans le cas de la pneumocystose, on peut penser que l'éradication du *Pneumocystis* suffit à éliminer le parasite surinfectant. Par contre, dans le cas du SDRA, rien n'empêche *a priori* les trichomonadines de

pulluler sans traitement au métronidazole et éventuellement de pérenniser ou majorer les phénomènes inflammatoires. Il est clair que le développement futur de sondes utilisables en hybridation *in situ* sur des tissus infectés comme c'est par exemple le cas pour la trichomonadine *Histomonas* (Liebhart et al., 2006) et de modèles murins de co-infection *Trichomonas-Pneumocystis* (modèles animaux de pneumocystose déjà développés dans notre laboratoire) devraient permettre de préciser le rôle pathogène potentiel de ces parasites ainsi que la signification biologique de leur présence dans l'appareil respiratoire de l'homme.

II- PENTATRICHOMONAS HOMINIS : POUVOIR PATHOGENE ET TRANSMISSION

La trichomonadine *P. hominis* colonise le tractus gastrointestinal chez l'homme mais aussi chez de nombreux autres mammifères. Dans la littérature très peu d'études traitent de sa fréquence dans la population humaine et celle-ci n'excéderait pas les 1,5% (Meloni et al., 1993 ; Crucitti et al., 2010). Quant à son pouvoir pathogène il reste encore largement débattu. Il a souvent été suggéré que *P. hominis* était un commensal du tube digestif et que dans certaines conditions il pouvait causer des troubles digestifs (Honigberg, 1978, 1990). Dans notre étude, nous avons pu identifier cette trichomonadine chez deux patients. Chez le premier, un adulte de 33 ans atteint entre autre d'IBS (Irritable bowel syndrome), les trichomonadines n'étaient pas clairement visibles dans les selles mais par contre, ces microorganismes ont été trouvés en grand nombre dans les cultures de ces mêmes selles au bout d'une dizaine de jours. Chez le second patient, un enfant de 11 mois, le parasite n'a été trouvé en quantité que dans les selles. Ce parasite était d'ailleurs difficilement détectable puisque toutes les structures cytosquelettiques typiques des trichomonadines n'étaient pas visibles suggérant que les cellules observées étaient des pseudokystes (Brugerolle, 1976). Chez le premier patient, l'IBS était probablement la principale source des symptômes observés puisque nous avons observé la disparition des trichomonadines après traitement de l'IBS mais sans traitement au métronidazole. Cela suppose que pour des raisons encore non déterminées, l'IBS a représenté des conditions favorables au développement d'une infection à *P. hominis*. Par contre, chez le second patient, *P. hominis* est bien la cause des symptômes puisque le traitement au métronidazole a non seulement entraîné la disparition du parasite mais aussi celle des douleurs intestinales et diarrhée. Notre observation couplée à celles d'études antérieures (Yang et al., 1990 ; Chung et al., 1991 ; Meloni et al., 1993 ; Ogunsanya et al., 1994) suggère donc que *P. hominis* est bien un pathogène responsable de diarrhées en particulier chez les enfants entre 1 et 5 ans. D'autre part, chez le premier patient, ces trichomonadines sont trouvées en grand nombre après 10 jours de culture des selles ce qui veut dire que ces parasites sont capables de survivre dans l'eau sur de longues périodes. La voie

de transmission de *P. hominis* étant très probablement la consommation d'eau ou de nourriture souillées, cette survie prolongée démontre donc le fort potentiel contaminant de ce parasite par la voie oro-fécale classique. De plus, nous avons noté que les séquences obtenues à partir de ces deux isolats de *P. hominis* étaient très similaires à celles obtenues à partir des mêmes organismes isolés par exemple chez les chiens et les bovins indiquant que la même espèce est capable de coloniser plusieurs hôtes. De nouveau, la question du potentiel zoonotique des trichomonadines se pose tout comme celle de l'origine de *P. hominis*. En effet, *P. hominis* étant fréquemment retrouvé chez les chiens et les chats (Gookin et al., 2007 ; Kim et al., 2010), l'origine animale de cette espèce ne peut pas être exclue. Enfin, du fait de son potentiel zoonotique, de sa forte capacité de transmission par l'eau et de la difficulté à identifier les pseudokystes, cette infection est très probablement sous-estimée chez l'homme et la prévalence de *P. hominis* chez l'homme comme chez l'animal se doit d'être réévaluée en utilisant des outils moléculaires.

III- IDENTIFICATION DES TRICHOMONADINES DANS LA CAVITE PREPUTIALE DES BOVINS

Tritrichomonas fetus est l'agent de la trichomonose bovine qui est responsable entre autres d'avortements et d'infertilité (BonDurant et Honigberg, 1994). La transmission de ce pathogène se fait essentiellement par voie sexuelle lors de l'accouplement des vaches avec des taureaux asymptomatiques infectés au niveau de la cavité préputiale. Aussi la méthode standard de diagnostique reste le lavage de la cavité préputiale de ces animaux suivi de l'inoculation du liquide aspiré dans un milieu spécifique et de l'observation microscopique des microorganismes présents qui sont identifiés sur la base de critères morphologiques (Schönmann et al., 1994). Cependant, des trichomonadines autres que *T. fetus* peuvent être isolées de la cavité préputiale et fausser ainsi le diagnostique (Castella et al., 1997 ; BonDurant et al., 1999 ; Cobo et al., 2003 ; Walker et al., 2003). Dans cette étude, nous avons alors identifié au niveau moléculaire 12 isolats de trichomonadines obtenus à partir de lavages de la cavité préputiale de taureaux. Parmi ces 12 isolats, 7 ont été identifiés comme appartenant au genre *Tetratrichomonas*. Comme indiqué ci-dessus, c'est un genre présentant une grande diversité génétique puisque pas moins de 16 lignées ont été mises en évidence sur la base de données moléculaires, chacune de ces lignées pouvant représenter une espèce (Cepicka et al., 2005). Dans notre arbre phylogénétique, les séquences de ces 7 isolats se répartissent en deux groupes. Le premier englobant 4 isolats est groupe-frère de la lignée 10 d'après Cepicka et al. (2005) et pourrait correspondre à *T. buttreysi* alors que le second, groupe-frère des lignées 4 et 5, pourrait correspondre à *T. brumpti*. Cependant, cette identification au niveau de l'espèce reste encore incertaine et les deux groupes d'isolats identifiés pourraient aussi correspondre à deux nouvelles espèces de *Tetratrichomonas*. Ainsi au moins

deux espèces de *Tetratrichomonas* sont trouvées dans la cavité préputiale des bovins comme cela avait été précédemment proposé par Jensen et Hammond (1964) sur la base de fines différences morphologiques qui d'ailleurs, n'ont pas été retrouvées pour nos deux groupes d'isolats. Quatre isolats ont ensuite été identifiés comme appartenant au genre *Pentatrichomonas* comme suggéré par Walker et al. (2003). Enfin le dernier des 12 isolats analysés correspond à une espèce appartenant au genre *Pseudotrichomonas*. Or cette trichomonadine est connue comme étant une forme libre trouvée en particulier dans les eaux stagnantes. Cependant, le mode de vie de cette espèce a été largement discuté dans le passé (Honigberg, 1963) et il a été proposé que ce microorganisme pouvait être un symbionte capable de se développer en dehors de son hôte si les conditions étaient favorables. Il est à signaler que la séquence obtenue pour ce dernier isolat présente un très fort pourcentage d'identité avec celle obtenue pour une souche de *Pseudotrichomonas keilini* déposée à l'ATCC. Or, après notre étude, Hampl et al. (2007) ont remarqué que l'espèce identifiée comme étant *P. keilini* à l'ATCC était en fait *Honigbergiella* sp., une autre forme libre. Dans notre étude, ce sont donc *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas* et *Honigbergiella* qui ont été identifiés dans la cavité préputiale des bovins.

Bien entendu se pose la question de la voie de transmission de ces trichomonadines. *Honigbergiella* étant une espèce libre, sa présence dans la cavité préputiale peut naturellement s'expliquer par une contamination accidentelle (contact de l'appareil génital avec de l'eau stagnante). Quant aux deux genres *Tetratrichomonas* et *Pentatrichomonas*, ils ont déjà été trouvés dans le tube digestif des bovins (Hayes et al., 2003) et les isolats correspondants ont des morphologies similaires avec ceux de la cavité préputiale (BonDurant et al., 1999 ; Cobo et al., 2004). Aussi, comme ces deux derniers auteurs, nous suggérons que le comportement homosexuel des taureaux suivi d'une contamination fécale de la cavité préputiale et du pénis est la voie de transmission probable de ces deux genres.

Enfin, cette étude avait aussi pour but d'identifier les trichomonadines présentes dans la cavité préputiale afin d'éviter la détermination de faux positifs dans le diagnostic de la trichomonose bovine. Cependant, par observation microscopique, il reste difficile de distinguer *T. fetus* des autres trichomonadines potentiellement présentes. Aussi, récemment, plusieurs tests par PCR ont été développés en utilisant des amorces spécifiques de *T. fetus* (Parker et al., 2001, 2003 ; Gookin et al., 2002 ; Nickel et al., 2002 ; Campero et al., 2003 ; Grahn et al., 2005). La plupart de ces tests utilisent le couple d'amorces TFR3 et TFR4 déterminé par Felleisen et al. (1998). Or, lors de la désignation de ces amorces, les autres trichomonadines pouvant être présentes dans la cavité préputiale n'avaient pas encore été identifiées. Nous avons donc testé ce couple d'amorces par PCR en utilisant comme matrices les ADNs de *T. fetus*, de représentants des deux groupes de *Tetratrichomonas*, de *P. hominis* et de *Honigbergiella* et montré que ce test

par PCR pouvait être utilisé avec succès dans la recherche exclusive de *T. foetus* dans la cavité préputiale des bovins.

IV- IDENTIFICATION DES TRICHOMONADINES DANS LE TUBE DIGESTIF DES VOLAILLES

Histomonas meleagridis est l'agent d'une d'entéro-hépatite grave chez les volailles (McDougald, 2003) et son identification se fait par observation microscopique des selles. Dans ces échantillons, on peut aussi retrouver le straménope *Blastocystis* et les trichomonadines *Tetratrichomonas gallinarum* et *Trichomonas gallinae* facilement identifiables par leurs caractéristiques morphologiques (Mattern et al., 1967 ; Saleudin, 1971) et moléculaires. Récemment, Van der Heijden et al. (2006) ont développé une nouvelle méthode de génotypage d'isolats potentiellement identifiés comme étant *H. meleagridis* et basé sur l'amplification par PCR et le séquençage du domaine ITS1. Ces auteurs ont ainsi pu identifier 3 génotypes différents (I, II et III) mais les séquences d'ITS1 obtenues ne permettent pas d'identifier les espèces de trichomonadines correspondantes. Les sous-types I et II sont très similaires en terme de séquences et sur un plan morphologique et sont associés à des troubles cliniques. Par contre les séquences des isolats du sous-type III montrent des différences importantes avec celles des sous-types I et II. De plus, les microorganismes de ce dernier sous-type correspondent à des cellules de taille plus importante et ne sont pas pathogènes. Nous avons donc obtenu les séquences du gène de l'ARNr 18S pour ces 3 génotypes et les avons intégrées dans une large phylogénie des Parabasalia. Nos données confirment que les sous-types I et II correspondent bien à *H. meleagridis*. Concernant le sous-type III, nous avons pu, sur la base d'anciennes observations (Lund, 1963 ; Honigberg et Kuldova, 1969), l'identifier comme étant *Parahistomonas wenrichi*. Dans notre analyse phylogénétique, *P. wenrichi* est groupe-frère de *H. meleagridis* suggérant une origine évolutive commune. De plus, *Parahistomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* et *T. foetus* forment un groupe très solide. Aussi, si *Histomonas*, *Parahistomonas* et *Dientamoeba* dérivent toutes d'espèces à structure complexe comme *Tritrichomonas*, cela confirme que la simplicité morphologique de ces trois genres est liée à une perte secondaire de certaines structures cytosquelettiques (Gerbod et al., 2001). D'autre part, puisque *Histomonas* et *Parahistomonas* sont phylogénétiquement proches et morphologiquement assez similaires tout en colonisant les mêmes hôtes et niches écologiques, il est donc très probable que la spéciation ayant donné naissance à ces deux espèces soit récente chez des oiseaux infectés par l'ancêtre de ces deux genres. *Parahistomonas* étant le seul représentant non pathogène du groupe constitué avec *Histomonas*, *Tritrichomonas* et *Dientamoeba*, on peut suggérer chez ce microorganisme une perte secondaire de son pouvoir pathogène. Quoiqu'il en soit, on a ici un superbe exemple

d'adaptation de deux organismes à un même hôte après spéciation. Enfin, cette identification permet aux spécialistes de prendre en compte lors de leur diagnostic la présence possible d'organismes morphologiquement et phylogénétiquement proches de *Histomonas*.

V- PHYLOGENIE DES PARABASALIA BASEE SUR LA COMPARAISON DES SEQUENCES DE L'ARNr 18S

Les dernières phylogénies en date et basées sur l'ARNr 18S (Gerbod et al., 2002 ; Hampl et al., 2004, 2006, 2007 ; Ohkuma et al., 2005 ; Carpenter et Keeling, 2007 ; Carpenter et al., 2009) étaient pour de multiples raisons globalement en conflit avec la systématique classique basée quant à elle sur les caractères morphologiques (Honigberg, 1963 ; Brugerolle, 1976). Aussi, après Brugerolle et Lee (2001) et Brugerolle et Patterson (2001), Adl et al. (2005) proposèrent une nouvelle classification des Parabasalia en 4 ordres qui sont les Trichomonadida, Cristamonadida, Trichonymphida et Spirotrichonymphida. C'est cette classification qui va nous servir pour l'instant de support tout au long de cette discussion. Dans les dernières phylogénies moléculaires publiées (Gerbod et al., 2002 ; Hampl et al., 2004, 2006 ; Ohkuma et al., 2005), plusieurs ordres restaient peu représentés comme par exemple les Cristamonadida. Aussi, nous avons cherché à positionner dans nos différents arbres un nombre important de genres appartenant à cet ordre. Globalement, dans nos reconstructions phylogénétiques, nous retrouvons les ordres proposés par Adl et al. (2005) et en particulier les Cristamonadida qui forment un groupe monophylétique bien soutenu. Au sein de ce groupe, on observe, sans rentrer dans les détails, une évolution complexe puisqu'il est composé de deux familles de trichomonadines, les Devescovinidae et Calonymphidae et de deux familles d'hypermastigines, les Joenidae et Deltotrichonymphidae. On note aussi que les Calonymphidae et Devescovinidae sont polyphylétiques. Le cas des Calonymphidae est intéressant puisque la caractéristique morphologique principale de cette famille de Parabasalia est un état plurinucléé pour tous ses représentants (Brugerolle, 1976). Aussi, l'identification dans notre étude de deux groupes de Calonymphidae (groupe *Coronympha* et groupe *Calonympha*) peut donc être le résultat de deux tentatives indépendantes de passage à l'état pluricellulaire. De ce fait, cet état plurinucléé est un critère taxonomique artificiel. Chez les Calonymphidae, la multiplication des noyaux s'est aussi accompagnée de celle des complexes axostyle-pelta. Dans le groupe *Coronympha*, les différents complexes restent séparés dans le cytoplasme alors que dans le groupe *Calonympha* ils sont groupés dans l'axe longitudinal de la cellule. Notre analyse moléculaire suggère alors que l'organisation de ces complexes pourrait être un caractère morphologique valable en taxonomie.

Comme précédemment souligné par Hampl et al. (2004), la création du nouvel ordre des Cristamonadida entraîne en partie la polyphylie ou paraphylie de celui des Trichomonadida.

Plusieurs genres de Trichomonadida sont groupe-frères des Cristamonadida comme *Tritrichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* ou *Monocercomonas*. Ces genres ne possèdent pas de cresta, un caractère morphologique clé à la base de la création des Cristamonadida (Brugerolle et Patterson, 2001). Par contre, certains de ces taxons comme *Tritrichomonas*, *Monocercomonas* et *Histomonas* possèdent bien les 4 cinétosomes privilégiés des Cristamonadida et on sait qu'ils ont été très probablement perdus secondairement chez *Dientamoeba* (Gerbod et al., 2001). D'ailleurs la position de *Tritrichomonas* à la base des Cristamonadida serait en corrélation avec certaines hypothèses basées sur les caractères morphologiques (Grassé, 1952 ; Brugerolle, 1976 ; Kirby and Margulis, 1994). En effet, ces derniers auteurs avaient suggéré que les Devescovinidae auraient évolué à partir d'une cellule type *Tritrichomonas* ce qui est en accord avec nos données moléculaires. Si les genres *Tritrichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* et *Monocercomonas* étaient englobés au sein des Cristamonadida, seul la trichomonadine *Hexamastix* n'émergerait pas au sein des Trichomonadida. En effet, ce genre qui a le cytosquelette simple des Monocercomonadidae, émerge curieusement à proximité ou au sein des hypermastigines de l'ordre des Spirotrichonymphida. Pour expliquer cette émergence inattendue, on peut remarquer dans nos arbres une longueur de branche très longue pour *Hexamastix* qui pourrait témoigner d'une vitesse d'évolution rapide du gène marqueur entraînant une position faussée. Les deux ordres Spirotrichonymphida et Trichonymphida forment quant à eux deux groupes bien soutenus dans nos reconstructions. Nous confirmons ainsi que les hypermastigines se répartissent dans trois des 4 ordres de cette nouvelle systématique. Ainsi, même si la classification de Adl et al. (2005) est sur de nombreux points en corrélation avec nos phylogénies moléculaires, elle ne règle pourtant pas tous les problèmes et il reste encore des incertitudes quant à la position de certains taxons et des contradictions notables en particulier en ce qui concerne la création de l'ordre des Trichomonadida dans sa composition actuelle.

VI- PHYLOGENIE DES PARABASALIA BASEE SUR LA COMPARAISON DES SEQUENCES DE LA GAPDH

Ces incertitudes et contradictions pourraient être levées par l'addition de nouveaux taxons mais aussi par l'utilisation d'autres indicateurs moléculaires. Ce fut notre démarche par l'utilisation d'un second marqueur en l'occurrence la GAPDH. Cette étude faisait suite à celles de Gerbod et al. (2004) et Ohkuma et al. (2007) basées sur le même indicateur mais englobant un échantillonnage d'espèces encore trop limité. Il est bon de rappeler que ce gène a une origine bactérienne chez les Parabasalia (Viscogliosi et Müller, 1998) mais que le transfert horizontal de ce gène d'une bactérie restant à identifier vers ce groupe de protistes, s'est réalisé très

précocement au cours de l'évolution des Parabasalia. De ce fait, ce marqueur peut être utilisé pour établir les relations de parenté entre les membres actuels de ce groupe d'eucaryotes. Comme précédemment, nous nous sommes focalisés sur l'obtention de séquences pour des taxons encore non intégrés dans les précédentes analyses et appartenant à l'ordre des Cristamonadida. Dans l'arbre phylogénétique reconstruit à partir de toutes les séquences obtenues et celles disponibles dans les bases de données, on identifie les 4 ordres de la classification de Adl et al. (2005). La monophylie des Cristamonadida comme celles d'ailleurs des Spirotrichonymphida et des Trichonymphida sont très bien supportées. Au sein des Cristamonadida, on retrouve la polyphylie des Devescovichidae et Calonymphidae. L'ordre des Trichomonadida n'est toujours pas monophylétique comme dans l'arbre basé sur les séquences de l'ARNr 18S. De plus, *Tritrichomonas* et *Monocercomonas* forment toujours un groupe-frère solide des Cristamonadida. Comme nous l'avons proposé ci-dessus, l'intégration de ce petit groupe de trichomonadines au sein des Cristamonadida ou la création d'un 5^{ème} ordre les incluant rendrait les Trichomonadida monophylétiques. D'autre part, il est clair que la séquence de la GAPDH de *Hexamastix*, taxon problématique dans l'arbre basé sur les séquences de l'ARNr 18S doit être rapidement obtenue afin de clarifier la position phylogénétique de ce genre. Quoiqu'il en soit, la phylogénie obtenue à partir des séquences de la GAPDH montre une excellente résolution des différentes lignées de Parabasalia et est très similaire à celle observée pour l'ARNr 18S en faisant ainsi un très bon indicateur pour des études futures.

VII- PHYLOGENIE DES PARABASALIA BASEE SUR LA COMPARAISON DES SEQUENCES D'AUTRES INDICATEURS

Dans une dernière étude, nous avons encore élargi le nombre de taxons analysés sur la base des séquences de la GAPDH tout en obtenant, pour un échantillonnage d'espèces très large, les séquences d'autres marqueurs comme l'actine et le facteur d'élongation EF-1a. L'arbre basé sur la GAPDH est identique à celui décrit ci-dessus puisque seules deux espèces appartenant à l'ordre des Trichonymphida ont été rajoutées et de ce fait nous ne rediscuterons pas la phylogénie obtenue. Pour ce qui est de l'arbre basé sur l'actine, 3 des 4 ordres de Adl et al. (2005) forment des groupes monophylétiques. Le quatrième, celui des Trichomonadida, forme quant à lui un groupe paraphylétique. Il en est de même avec l'arbre basé sur l'EF-1a tout comme dans la construction réalisée après concaténation des séquences nucléotidiques des 4 molécules en l'occurrence ARNr 18S, GAPDH, actine et EF-1a. On note de nouveau dans ce dernier arbre que *Tritrichomonas* et *Monocercomonas* forment un groupe-frère des Cristamonadida ce qui pourrait, comme nous l'avons proposé ci-dessus, justifier leur intégration

dans cet ordre ou bien valider la création d'un nouvel ordre pour ces différents genres. La création de ce nouvel ordre ne se ferait que sur la base des données moléculaires puisque certains genres qui devraient être inclus dans ce groupe comme *Dientamoeba* ou *Histomonas* ont la particularité d'avoir perdu secondairement la plupart ou voire même toutes leurs structures cytosquelettiques qui pourraient représenter des caractères taxonomiques potentiels (Gerbod et al., 2001). Cette proposition est d'ailleurs en accord avec l'arbre d'une étude précédente obtenu par concaténation des séquences protéiques de 4 marqueurs (GAPDH, enolase, α -tubuline et β -tubuline) mais avec un échantillonnage d'espèces plus limité (Ohkuma et al., 2007) (**Figure 55**).

VIII- PROPOSITION D'UNE NOUVELLE SYSTEMATIQUE DES PARABASALIA

A la toute fin de ma thèse, Cepicka et al. (2010) ont publié une nouvelle phylogénie moléculaire des Parabasalia basée sur la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 18S et englobant la grande majorité des séquences disponibles pour les Parabasalia (**Figure 56**). Dans cette phylogénie qui est très similaire à celles obtenues durant ma thèse, on retrouve les ordres décrits par Adl et al. (2005) tels que les Cristamonadida, Spirotrichonymphida et Trichonymphida. Comme dans tous nos arbres, les Trichomonadida sont polyphylétiques. En effet, comme dans nos phylogénies, on note par exemple que les genres *Monocercomonas*, *Tritrichomonas*, *Dientamoeba* et *Histomonas* ont une émergence proche de celle des Cristamonadida et donc assez éloignée de celle des autres Trichomonadida. A partir de cette phylogénie et en analysant les caractéristiques morphologiques de chacune des lignées identifiées, ces auteurs ont proposé une nouvelle taxonomie des Parabasalia en 6 classes présentées sur les **Figures 56 et 57**. Si on compare cette classification à celle de Adl et al. (2005), les 3 ordres Cristamonadida, Spirotrichonymphida et Trichonymphida sont tout simplement transformés en classes qui sont respectivement les Cristamonadea, Spirotrichonymphea et Trichonymphea. Par contre l'ordre des Trichomonadida est largement modifié et divisé en 3 classes. La première est celle des Tritrichomonadea qui englobe logiquement *Tritrichomonas* et ses taxons associés ce qui est en accord avec nos données moléculaires puisque nous suggérons précédemment la création d'un nouvel ordre ou l'intégration de ces taxons dans l'ordre des Cristamonadida. La seconde est celle des Hypotrichomonadea qui n'englobe que les genres *Hypotrichomonas* et *Trichomitus*. Cette classe est pourtant groupe-frère de membres de la nouvelle classe des Trichomonadea tels que *Trichomonas* et surtout entraîne la polyphylie des Trichomonadea. Pour nous, la création de cette nouvelle classe des Hypotrichomonadea ne se justifie pas et ces deux genres pourraient rester inclus dans la nouvelle classe des Trichomonadea. D'ailleurs, et sans rentrer dans les détails, cette création n'est pas vraiment justifiée par l'analyse

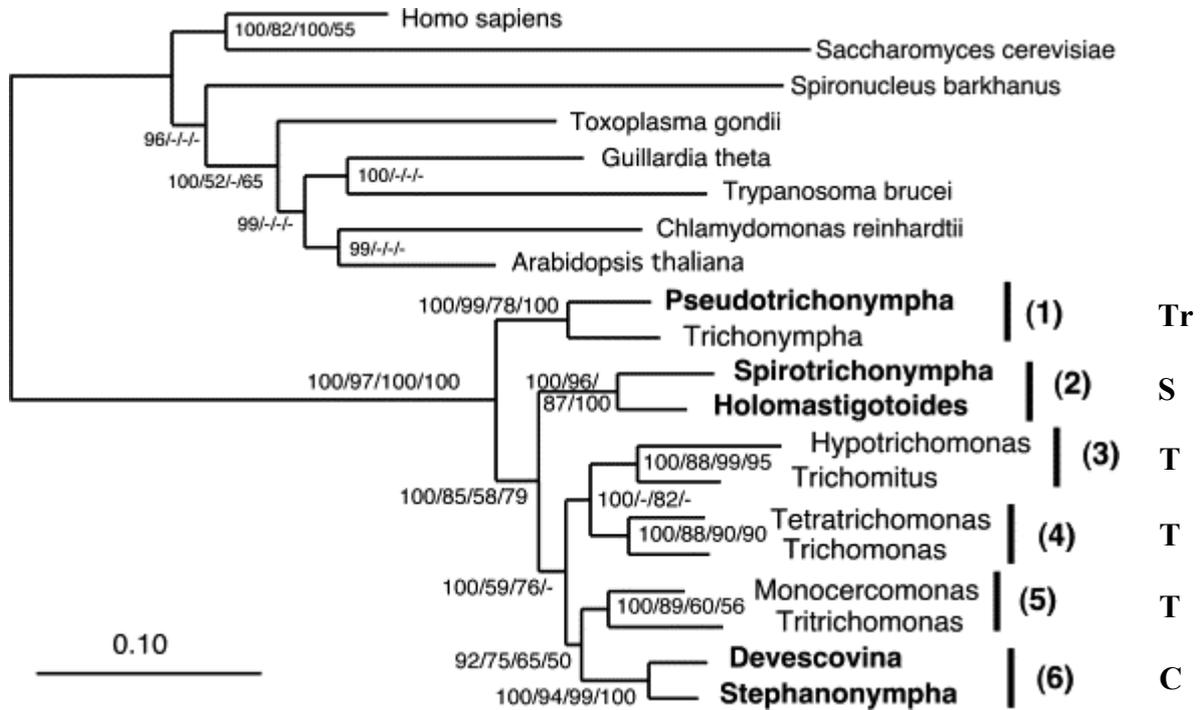


Figure 55 : Phylogénie des Parabasalia basée sur la concaténation des séquences protéiques de la GAPDH, de l'énolase, de l' α -tubuline et de la β -tubuline (d'après Ohkuma et al., 2007). Les ordres proposés par Adl et al. (2005) sont indiqués sur la droite. Abréviations : C : Cristamonadida ; T : Trichomonadida ; S : Spirotrichonymphida ; Tr : Trichonymphida. Noter que les genres *Monocercomonas* et *Tritrichomonas* forment un groupe-frère des Cristamonadida ainsi que la polyphylie des Trichomonadida.

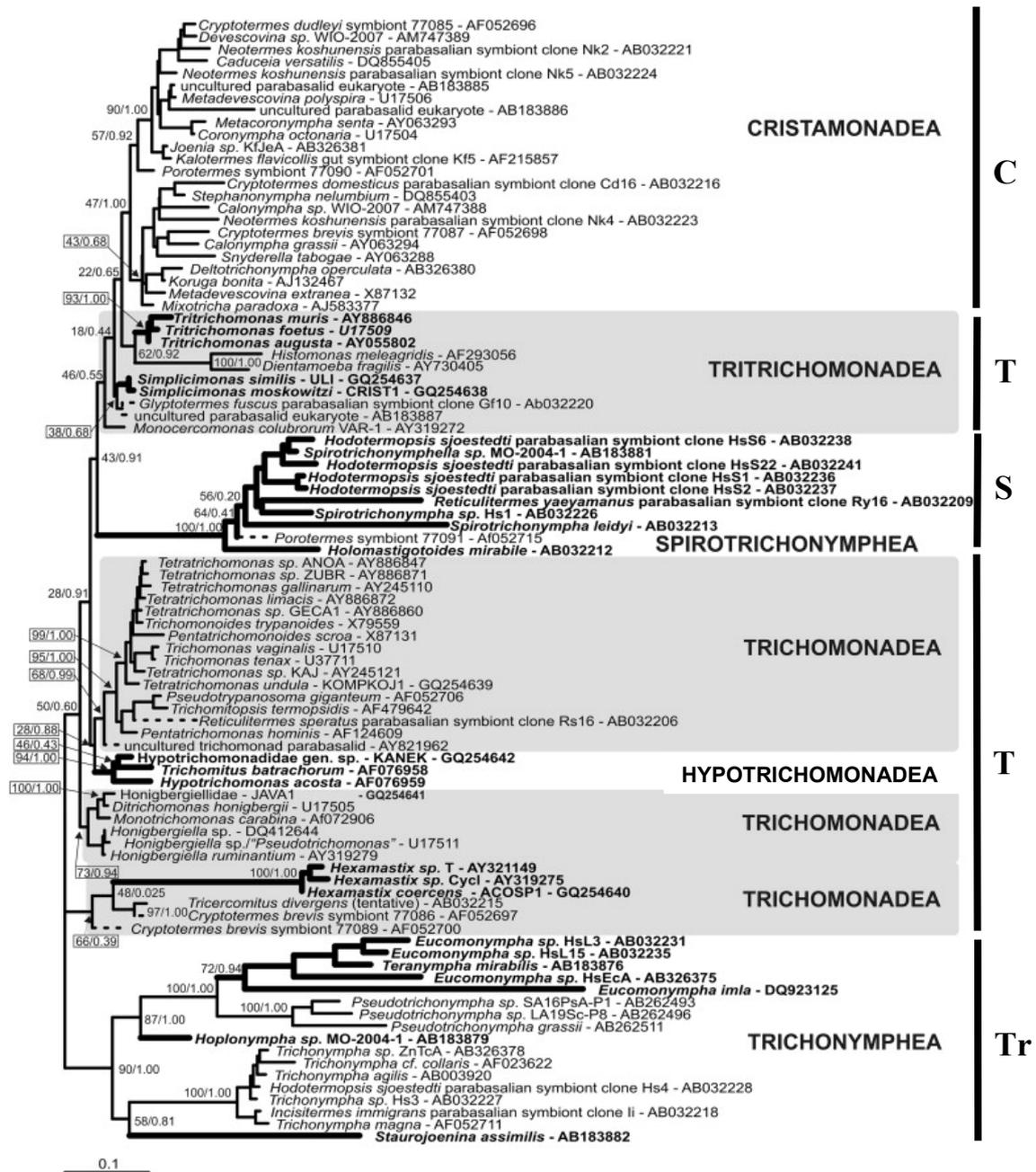


Figure 56 : Phylogénie moléculaire des Parabasalia basée sur la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 18S (d'après Cepicka et al., 2010). A droite sont indiqués les ordres d'après Adl et al. (2005). Abréviations : C : Cristamonadida ; T : Trichomonadida ; S : Spirotrichonymphida ; Tr : Trichonymphida. Les 6 nouvelles classes proposées par ces auteurs sont représentées.

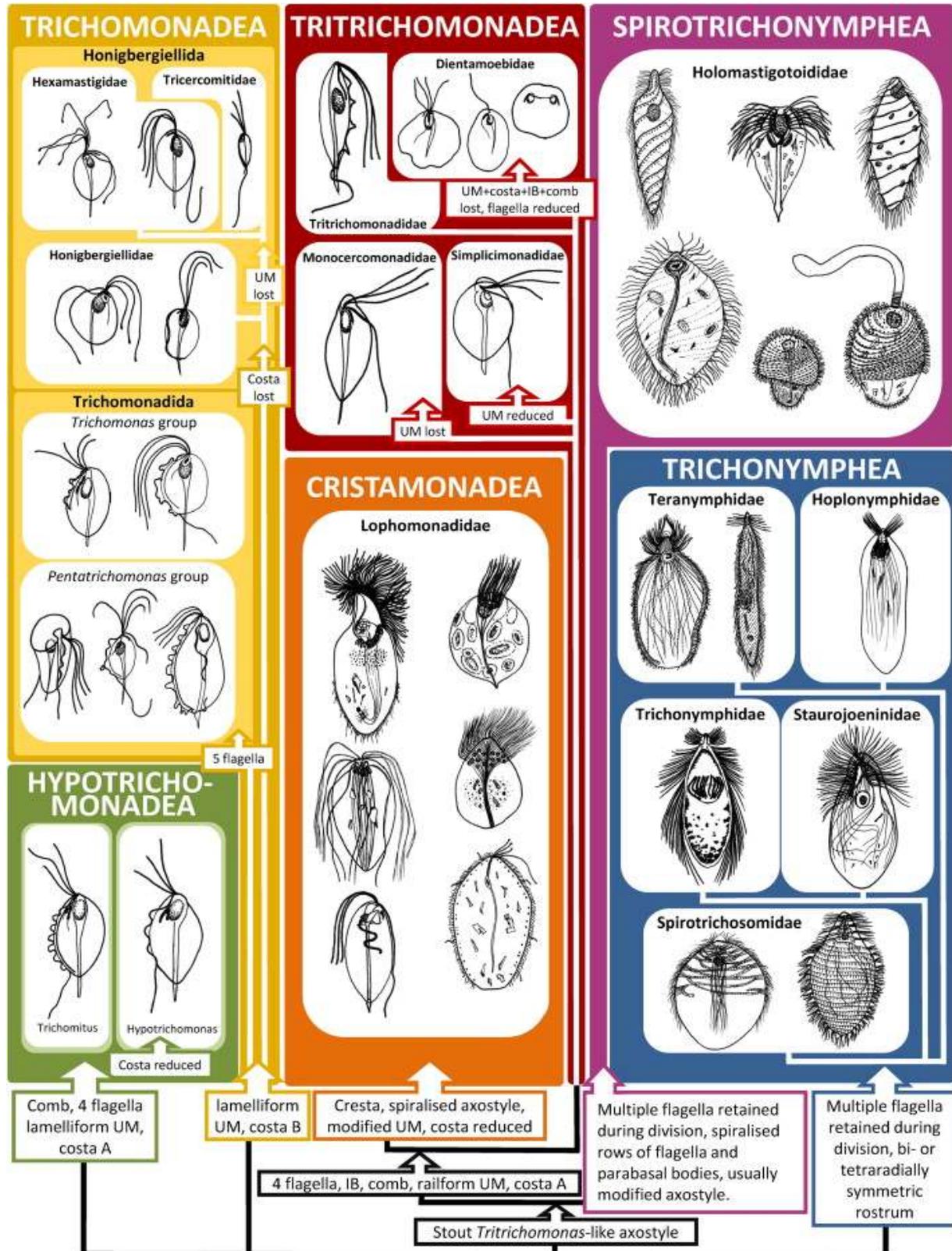


Figure 57 : Nouvelle classification des Parabasalia en 6 classes basée sur les données moléculaires et morphologiques (d'après Cepicka et al., 2010).

des caractères morphologiques. Enfin la dernière classe des Trichomonadea englobe le reste des anciens membres de l'ordre des Trichomonadida. Cependant, on note que la lignée englobant les trichomonadines libres comme *Honigbergiella* et celle incluant les genres *Tricercomitus* et *Hexamastix* émergent indépendamment de celle englobant le reste des Trichomonadea. De ce fait, ces deux lignées pourraient représenter deux nouvelles classes. Cette hypothèse doit être dans l'avenir creusée en analysant de manière plus approfondie les caractères morphologiques propres à chacune de ces lignées et en obtenant les séquences d'autres marqueurs comme la GAPDH pour ces différents taxons.

Analyse et caractérisation d'un processus de mort cellulaire chez *Trichomonas vaginalis*

IX- UNE MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE CHEZ *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Notre équipe avait montré qu'il était possible d'induire une forme de mort cellulaire distincte de la nécrose et de l'autophagie chez *T. vaginalis* en utilisant différents effecteurs telle qu'une drogue pro-apoptotique comme la STS (Chose et al., 2002, 2003). Des observations similaires ont aussi été publiées chez l'espèce voisine *Tritrichomonas foetus* (Mariane et al., 2003, 2006) après induction de l'apoptose avec une drogue bloquant la polymérisation des tubulines, la griséofulvine ou le peroxyde d'hydrogène. Les caractéristiques morphologiques de cette mort cellulaire observée chez ces deux microorganismes présentent beaucoup de similarité avec celles observées lors de l'apoptose chez les métazoaires suggérant qu'un tel mécanisme serait présent chez ces eucaryotes unicellulaires. L'analyse de la cinétique de mort cellulaire sur plusieurs heures réalisée dans cette étude chez *T. vaginalis* après contact avec la STS abonde dans ce sens. Par observation microscopique, les cellules traitées sont arrondies, ont perdu toute mobilité et présentent des vacuoles cytoplasmiques comme décrit précédemment (Chose et al., 2002 ; Mariane et al., 2003, 2006). De plus, elles ont tendance à former des amas qui pourrait être un mécanisme simpliste de protection pour certaines d'entre elles. En effet, mais cela reste à confirmer, les cellules au centre des amas pourraient être moins sensibles à l'action de la drogue au contraire de celles situées en périphérie. Des marquages à l'annexine V-FITC et à l'IP ont été réalisés à différents temps sur des populations parasitaires traitées ou non traitées à la STS avant analyse par cytométrie en flux. Ces résultats de cytométrie en flux sont difficilement interprétables du fait de l'absence de populations bien séparées dans un cadran donné. Cependant, au début de l'expérience, les cellules sont toutes viables donc non marquées, puis elles sont Annexine V-FITC positives et IP négatives (début d'apoptose, membrane intacte) et finalement deviennent Annexine V-FITC positives et IP positives (stade final d'apoptose et de mort). Donc

le léger mouvement de la population cellulaire traitée à travers ces trois stades peut suggérer une mort cellulaire par apoptose induite par la STS chez ce parasite. En parallèle, en marquant l'ADN fragmenté par la méthode TUNEL, on note une augmentation significative du pourcentage de cellules marquées au cours du temps (de 3,2% à 3 h à 22,6% à 11 h). Ces résultats confortent ceux obtenus avec l'Annexine V indiquant que la STS entraînerait une mort des cellules par apoptose puisque cette fragmentation est une des caractéristiques morphologiques de ce type de mort cellulaire.

X- IDENTIFICATION DE METACASPASES CHEZ *TRICHOMONAS VAGINALIS* ET ANALYSE PHYLOGENETIQUE

A ce jour, aucune protéine potentiellement impliquée dans la mort cellulaire chez *T. vaginalis* n'avait été identifiée. Aussi, nous avons réalisé une recherche *in silico* par BLAST dans le programme de séquençage du génome de ce parasite (Carlton et al., 2007) à l'aide de séquences connues comme étant impliquées dans l'apoptose chez les métazoaires. Cette recherche nous a permis d'identifier 11 protéines potentiellement intéressantes, les métacaspases ou MCAs. Ces protéines ont déjà été identifiées chez les plantes, les champignons et les protozoaires et sont considérées comme des caspases primitives (Uren, et al. 2000, Lamkanfi, et al. 2002). Elles partagent donc avec les caspases des homologies de séquence en particulier au niveau du domaine p20 qui englobe la dyade histidine-cystéine du site catalytique de ces protéases. Sur un plan évolutif, il est intéressant de signaler que des protéines bactériennes telles que les gingipaines et clostripaines présentent aussi de fortes homologies de séquence et de structure avec les caspases et MCAs (Aravind et Koonin 2002).

Les séquences protéiques des MCAs identifiées chez *T. vaginalis* ont été dans un premier temps comparées à celles identifiées chez d'autres organismes et à celles des caspases classiques. Plusieurs éléments ressortent de cette comparaison. La première est bien entendu la présence pour toutes les MCAs de *T. vaginalis* du domaine peptidase C14 et de la dyade histidine-cystéine du site catalytique. On peut noter que ce dernier résidu histidine est suivi, pour les MCAs de *T. vaginalis* par une glycine ce qui donne un environnement consensus de type Y(V/T)GHG. Cet environnement est proche de celui observé pour d'autres MCAs comme celles par exemple de *Arabidopsis* (Vercammen et al., 2004 ; Lee et al., 2007 ; Le chat et al., 2007) et les caspases de mammifères (Earnshaw, et al. 1999). Pour ces caspases, ce résidu glycine aurait un rôle de stabilisation du site catalytique lors de leur auto-clivage. La cystéine de la dyade des MCAs de *T. vaginalis* est quant à elle dans un environnement consensus de type D(A/C)CH(S/G)G qui est là encore très similaire à celui observé pour les autres MCAs. Pour les caspases de métazoaires, la

cystéine est dans un environnement du type QAC(R/Q)G où la glutamine coordonnerait la séquestration de l'aspartate P1. Pour les MCAs de *T. vaginalis* comme pour celles d'autres organismes, ce rôle pourrait donc être tenu par un aspartate. On note aussi, pour toutes les MCAs incluant celles de *T. vaginalis*, la délimitation de deux domaines qui correspondraient aux domaines p20 et p10 classiques des caspases, domaines séparés par une région plus variable ou région inter-domaines. En parallèle, l'alignement des séquences protéiques des MCAs de *T. vaginalis* a également permis de les diviser en deux groupes (MCAs courtes et longues) en tenant compte de la présence ou non d'une extension amino-terminale. L'absence de préséquences dans les régions amino-terminales des MCAs longues permettant une éventuelle translocation dans les hydrogénosomes (Carlton et al., 2007) suggérerait une localisation cytosolique de ces protéines. Cependant, pour les deux MCAs longues, nous avons identifié un peptide signal dans cette région suggérant une localisation différente de celles des MCAs courtes et peut être même une fonction différente. Dans le cas des protéases classiques, le peptide signal peut aussi servir à garder la protéine sous une forme inactive. On parle alors de pro-séquence et de maturation de l'enzyme suite à la coupure du peptide signal. Si l'on prend en compte la seconde hypothèse, le peptide signal n'étant présent que pour les MCAs longues, on peut alors logiquement se demander s'il existe une différence d'activation des MCAs longues et courtes. En parallèle, les séquences protéiques des MCAs de *T. vaginalis* ont été englobées dans une large analyse phylogénétique incluant celles disponibles dans les bases de données pour d'autres organismes. Les MCAs de *T. vaginalis* forment un groupe monophylétique très solide et distant des autres groupes de MCAs déjà identifiés (Kosec et al., 2006). Cette distance évolutive importante suggère que les MCAs de *T. vaginalis* pourraient représenter une nouvelle famille de MCAs.

XI- ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES DE MCAS DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* APRES INDUCTION DE L'APOPTOSE

Chez les métazoaires, les caspases existent sous forme de proenzymes inactives et ne sont pas, en général, régulées au niveau transcriptionnel mais plutôt au niveau de leur conformation lors du déclenchement de l'apoptose (Krajewska et al., 1997 ; Earnshaw et al., 1999). Chez *T. vaginalis*, nous avons montré que certains gènes de MCAs présentaient une surexpression dans les heures qui suivent une induction de l'apoptose par la STS. De telles observations ont également été décrites pour les gènes codant les MCAs de type I (AtMCP1a-c) et de type II (AtMCP2b et AtMCP2d) de *A. thaliana* et celui codant la LeMCA1 de *Lycopersicon esculentum* (tomate) suite à l'infection des feuilles de ces deux plantes par des organismes pathogènes (Hoeberichts et al., 2003 ; Watanabe et Lam, 2005). De même, He et al. (2008) ont montré que le

gène codant la MCA AtMC8 de *A. thaliana* était surexprimé suite à un stress oxydatif avec du peroxyde d'hydrogène ou à une exposition aux rayons ultra-violet. Ces données obtenues chez *T. vaginalis*, tout comme chez les plantes, pourrait suggérer une implication de certaines MCAs dans la mort cellulaire à travers un mode de régulation de la transcription ou d'activation de ces MCAs original et en tout cas différent de celui observé pour les caspases.

XII- PRODUCTION DES METACASPASES DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* EN SYSTEME D'EXPRESSION PROCARYOTE

Sur un plan fonctionnel, il a été montré que pour être activées, les MCAs de plantes, de levure et de protozoaires comme *Leishmania* et *Trypanosoma* doivent s'auto-cliver comme les caspases initiatrices de métazoaires. Cet auto-clivage des MCAs est arginine ou lysine spécifique (Madeo et al., 2002 ; Vercammen et al., 2004 ; Gonzalez et al., 2007 ; Moss et al., 2007) alors qu'il est aspartate spécifique pour les caspases des métazoaires (Earnshaw et al., 1999). Le clivage au niveau de la région inter-domaines permet la libération des domaines p20 et p10 potentiels. On note ainsi dans notre alignement incluant toutes les séquences de MCAs de *T. vaginalis*, la présence d'au moins un résidu arginine (R) ou lysine (K) dans la même région inter-domaines de toutes ces protéines.

Les gènes codant les MCAs courtes M5 et M6 et MCAs longues M8 et M9 de *T. vaginalis* ont été produites en système bactérien et purifiées. L'analyse de ces fractions protéiques purifiées par western blot à l'aide d'un anticorps anti-GST montre que 3 d'entre elles (M5, M6 et M9) sont capables de s'auto-cliver dans ces conditions expérimentales (en solution dans du PBS). En effet, pour chacune de ces protéines on note le marquage de plusieurs bandes par western blot en plus de la protéine complète couplée à la GST. Nous avons confirmé la nature de ces bandes supplémentaires par spectrométrie de masse et montré que ces polypeptides correspondent à différents fragments de MCAs couplés à la GST ou bien à la GST seule. Cependant cette technique ne permet pas de localiser avec précision les sites de coupure. On note tout de même que certains polypeptides de poids moléculaire compris entre 45 et 50 kDa pourraient correspondre au domaine p20 potentiel couplé à la GST de certaines MCAs et seraient issus d'un auto-clivage au niveau de la région inter-domaine comme c'est le cas pour les caspases initiatrices des métazoaires (Earnshaw et al., 1999). Par contre, la présence de protéines supplémentaires sur nos marquages ne peut *a priori* s'expliquer que par des clivages supplémentaires. Le mode de clivage des MCAs de *T. vaginalis* semble donc à la fois complexe et original et diffère de celui de certaines autres MCAs étudiées (Madeo et al., 2002 ; Vercammen et al., 2004 ; Watanabe et Lam, 2005 ; Gonzalez et al., 2007 ; Meslin et al., 2007 ;

Moss et al., 2007). On note d'ailleurs une forte similarité avec le clivage séquentiel des gingipaines bactériennes (arginine spécifique) pour lesquelles pas moins de trois clivages successifs sont nécessaires dans le processus d'activation (Mikolajczyk, et al. 2003). Une analyse par séquençage d'Edman de tous ces peptides permettra de localiser les sites potentiels de clivage et de confirmer ce mode de clivage original pour les MCAs de *T. vaginalis*.

D'autre part, on note que la mutation des résidus cystéine et histidine de la dyade du site catalytique inhibe l'auto-clivage des MCAs de *T. vaginalis* comme c'est le cas pour les MCAs de *A. thaliana* (Vercammen et al. 2004, Watanabe et Lam, 2005), *S. cerevisiae* (Madeo et al., 2002) et *L. major* (Gonzalez et al., 2006). Ces deux résidus sont donc comme on pouvait le supposer directement impliqués dans l'auto-clivage des MCAs de *T. vaginalis*. Enfin, comme c'est le cas pour la MCA2 de *T. brucei* (Moss et al., 2007), nos résultats suggèrent un auto-clivage basal des MCAs de *T. vaginalis* qui est renforcé en présence de calcium. Ces auteurs ont aussi proposé que le niveau intracellulaire de calcium pourrait être utilisé par le parasite pour contrôler la fonction physiologique de cette MCA. Une voie de mort cellulaire dépendante du calcium a d'ailleurs été mise en évidence chez *T. brucei* (Ridgley et al., 1999). Moreno et Docampo (2003) ont aussi montré que le calcium était une molécule primordiale dans les voies de signalisation de plusieurs parasites protozoaires incluant *T. vaginalis*.

XIII- ACTIVITE ENZYMATIQUE, SUBSTRATS ET INHIBITEURS DES METACASPASES PURIFIEES DE TRICHOMONAS VAGINALIS

Nous avons mesuré l'activité enzymatique des MCAs M5, M6, M8 et M9 purifiées de *T. vaginalis* via toute une gamme de substrats et inhibiteurs de caspases et métacaspases. La plus forte activité est observée avec les substrats spécifiques des métacaspases. Par contre, aucune activité n'est observée avec un substrat de caspase. Cette activité est de plus inhibée lors de l'utilisation d'antipaine, de leupeptine ou de Z-FK-cmk (inhibiteurs de métacaspases) ou encore lorsque les résidus histidine ou cystéine du site catalytique sont mutés. L'activité enzymatique est également inhibée en présence d'un chélateur de calcium, l'EGTA. Ces résultats suggèrent donc que les MCAs M5, M6, M8 et M9 de *T. vaginalis* sont des cystéine protéases arginine/lysine spécifiques comme toutes les MCAs décrites précédemment (Madeo et al., 2002 ; Bozhkov et al., 2004 ; Vercammen et al., 2004 ; Watanabe et Lam, 2005, Gonzalez et al., 2006 ; Hamann et al., 2007 ; Lee et al., 2007 ; Moss et al., 2007, He et al., 2008). Cette activité est de plus calcium dépendante comme celle des MCAs MCA2 de *T. brucei* et AtMCP2b et AtMCP2d de *A. thaliana* (Watanabe et Lam, 2005 ; Moss et al., 2007). En parallèle, nous avons aussi montré que le pH optimum d'activité des différentes MCAs était variable et compris entre 6 et 8.

Cependant, pour toutes les MCAs de *T. vaginalis*, on observe une activité forte ou maximale à pH = 7 qui est le pH du cytoplasme. Tout laisse donc penser que ces MCAs ont donc une localisation cytosolique comme nous l'avons déjà suggéré auparavant sur la base de l'analyse de leurs séquences protéiques.

Pour l'instant, on ne peut pas dire si l'activité endopeptidase des MCAs est liée à leur auto-clivage ou en d'autres termes si ces protéines ne sont actives que lorsqu'elles sont clivées. Il nous faudra pour cela identifier les sites potentiels de clivage des MCAs et muter les résidus correspondants. Nous avons montré que la MCA M8 ne s'auto-clive pas après production en système bactérien et en solution dans le PBS. Cependant, nous n'avons pas mesuré l'activité enzymatique de cette MCA dans ces conditions. De plus, elle est active dans son tampon d'activation où elle s'auto-clive. Dans ce tampon, toutes les MCAs étudiées sont actives et auto-clivées ce qui laisserait penser que cet auto-clivage est essentiel à leur activité. Gonzalez et al. (2007) ont d'ailleurs montré que l'activité enzymatique de la MCA LmjMCA de *L. major* est augmentée après son auto-clivage. L'auto-clivage est aussi considéré comme essentiel pour l'activité des MCAs de plantes et de levure (Madeo et al., 2002 ; Vercammen et al., 2004). *A contrario*, Moss et al. (2007) ont montré que l'autoclivage de la MCA2 de *T. brucei* n'était pas nécessaire pour son activité enzymatique.

Lors de l'analyse en spectrométrie de masse des peptides contenus dans l'échantillon de la MCA M6 purifiée, nous avons identifié le facteur d'élongation EF-tu de *E. coli*. Il se peut que lors de la production de M6 en bactérie, EF-tu se soit associé à M6 comme c'est le cas pour un substrat et son enzyme. De ce fait, EF-tu a été co-purifié en même temps que la MCA M6. Récemment, Moss et al. (2007) ont aussi co-purifié le facteur d'élongation EF-tu avec la MCA2 de *T. brucei* et ont montré que cette protéine pouvait être clivée par MCA2. Afin de vérifier cette hypothèse chez *T. vaginalis*, nous avons produit et purifié la protéine EF-tu de *E. coli* puis l'avons mise en contact avec la fraction purifiée de la MCA M6. Dans le tampon d'activation des MCAs, la protéine EF-tu est clivée à plusieurs endroits par la MCA M6. De plus, la MCA M6 mutée au niveau du site catalytique ne coupe pas EF-tu. Ces résultats montrent que EF-tu constituerait bien un substrat de la MCA M6 de *T. vaginalis*. Il serait maintenant intéressant d'étudier l'activité catalytique des autres MCAs de *T. vaginalis* avec le facteur EF-tu afin de vérifier s'il représente un substrat spécifique de la MCA M6. En parallèle, un séquençage d'Edman nous permettra d'identifier précisément les différents sites de clivage de ce substrat. Nous allons aussi produire le facteur d'élongation EF-1 α de *T. vaginalis* (numéro d'accès à la GenBank : XP_001325483) afin d'analyser l'activité protéase de la MCA M6 avec un substrat endogène. Vu le rôle majeur du facteur d'élongation Tu chez les procaryotes ou du facteur d'élongation EF-1 α chez les eucaryotes dans la biologie de la cellule en particulier lors de la

biosynthèse des protéines (Sprinzl, 1994), son inactivation entraîne très probablement la mort de la cellule. Geourgiou et al. (1998) ont montré que lorsque une souche bactérienne K12 de *E. coli* est infectée par un phage, elle met en place un système visant à empêcher la multiplication du phage qui consiste en la protéolyse de EF-tu. C'est donc une stratégie d'induction de mort en ciblant les principaux processus cellulaires. De même, suite à l'infection par un adénovirus, une cellule humaine stoppe la synthèse protéique à travers la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF-2 (Schneider et Shenk, 1987). De la même manière, le facteur d'élongation de *T. vaginalis* pourrait constituer une cible des protéases impliquées dans la mort cellulaire de ce dernier.

XIV- PRODUCTION DES METACASPASES DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* EN SYSTEME D'EXPRESSION EUCARYOTE ET ANALYSE DE LEUR ACTIVITE ENZYMATIQUE

A des fins de comparaison, nous avons produit les MCAs M6 et M9 de *T. vaginalis* en système levure. Contrairement à ce que l'on avait pu observer en système procaryote, ces protéines ne présentent pas d'auto-clivage lorsqu'elles sont produites en système eucaryote. Pour expliquer cela plusieurs hypothèses peuvent être avancées. La première est que nous avons utilisé pour réaliser notre western blot des lysats cellulaires correspondant aux levures produisant les MCAs et non des fractions purifiées de MCAs comme pour la production en système procaryote. Il est donc possible que les MCAs produites en levure subissent un auto-clivage mais que la quantité de protéines totales déposée soit trop faible pour détecter les produits d'auto-clivage. Une seconde hypothèse est liée au rendement de protéines produites en bactérie qui est en moyenne 10 fois plus important que celui des protéines produites en levure (Buckholz et Gleeson, 1991). Or il a été montré que lors d'une production en bactérie, les pro-caspases initiateuses s'activent par auto-clivage (Earnshaw et al., 1999) ce qui laisse penser que la concentration en pro-caspase est suffisamment élevée pour reproduire le modèle de proximité en absence de plateforme d'activation. On peut suggérer un même mécanisme pour les MCAs produites en bactérie telles que celles de *T. vaginalis*. En revanche la production de protéines en levure étant bien moindre, ce mécanisme ne peut donc pas avoir lieu. Une autre hypothèse est que les MCAs M6 et M9 produites en levures puissent avoir besoin d'un stimulus comme un choc oxydatif par addition de peroxyde d'hydrogène pour s'auto-cliver comme c'est le cas pour la MCA AtMCP1b de *A. thaliana* (Watanabe et Lam, 2005). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait donc analyser par western blot les protéines produites après mise en contact des levures avec du peroxyde d'hydrogène. Dans ce cas, on peut suggérer qu'un signal apoptotique puisse induire la formation d'un complexe tel que l'apoptosome dans lequel les MCAs se

concentreraient, s'auto-cliveraient et donc s'activeraient. Enfin, la dernière hypothèse est que ces MCAs produites en système levure ne soient tout simplement pas fonctionnelles et ne peuvent donc pas s'auto-cliver. Pour vérifier cette dernière hypothèse, nous avons déterminé leur activité enzymatique et montré que les lysats cellulaires contenant M6 ou M9 présentent tous deux une activité peptidase avec des substrats synthétiques ayant un résidu basique en position P1 ce qui infirme la dernière hypothèse. Cette activité est inhibée par des inhibiteurs classiques de MCAs. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus pour ces deux mêmes MCAs produites en système procaryote.

XV- ANALYSE FONCTIONNELLE DES METACASPASES DE *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Afin de confirmer le rôle potentiel des MCAs dans le processus de mort cellulaire chez *T. vaginalis*, nous avons tenté une première approche par complémentation fonctionnelle chez la levure. L'équipe du Pr. Fasel (Lausanne, Suisse) a utilisé la levure *S. cerevisiae* en tant que système hétérologue pour étudier la fonction de la MCA LmjMCA de *L. major* dans la mort cellulaire (Gonzalez et al., 2006). Watanabe et Lam (2005) ont fait de même pour étudier les MCAs de *A. thaliana*. Le principe est basé sur le fait que *S. cerevisiae* présente un gène unique appelé *YCA1* qui code une MCA ayant la propriété de s'auto-cliver et qui montre une activité caspase entraînant la mort de la cellule. Il est possible de transférer une souche de *S. cerevisiae* déficiente pour le gène *YCA1* (notée $\Delta YCA1$) avec un plasmide d'expression codant un gène de MCA d'intérêt. Le but est de savoir si cette MCA peut entraîner ou non la mort de la levure par complémentation sous l'effet du peroxyde d'hydrogène. Nous avons donc tenté cette approche en vue d'étudier la fonction des MCAs M6 et M9 de *T. vaginalis*. Pour cela, nous avons utilisé les mêmes constructions que précédemment c'est-à-dire les gènes des MCAs M6 et M9 clonés dans le vecteur d'expression pESC-HIS. Les vecteurs ainsi construits ont été transférés dans la souche de *S. cerevisiae* $\Delta YCA1$. Le même vecteur avec le gène codant *YCA1* et le vecteur vide (témoins positif et négatif) ont été transférés dans cette même souche de levure. Nous avons alors suivi le protocole décrit par Gonzalez et al. (2006). Cependant, après de multiples essais, l'expérience n'a jamais abouti du fait de l'absence de contrôles positif et négatif validés. En effet, le fait de transférer la souche de *S. cerevisiae* $\Delta YCA1$ avec *YCA1* devrait rétablir le phénotype sauvage de celle-ci. Donc cette souche, sous l'induction du peroxyde d'hydrogène, devrait entrer en apoptose plus rapidement que la souche $\Delta YCA1$ transférée avec le vecteur vide. Cependant, ce n'était pas le cas, et les 2 souches transférées mourraient à la même vitesse. Nous avons d'ailleurs déterminé l'activité enzymatique de la MCA *YCA1* de la levure. Celle-ci s'est révélée très faible pour ne pas dire nulle puisqu'elle est quasiment identique à celle du vecteur vide, ce

qui revient à dire qu'il n'y a pas d'activité enzymatique dans le lysat. Ceci expliquerait le fait que l'expérience visant à déterminer la fonction des MCAs de *T. vaginalis* n'ait pas fonctionné et nous interroge sur la pertinence des données publiées à l'aide de ce système hétérologue.

Cette première approche expérimentale n'ayant pas donné les résultats escomptés, nous sommes retournés sur une approche d'ARN anti-sens en transfectant des cellules de *T. vaginalis* avec le vecteur pBSneo dans lequel ont été clonés les gènes codant les MCAs M6 et M9 soit en sens soit en anti-sens. L'intérêt est qu'en utilisant le même plasmide, on peut détecter la protéine dont le gène a été cloné en sens couplée à un tag à l'aide d'un anticorps anti-tag ou bien invalider ce même gène lorsqu'il est cloné en anti-sens par ARN anti-sens. Cette approche a déjà fait ses preuves par exemple pour l'étude fonctionnelle de protéines d'adhésion chez ce parasite (Mundodi et al., 2004 ; 2006). En utilisant les constructions sens, nos résultats montrent d'abord que les MCAs ainsi produites chez *T. vaginalis* ne s'auto-clivent pas. Cela peut s'expliquer par une concentration probablement faible de MCAs chez les parasites transfectés puisque le système utilisé n'a pas pour vocation d'entraîner une surproduction des protéines au contraire du système bactérie et dans une moindre mesure du système levure. D'ailleurs les activités enzymatiques des MCAs mesurées à partir des lysats de parasites transfectés ou non transfectés avec le substrat Boc-GRR sont très similaires (résultats non montrés). Il est aussi possible que ces MCAs ne soient pas actives sans stimulus. Nous allons donc réitérer l'expérience à partir de parasites mis en contact avec la STS tout en cherchant à localiser ces MCAs dans la cellule par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-tag.

Nos données préliminaires concernant l'approche d'ARN anti-sens apporte des résultats très encourageants. Dans ces expériences, nous avons induit la mort cellulaire par la ménadione, un donneur d'anions superoxyde. En effet, l'induction par la STS est trop lente et la présence des corps apoptotiques et débris en fin d'expérience peut fausser les comptages. Les parasites transfectés avec la construction anti-sens montrent une mortalité plus faible d'environ 10% tout au long de l'étude par rapport aux parasites transfectés avec la construction sens. Les résultats obtenus sont très similaires pour les deux MCAs étudiées M6 et M9 et suggèrent donc que ces protéines seraient directement impliquées dans la mort du parasite. Ce pourcentage aux environs de 10% de baisse de mortalité peut paraître faible mais il faut rappeler que pas moins de 11 gènes de MCAs ont été identifiés chez *T. vaginalis*. En invalidant un seul gène de MCA, dix autres sont potentiellement exprimés et les MCAs correspondantes fonctionnelles. Même si les caractéristiques morphologiques de la mort induite par la ménadione sont similaires à celles observées pour la STS, nous allons quand même suivre l'évolution de cette population cellulaire traitée par marquages à l'annexine V, l'IP et TUNEL. De plus, il nous faut aussi vérifier par Q-

PCR que l'expression des deux gènes M6 et M9 est bien nulle chez les parasites transfectés avec les constructions anti-sens.

XVI- PRESENCE POTENTIELLE D'AUTRES VOIES DE MORT CELLULAIRE CHEZ *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Toutes les données obtenues jusqu'à présent laisse supposer la présence d'un mécanisme de mort cellulaire par apoptose chez *T. vaginalis*. Cette voie serait donc caspase-dépendante ou plutôt métacaspase-dépendante et l'hydrogénosome *a priori* n'aurait pas de rôle majeur dans ce mécanisme. Cependant il est possible que d'autres voies de mort cellulaire soient présentes chez le parasite. En effet, en analysant dernièrement de manière encore plus approfondie le génome de *T. vaginalis*, nous avons d'abord pu identifier 6 protéines homologues aux DNases NM23 des métazoaires. Ces dernières sont impliquées dans une voie d'apoptose récemment caractérisée chez les métazoaires (Fan et al., 2003 ; Martinvalet et al., 2005) et mettant en jeu un complexe protéique constitué principalement des protéines NM23 et de leur inhibiteur SET. Sous cette forme complexée, la protéine NM23 est inactive et il faut l'intervention de la granzyme A présente dans les granules cytotoxiques des cellules Natural Killer et des lymphocytes T cytotoxiques pour cliver la liaison entre SET et NM23. Cette granzyme A est introduite dans les cellules cibles (cellules infectées par un virus ou cellules tumorales) par les perforines produites aussi par les mêmes cellules du système immunitaire. L'inhibiteur SET étant un substrat de granzyme A, il est détruit suite à l'entrée de cette protéase dans la cellule. Par conséquent, l'endonucléase NM23-H1 est libérée et va alors cliver l'ADN de la cellule cible au niveau d'un seul brin (« nicking »), ce qui fait la particularité de cette voie. Curieusement, aucune protéine orthologue à SET ou à granzyme A n'ont pu être identifiés dans notre recherche *in silico* ce qui nous interroge sur les modes de régulation au niveau transcriptionnel et d'activation de ces DNases potentielles.

D'autre part, l'observation microscopique des cellules traitées à la STS (comme avec la ménadione) a révélé la présence de vacuoles cytoplasmiques dans de nombreuses cellules, observations déjà faites précédemment par notre équipe (Chose et al., 2002, 2003). Chez le parasite voisin, *T. fetus*, la présence de telles vacuoles a également été observée après traitement à la griséofulvine (Mariane et al., 2006). Ces auteurs ont montré *via* l'utilisation d'acridine orange et de didansylcadavérine que ces vacuoles étaient en fait des autophagosomes, structures habituellement impliquées dans la mort cellulaire par autophagie (Rodriguez-Enriquez et al., 2006). Une expérience similaire pourrait être réalisée chez *T. vaginalis* afin de déterminer la nature des vacuoles observées. Chez de nombreux organismes unicellulaires tels que *T. cruzi*

(Menna-Barreto et al., 2009), *Blastocystis hominis* (Yin et al., 2010b) ou encore *L. donovani* (Bera et al., 2003), les caractéristiques morphologiques d'une mort cellulaire par autophagie ont été observées et des gènes homologues aux gènes ATG impliqués dans l'autophagie (Besteiro et al., 2006 ; Suzuki et Ohsumi, 2007 ; Alvarez et al., 2008a, b ; Koopman et al., 2009) ont été identifiés. Nous avons également identifié des gènes homologues à ATG8 et ATG4 de *S. cerevisiae* dans le génome de *T. vaginalis* lors de notre dernière analyse *in silico*. Tout porte donc à croire qu'une autre forme de mort cellulaire serait présente chez *T. vaginalis*. Il est possible que selon les conditions environnementales ou la nature d'un stimulus, une voie est préférentiellement empruntée plutôt qu'une autre comme c'est le cas chez *Blastocystis* (Yin et al., 2010 a, b). Il est clair que la disponibilité d'outils comme par exemple des puces à ADN permettrait d'identifier un maximum de gènes impliqués dans la mort cellulaire de *T. vaginalis*. Un projet de fabrication de puce a été déposé par P. Johnson de l'Université de Los Angeles et nous espérons que ces puces seront disponibles pour la communauté scientifique. Cela dit, ce projet n'est pas aisé et a un coût du fait de la taille du génome de *T. vaginalis*. En effet, avec ses 60000 gènes, il est environ 2 fois plus grand que le génome humain.

Ce travail avait pour but de contribuer à l'étude d'une forme de mort cellulaire très probablement primitive chez les eucaryotes qui serait *a priori* indépendante de la mitochondrie puisque aucune protéine mitochondriale à activité proapoptotique n'a pu être identifiée *in silico* chez *T. vaginalis*. Cette absence pourrait être liée à la transformation en hydrogénosome de cet organelle chez *T. vaginalis* même si on ne peut pas exclure l'hypothèse d'une acquisition postérieure à l'endosymbiose mitochondriale de ces voies mitochondriales chez les autres eucaryotes. Cette forme de mort cellulaire se résumerait pour l'instant chez *T. vaginalis* à une voie caspase-dépendante *via* les métacaspases même si la présence d'une voie caspase-indépendante *via* les DNases NM23 ou d'autophagie n'est pas à exclure. Cela reste à confirmer mais pose déjà la question de l'origine de ces différentes voies. Comme indiqué précédemment, les MCAs présentent des similarités de séquence et de structure avec les gingipaines bactériennes (Aravind et Koonin, 2002 ; Mikolajczyk et al., 2003) et nous avons montré que certaines MCAs de *T. vaginalis* pourraient s'activer *via* un clivage séquentiel similaire à celui observé pour les gingipaines. D'autre part, on sait que les protéines NM23 des eucaryotes comme celles identifiées chez *T. vaginalis*, ont conservé le domaine NDK des bactéries tout en ayant un rôle fonctionnel différent (Lacombe et al., 2000 ; Yoon et al., 2005). L'hypothèse d'une origine bactérienne pour ces deux voies de mort cellulaire serait donc la plus probable (Koonin et Aravind, 2002). Cette origine serait probablement liée à l'endosymbiose mitochondriale et/ou à des transferts horizontaux de gènes. Des analyses structurales et phylogénétiques des protéines

identifiées chez un eucaryote primitif comme *T. vaginalis* pourrait permettre de déterminer l'origine des molécules impliquées dans la mort cellulaire chez les eucaryotes plus évolués.

Il est aussi intéressant de rappeler que bon nombre de souches de *T. vaginalis* sont résistantes au métronidazole (Goldman et al., 2009; Upcroft et al., 2009). Notre projet pourrait donc permettre à terme d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, telles que les MCAs qui sont absentes chez l'homme. L'utilisation de cette cible a d'ailleurs débuté pour *T. brucei* (Berg et al., 2010).

XVII- ROLE DE LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE CHEZ LES EUCARYOTES UNICELLULAIRES

Plusieurs hypothèses basées sur des observations expérimentales ont été émises concernant le rôle et intérêt de la MCP chez les parasites unicellulaires (Lee et al., 2002 ; Nguewa et al., 2004 ; Duszenko et al., 2006 ; Brucchaus et al., 2007 ; van Zandbergen et al., 2010) probablement applicables à *T. vaginalis*. Ainsi, la MCP permettrait de contrôler la population parasitaire à deux niveaux. D'une part, elle permettrait de limiter le nombre de cellules parasitaires chez l'hôte pour une adaptation optimale à leur environnement et donc maintenir un équilibre entre prolifération et mort des parasites. D'autre part, elle permettrait une sélection constante des parasites en maintenant la clonalité de la population ou en éliminant les cellules endommagées voire même les formes non infectieuses. La MCP serait aussi à la base d'une stratégie de défense contre l'hôte. En effet, une cellule qui meurt par MCP n'engendre pas de réaction inflammatoire, et donc ne provoque pas de lésions au niveau des cellules environnantes, car elle est éliminée par phagocytose par les macrophages. De plus, il faut savoir que la MCP permet un ralentissement de la réponse immunitaire de l'hôte car les macrophages secrètent des cytokines anti-inflammatoires après phagocytose d'une cellule morte. Il est concevable de penser que les parasites ont l'habileté à entrer en MCP pour utiliser cette particularité de leur hôte et ainsi maintenir « un silence immunologique » durant l'infection. En effet, il a été montré que des *Leishmania* au stade promastigote ou des *Plasmodium* au stade mérozoite, exposant leurs phosphatidylsérines peuvent induire une libération de cytokines anti-inflammatoires par les macrophages (Van Zandbergen et al., 2006).

Les situations décrites précédemment suggéreraient l'existence d'une sorte d'altruisme chez les organismes unicellulaires et donc une communication entre les cellules. L'étude des bactéries a montré qu'elles étaient capables de communiquer entre elles (quorum sensing), via la sécrétion de facteurs signaux (Greenberg, 2003). Des facteurs signaux ont aussi été identifiés chez *Dictyostelium* (DIF, un composé aromatique chloré) (Saito et al., 2006), *Plasmodium* (acide xanthurenique) (Billker et al., 1998) et *T. brucei* (SIF, un facteur de différenciation) (Vassella et

al., 1997). L'habilité de ces organismes à percevoir leur environnement suggère que les parasites protozoaires peuvent interagir comme des communautés complexes d'une manière analogue aux organismes multicellulaires, faisant de la MCP un instrument essentiel de régulation de la croissance cellulaire afin d'assurer une parasitémie contrôlée et persistante (Tan et Nasirudeen, 2005). Ainsi, les MCP permettant la différenciation, la régulation du nombre de cellules et la défense contre les infections ne seraient pas spécifiques aux organismes pluricellulaires (Ameisen, 1996; Ameisen et al., 1996).

Ainsi, notre projet suscite une question sous-jacente passionnante qui est de savoir si *Trichomonas* est lui-aussi capable d'altruisme. En d'autre terme, est-ce que ce protozoaire est capable de se suicider pour le bienfait de la population ? Cette question reste en suspens jusqu'à une parfaite connaissance des mécanismes impliqués chez ce protozoaire.

A

- Acehan, D., et al.** (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* 9(2): 423-32.
- Adams, J. M. and S. Cory** (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* 281(5381): 1322-6.
- Adl, S. M., et al.** (2005). "The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists." *J Eukaryot Microbiol* 52(5): 399-451.
- Akao, Y., et al.** (1994). "Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes." *Cancer Res* 54(9): 2468-71.
- Akhmanova, A., et al.** (1998). "A hydrogenosome with a genome." *Nature* 396(6711): 527-8.
- Al-Olayan, E. M., et al.** (2002). "Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito." *Int J Parasitol* 32(9): 1133-43.
- Althaus, J., et al.** (2007). "The serine protease Omi/HtrA2 is involved in XIAP cleavage and in neuronal cell death following focal cerebral ischemia/reperfusion." *Neurochem Int* 50(1): 172-80.
- Altschul, S. F., et al.** (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-402.
- Alvarez, V. E., et al.** (2008). "Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*." *J Biol Chem* 283(6): 3454-64.
- Alvarez, V. E., et al.** (2008). "Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic infections?" *Autophagy* 4(3): 361-3.
- Ameisen, J. C.** (1996). "The origin of programmed cell death." *Science* 272(5266): 1278-9.
- Ameisen, J. C.** (2002). "On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years." *Cell Death Differ* 9(4): 367-93.
- Amos, W. B., et al.** (1979). "Structure, protein composition and birefringence of the costa: a motile flagellar root fibre in the flagellate *Trichomonas*." *J Cell Sci* 35: 139-64.
- Andres, M. T., et al.** (2008). "Human lactoferrin induces apoptosis-like cell death in *Candida albicans*: critical role of K⁺-channel-mediated K⁺ efflux." *Antimicrob Agents Chemother* 52(11): 4081-8.
- Antonsson, B., et al.** (2000). "Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria." *Biochem J* 345 Pt 2: 271-8.
- Aravind, L. and E. V. Koonin** (2002). "Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins." *Proteins* 46(4): 355-67.
- Arnoult, D., et al.** (2001). "On the Evolutionary Conservation of the Cell Death Pathway: Mitochondrial Release of an Apoptosis-inducing Factor during *Dictyostelium discoideum* Cell Death." *Mol. Biol. Cell* 12(10): 3016-3030.
- Arroyo, R., et al.** (1993). "Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence." *Mol Microbiol* 7(2): 299-309.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit** (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* 281(5381): 1305-8.

B

- Baptiste, E. and H. Philippe** (2002). "The potential value of indels as phylogenetic markers: position of trichomonads as a case study." *Mol Biol Evol* 19(6): 972-7.
- Baroin, A., et al.** (1988). "Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(10): 3474-8.
- Barrett, A. J. and N. D. Rawlings** (2001). "Evolutionary lines of cysteine peptidases." *Biol Chem* 382(5): 727-33.

- Bellanger, A. P., et al.** (2008). "Two unusual occurrences of trichomoniasis: rapid species identification by PCR." *J Clin Microbiol* 46(9): 3159-61.
- Benchimol, M.** (2009). "Hydrogenosomes under microscopy." *Tissue and Cell* 41(3): 151-168.
- Benchimol, M. and W. De Souza** (1983). "Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*." *J Protozool* 30(2): 422-5.
- Benchimol, M., et al.** (1997). "A double membrane surrounds the hydrogenosomes of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*." *FEMS Microbiol Lett* 154(2): 277-82.
- Benchimol, M., et al.** (1996). "Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study." *Biol Cell* 87(3): 197-205.
- Bera, A., et al.** (2003). "Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides." *Mol Biochem Parasitol* 127(1): 23-35.
- Berchtold, M., et al.** (1995). "Culture and phylogenetic characterization of *Trichomitus trypanoides* Duboscq & Grasse 1924, n. comb.: a trichomonad flagellate isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes santonensis* Feytaud." *J Eukaryot Microbiol* 42(4): 388-91.
- Berchtold M. & König H.** (1995) "Phylogenetic position of the two uncultivated trichomonads *Pentatrichomonoides scroa* Kirby and *Metadevescovina extranea* Kirby from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis* Froggatt." *System. Appl. Microbiol.*, 18:567-573.
- Berg, M., et al.** "Design and evaluation of *Trypanosoma brucei* metacaspase inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett* 20(6): 2001-6.
- Bernardi, P., et al.** (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." *Eur J Biochem* 264(3): 687-701.
- Besteiro, S., et al.** (2006). "Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*." *J Biol Chem* 281(16): 11384-96.
- Billaut-Mulot, O., et al.** (1996). "*Trypanosoma cruzi* elongation factor 1-[alpha]: nuclear localization in parasites undergoing apoptosis." *Gene* 174(1): 19-26.
- Billker, O., et al.** (1998). "Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito." *Nature* 392(6673): 289-92.
- Bishop A.** (1939) "A note upon the systematic position of *Trichomonas Keilini* (Bishop, 1935)." *Parasitology*, 31:469-472.
- Blanchard, H., et al.** (1999). "The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis." *Structure* 7(9): 1125-33.
- Boatright, K. M., et al.** (2003). "A unified model for apical caspase activation." *Mol Cell* 11(2): 529-41.
- Boehning, D., et al.** (2003). "Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis." *Nat Cell Biol* 5(12): 1051-61.
- BonDurant, R. H.** (1997). "Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13(2): 345-61.
- Bondurant, R. H.** (1999). "Inflammation in the bovine female reproductive tract." *J Anim Sci* 77 Suppl 2: 101-10.
- Bozhkov, P. V., et al.** (2004). "VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation." *Cell Death Differ* 11(2): 175-82.
- Bradley, P. J., et al.** (1997). "Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import." *Embo J* 16(12): 3484-93.
- Bratton, S. B., et al.** (2001). "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes." *Embo J* 20(5): 998-1009.
- Breznak, J. A.** (1982). "Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects." *Annu Rev Microbiol* 36: 323-43.
- Bricheux, G., et al.** (2007). "Identification of a new protein in the centrosome-like "attractophore" of *Trichomonas vaginalis*." *Mol Biochem Parasitol* 153(2): 133-40.

- Bruchhaus, I., et al.** (2007). "Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism." *Trends in Parasitology* 23(8): 376-383.
- Brugerolle G.** (1975) "Etude de la cryptopleuromitose et de la morphogenèse de division chez *Trichomonas vaginalis* et chez plusieurs genres de trichomonadines primitives." *Protistologica*, 11:457-468.
- Brugerolle G.** (1976) "Cytologie ultrastructurale, systématique et évolution des Trichomonadida." *Ann. Station Biologique de Besse-en-Chandesse*, 10:1-90.
- Brugerolle G.** (1986) "Séparation des genres *Trimitus* (Diplomonadida) et *Tricercomitus* (Trichomonadida) d'après leur ultrastructure." *Protistologica*, 22:31-37.
- Brugerolle G.** (1999) "Fine structure of *Pseudotrypanosoma giganteum* of *Porotermes*, a trichomonad with a contractile costa." *Europ. J. Protistol.*, 35:121-128.
- Brugerolle G., Breunig A. & König H.** (1994) "Ultrastructural study of *Pentatrachomonoides* sp., a trichomonad flagellate from *Mastotermes darwiniensis*." *Europ. J. Protistol.*, 30:372-378.
- Brugerolle G, Bordereau C** (2004) "The flagellates of the termite *Hodotermopsis sjoestedti* with special reference to *Hoplonympha*, *Holomastigotes* and *Trichomonoides trypanoides* n. comb." *Eur J Protistol* 40:163–174
- Brugerolle G., Lee J.J.** (2001) "Phylum Parabasalia. pp. 1996-1250. In : *The Illustrated Guide to the Protozoa II*. Eds : Lee J.J., Leedale G.F., Bradbury P.C." Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas.
- Brugerolle G, Patterson DJ** (2001) "Ultrastructure of *Joenina pulchella* Grassi, 1917 (Protista, Parabasalia), a reassessment of evolutionary trends in the parabasalids, and a new order *Cristamonadida* for *devescovinids*, *calonymphids* and *lophomonad* flagellates." *Org Divers Evol* 1:147–160
- Brugerolle G. & Viscogliosi E.** (1994) "Organization and composition of the striated roots supporting the Golgi apparatus, the so-called parabasal apparatus, in parabasalid flagellates." *Biol. Cell*, 81:277-285.
- Buckholz, R. G. and M. A. Gleeson** (1991). "Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins." *Biotechnology (N Y)* 9(11): 1067-72.
- Bui, E. T., et al.** (1996). "A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9651-6.
- Burhans, W. C., et al.** (2003). "Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects." *Mutat Res* 532(1-2): 227-43.

C

- Cain, K., et al.** (2000). "Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes." *J Biol Chem* 275(9): 6067-70.
- Camp, R. R., et al.** (1974). "Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell. I. Electronmicroscopic observations of the binucleate stages. II. Taxonomic position and revision of the genus." *J Protozool* 21(1): 69-82.
- Campero, C. M., et al.** (2003). "Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina." *Vet Parasitol* 112(3): 167-75.
- Cande, C., et al.** (2004). "AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis." *Oncogene* 23(8): 1514-21.
- Carlton, J. M., et al.** (2007). "Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*." *Science* 315(5809): 207-212.

- Carpenter, K. J., et al.** (2009). "Morphology, phylogeny, and diversity of *Trichonympha* (Parabasalia: Hypermastigida) of the wood-feeding cockroach *Cryptocercus punctulatus*." *J Eukaryot Microbiol* 56(4): 305-13.
- Carpenter, K. J. and P. J. Keeling** (2007). "Morphology and phylogenetic position of *Eucomonympha imla* (Parabasalia: Hypermastigida)." *J Eukaryot Microbiol* 54(4): 325-32.
- Castella, J., et al.** (1997). "Isolation of the trichomonad *Tetratrichomonas buttreysi* (Hibler et al., 1960) Honigberg, 1963 in bovine diarrhoeic faeces." *Vet Parasitol* 70(1-3): 41-5.
- Cavalier-Smith, T.** (1987). "Eukaryotes with no mitochondria." *Nature* 326(6111): 332-3.
- Cavalier-Smith, T.** (1989). "Molecular phylogeny. Archaeobacteria and Archezoa." *Nature* 339(6220): 100-1.
- Cavalier-Smith T.** (1991) "Cell diversification in heterotrophic flagellates. *In: The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates.*" Patterson D.J. & Larsen J. (eds.), Oxford, pp 113-131.
- Cavalier-Smith, T.** (1993). "Kingdom protozoa and its 18 phyla." *Microbiol Rev* 57: 953 - 994.
- Cavalier-Smith T.** (1997) "Amoeboflagellates and mitochondrial cristae in eukaryote evolution, megasystematics of the new protozoan subkingdoms Eozoa and Neozoa." *Arch. Protistenkd.*, 147:237-258.
- Cavalier-Smith, T.** (1998). "A revised six-kingdom system of life." *Biol Rev Camb Philos Soc* 73(3): 203-66.
- Cavalier-Smith, T.** (2002). "The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa." *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 2): 297-354.
- Cavalier-Smith, T.** (2003). "The excavate protozoan phyla Metamonada Grasse emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa." *Int J Syst Evol Microbiol* 53(Pt 6): 1741-58.
- Cepicka, I., et al.** (2010)"Critical taxonomic revision of Parabasalids with description of one new genus and three new species." *Protist* 161(3): 400-33.
- Cepicka, I., et al.** (2006). "New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*." *Mol Phylogenet Evol* 39(2): 542-51.
- Cepicka, I., et al.** (2005). "Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism." *Vet Parasitol* 128(1-2): 11-21.
- Chai, J., et al.** (2001). "Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding." *Cell* 107(3): 399-407.
- Chang, D. W., et al.** (2003). "Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation." *EMBO J* 22(16): 4132-4142.
- Chang, J. H., et al.** (2006). "Apoptosis of macrophages induced by *Trichomonas vaginalis* through the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase that locates at downstream of mitochondria-dependent caspase activation." *Int J Biochem Cell Biol* 38(4): 638-47.
- Chao, Y., et al.** (2005). "Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation." *PLoS Biol* 3(6): e183.
- Chipuk, J. E., et al.** (2010) "The BCL-2 family reunion." *Mol Cell* 37(3): 299-310.
- Chittenden, T., et al.** (1995). "A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions." *Embo J* 14(22): 5589-96.
- Chose, O., et al.** (2002). "A Form of Cell Death with Some Features Resembling Apoptosis in the Amitochondrial Unicellular Organism *Trichomonas vaginalis*." *Experimental Cell Research* 276(1): 32-39.
- Chose, O., et al.** (2003). "Programmed cell death in parasitic protozoans that lack mitochondria." *Trends Parasitol* 19(12): 559-64.

- Christensen, S. T., et al.** (1998). "Staurosporine-induced cell death in *Tetrahymena thermophila* has mixed characteristics of both apoptotic and autophagic degeneration." *Cell Biol Int* 22(7-8): 591-8.
- Chunge, R. N., et al.** (1991). "Intestinal parasites in a rural community in Kenya: cross-sectional surveys with emphasis on prevalence, incidence, duration of infection, and polyparasitism." *East Afr Med J* 68(2): 112-23.
- Clarke, P. G.** (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." *Anat Embryol (Berl)* 181(3): 195-213.
- Clemens, D. L. and P. J. Johnson** (2000). "Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy." *Mol Biochem Parasitol* 106(2): 307-13.
- Cleveland, L. R.** (1949). "Hormone-induced sexual cycles of flagellates; gametogenesis, fertilization, and meiosis in *Trichonympha*." *J Morphol* 85(2): 197-295.
- Cleveland, L.R.** (1961) "The centrioles of *Trichomonas* and their functions in cell reproduction." *Arch. Protistenkd.*, 105:149-162.
- Cobo, E. R., et al.** (2003). "Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from preputial smegma of virgin bulls." *Vet Parasitol* 117(3): 195-211.
- Cohen, G. M.** (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16.
- Corbeil, L. B.** (1994). "Vaccination strategies against *Trichomonas foetus*." *Parasitol Today* 10(3): 103-6.
- Cotch, M. F., et al.** (1997). "Trichomonas vaginalis associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group." *Sex Transm Dis* 24(6): 353-60.
- Cote, J. and A. Ruiz-Carrillo** (1993). "Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G." *Science* 261(5122): 765-9.
- Cruchten, S. V. and W. V. d. Broeck** (2002). "Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis." *Anatomia, Histologia, Embryologia* 31(4): 214-223.
- Crucitti, et al.** (2010) "*Trichomonas vaginalis* is highly prevalent in adolescent girls, pregnant women, and commercial sex workers in Ndola, Zambia." *Sex. Transm. Dis.* **37**:223-227.
- Cudmore, S. L., et al.** (2004). "Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*." *Clin Microbiol Rev* 17(4): 783-93, table of contents.

D

- Dacks, J. and A. J. Roger** (1999). "The first sexual lineage and the relevance of facultative sex." *J Mol Evol* 48(6): 779-83.
- Dacks, J. B. and R. J. Redfield** (1998). "Phylogenetic placement of *Trichonympha*." *J Eukaryot Microbiol* 45(4): 445-7.
- Danot, O., et al.** (2009). "Wheel of Life, Wheel of Death: A Mechanistic Insight into Signaling by STAND Proteins." *Structure* 17(2): 172-82.
- Delgado-Viscogliosi, P., et al.** (1996). "Tubulin post-translational modifications in the primitive protist *Trichomonas vaginalis*." *Cell Motil Cytoskeleton* 33(4): 288-97.
- Delgado-Viscogliosi, P., et al.** (2000). "Molecular phylogeny of parabasalids based on small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Trichomonadinae subfamily." *J Eukaryot Microbiol* 47(1): 70-5.
- Deponte, M. and K. Becker** (2004). "*Plasmodium falciparum*--do killers commit suicide?" *Trends Parasitol* 20(4): 165-9.
- Desagher, S., et al.** (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." *J Cell Biol* 144(5): 891-901.
- Diamond, L. S.** (1957). "The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures." *J Parasitol* 43(4): 488-90.

- Dive, C., et al.** (1992). "Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry." *Biochim Biophys Acta* 1133(3): 275-85.
- Donepudi, M., et al.** (2003). "Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation." *Mol Cell* 11(2): 543-9.
- Duboucher, C., et al.** (2007a). "Pulmonary superinfection by trichomonads in the course of acute respiratory distress syndrome." *Lung* 185(5): 295-301.
- Duboucher, C., et al.** (2007b). "Pneumocystis pneumonia: immunosuppression, *Pneumocystis jirovecii*...and the third man." *Nat Rev Microbiol* 5(12).
- Duboucher, C., et al.** (2006). "Trichomonads as superinfecting agents in *Pneumocystis pneumonia* and acute respiratory distress syndrome." *J Eukaryot Microbiol* 53 Suppl 1: S95-7.
- Duboucher, C., et al.** (2005). "Frequency of trichomonads as coinfecting agents in *Pneumocystis pneumonia*." *Acta Cytol* 49(3): 273-7.
- Duboucher, C., et al.** (2003). "Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and *Pneumocystis sp.* as a novel manifestation of AIDS." *Hum Pathol* 34(5): 508-11.
- Duboucher, C., et al.** (2008). "Recent advances in pulmonary trichomonosis." *Trends Parasitol* 24(5): 201-2.
- Duszenko, M., et al.** (2006). "Death of a trypanosome: a selfish altruism." *Trends Parasitol* 22(11): 536-42.
- Dyall, S. D., et al.** (2000). "Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria." *Mol Cell Biol* 20(7): 2488-97.
- Dyer B.D.** (1989) "Phylum Zoomastigina Class Parabasalia." *In: Handbook of Protozoology*. Margulis L., Corliss J.O., Melkonian M. & Chapman D.J. (eds.), Jones & Bartlett, Boston, pp 252-258.

E

- Earnshaw, W. C., et al.** (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.
- Edgcomb V.P., et al.** (1998) "New insights into the phylogeny of trichomonads inferred from small subunit rRNA sequences." *Protist*, 149:359-366.
- El-Sherbini, G. T., et al.** (2009). "Efficacy of two plant extracts against vaginal trichomoniasis." *J Egypt Soc Parasitol* 39(1): 47-58.
- Enari, M., et al.** (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* 391(6662): 43-50.
- Er, E., et al.** (2006). "Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax." *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10): 1301-11.
- Eskes, R., et al.** (1998). "Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions." *J Cell Biol* 143(1): 217-24.

F

- Fadok, V. A., et al.** (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." *J Immunol* 148(7): 2207-16.
- Fahrenkrog, B., et al.** (2004). "The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis." *J Cell Sci* 117(Pt 1): 115-26.
- Fan, Z., et al.** (2003). "Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor." *Cell* 112(5): 659-72.

- Farmer M.A.** (1993) "Ultrastructure of *Ditrichomonas honigbergii* n. g., n. sp. (Parabasalia) and its relationship to amitochondrial protists." *J. Eukaryot. Microbiol.*, 40:619-626.
- Felleisen, R. S.** (1997). "Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa." *Parasitology* 115 (Pt 2): 111-9.
- Felleisen, R. S., et al.** (1998). "Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences." *J Clin Microbiol* 36(2): 513-9.
- Fuentes-Prior, P. and G. S. Salvesen** (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." *Biochem J* 384(Pt 2): 201-32.
- Fukura, K., et al.** (1996). "Nucleotide sequence of the SrRNA gene and phylogenetic analysis of *Trichomonas tenax*." *Microbiol Immunol* 40(3): 183-8.

G

- Gannavaram, S., et al.** (2008). "Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites." *J Cell Sci* 121(Pt 1): 99-109.
- Gardner, W. A., Jr., et al.** (1986). "*Trichomonas vaginalis* in the prostate gland." *Arch Pathol Lab Med* 110(5): 430-2.
- Gardner, W. A., Jr., et al.** (1987). "Subepithelial organisms in trichomonal cervicitis." *Diagn Cytopathol* 3(3): 227-9.
- Georgiou, T., et al.** (1998). "Specific peptide-activated proteolytic cleavage of *Escherichia coli* elongation factor Tu." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 2891-5.
- Gerbase, A. C., et al.** (1998). "Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs." *Sex Transm Infect* 74 Suppl 1: S12-6.
- Gerbod, D., et al.** (2001). "Phylogenetic position of the trichomonad parasite of turkeys, *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequence." *J Eukaryot Microbiol* 48(4): 498-504.
- Gerbod, D., et al.** (2002). "Molecular phylogeny of parabasalids inferred from small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Devescovinidae and Calonymphidae (Trichomonadea)." *Mol Phylogenet Evol* 25(3): 545-56.
- Gerbod, D., et al.** (2004). "Molecular phylogenies of Parabasalia inferred from four protein genes and comparison with rRNA trees." *Mol Phylogenet Evol* 31(2): 572-80.
- Germot A., et al.** (1996a) "The undulating membrane of trichomonads – the structure and immunolabelling of its cytoskeleton." *Europ. J. Protistol.*, 32:298-305.
- Germot, A., et al.** (1996b). "Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14614-7.
- Goldman, L. M., et al.** (2009). "Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*." *Sex Health* 6(4): 345-7.
- Goldman, P.** (1980). "Metronidazole: proven benefits and potential risks." *Johns Hopkins Med J* 147(1): 1-9.
- Goldstein, J. C., et al.** (2000). "The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant." *Nat Cell Biol* 2(3): 156-62.
- González, I. J., et al.** (2007). "*Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity." *International Journal for Parasitology* 37(2): 161-172.
- Gookin, J. L., et al.** (2002). "Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces." *J Clin Microbiol* 40(11): 4126-30.
- Gookin, J. L., et al.** (2007). "Identification of *Pentatrichomonas hominis* in feline fecal samples by polymerase chain reaction assay." *Vet Parasitol* 145(1-2): 11-5.

- Gozuacik, D., et al.** (2007). "Autophagy and Cell Death." Current Topics in Developmental Biology, Academic Press. Volume 78: 217-245.
- Grahn, R. A., et al.** (2005). "An improved molecular assay for *Tritrichomonas foetus*." Vet Parasitol 127(1): 33-41.
- Grain, J.** (1986). "The cytoskeleton in protists: nature, structure, and functions." Int Rev Cytol 104: 153-249.
- Grassé P-P.** (1952) "Protozoaires: Généralités. Flagellés." In: Traité de Zoologie. Grassé P-P. (ed.), Masson & Cie, Paris, vol. 1, fasc. 1.
- Greenberg, E. P.** (2003). "Bacterial communication and group behavior." J Clin Invest 112(9): 1288-90.
- Grosovsky B.D.D. & Margulis L.** (1982) "Termite microbial communities." In: Experimental microbial ecology. Burns R.G. & Slater J.H. (eds.), Blackwell Scientific, Oxford, pp 519-532.
- Gunderson, J., et al.** (1995). "Phylogeny of trichomonads inferred from small-subunit rRNA sequences." J Eukaryot Microbiol 42(4): 411-5.

H

- Halestrap, A. P. and C. Brenner** (2003). "The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death." Curr Med Chem 10(16): 1507-25.
- Hamann, A., et al.** (2007). "Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model *Podospira anserina*." Mol Microbiol 65(4): 948-58.
- Hampl, V., et al.** (2004). "Critical analysis of the topology and rooting of the parabasal 16S rRNA tree." Molecular Phylogenetics and Evolution 32(3): 711-723.
- Hampl, V., et al.** (2007). "Morphological and molecular diversity of the monocercomonadid genera *Monocercomonas*, *Hexamastix*, and *Honigbergiella gen. nov.*" Protist 158(3): 365-83.
- Hampl, V., et al.** (2005). "Inference of the phylogenetic position of oxymonads based on nine genes: support for metamonada and excavata." Mol Biol Evol 22(12): 2508-18.
- Hampl, V., et al.** (2009). "Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups"." Proc Natl Acad Sci U S A 106(10): 3859-64.
- Hampl, V., et al.** (2006). "Affiliation of *Cochlosoma* to trichomonads confirmed by phylogenetic analysis of the small-subunit rRNA gene and a new family concept of the order Trichomonadida." Int J Syst Evol Microbiol 56(Pt 1): 305-12.
- Harper, J. T., et al.** (2009). "The inadequacy of morphology for species and genus delineation in microbial eukaryotes: an example from the parabasal termite symbiont *coronympha*." PLoS One 4(8): e6577.
- Hausler, T., et al.** (1997). "Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*." Eur J Cell Biol 73(3): 240-51.
- Hayes, D. C., et al.** (2003). "Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing." J Vet Diagn Invest 15(4): 390-4.
- He, R., et al.** (2008). "Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in Arabidopsis." J Biol Chem 283(2): 774-83.
- Heath B.** (1980) "Variant mitosis in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis?" Int. Rev. Cytol., 64:6-81.
- Hegde, R., et al.** (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." J Biol Chem 277(1): 432-8.
- Hengartner, M. O.** (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature 407(6805): 770-6.
- Hersh, S. M.** (1985). "Pulmonary trichomoniasis and *Trichomonas tenax*." J Med Microbiol 20(1): 1-10.

- Hjort, K., et al.** (2010) "Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1541): 713-27.
- Hoebrechts, F., et al.** (2003). "A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves." *Planta* 217(3): 517-522.
- Hollande A.** (1974) "Etude comparée de la mitose syndinienne et de celle des Péridiniens libres et des Hypermastigines, infrastructure et cycle évolutif des Syndinides parasites de Radiolaires." *Protistologica*, 10:413-451.
- Hollande A. & Valentin J.** (1968) "Morphologie infrastructurale de *Trichomonas* (*Trichomitopsis* Kofoid et Swezy, 1919) *termopsidis*, parasite intestinal de *Termopsis augusticollis* "Walk. Critique de la notion de centrosome chez les Polymastigines. *Protistologica*, 4:127-145.
- Hollande A. & Valentin J.** (1969) "Appareil de Golgi, pinocytose, lysosomes, mitochondries, bactéries symbiotiques, atractophores et pleuromitose chez les Hypermastigines du genre *Joenia*." Affinités entre Joeniidés et Trichomonadines. *Protistologica*, 5:39-86.
- Hollande A. & Carruette-Valentin J.** (1971) "Les atractophores, l'induction du fuseau et la division cellulaire chez les Hypermastigines, étude infrastructurale et révision systématique des Trichonymphines et des Spirotrichonymphines." *Protistologica*, 7:5-100.
- Hollande A. & Carruette-Valentin J.** (1972) "Le problème du centrosome et la cryptopleuromitose atractophorienne chez *Lophomonas striata*." *Protistologica*, 8:267-278.
- Honigberg, B. M. and J. Kuldova** (1969). "Structure of a nonpathogenic histomonad from the cecum of galliform birds and revision of the trichomonad family Monocercomonadidae Kirby." *J Protozool* 16(3): 526-35.
- Honigberg B.M.** (1963) "Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby." *J. Protozool.*, 10:20-63.
- Honigberg B.M., et al.** (1968) "Structure of *Pentatrichomonas hominis* as revealed by electron microscopy." *J. Protozool.*, 15:419-430.
- Honigberg B.M.** (1978) "Trichomonads of importance in human medicine," *In: Parasitic Protozoa.* Kreier J.P. (ed.), Academic Press, New York, 2:275-454.
- Honigberg B.M. & Brugerolle G.** (1990) "Structure". *In: Trichomonads Parasitic in Humans.* Honigberg B.M. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp 2-35.
- Horner, D. S. and T. M. Embley** (2001). "Chaperonin 60 phylogeny provides further evidence for secondary loss of mitochondria among putative early-branching eukaryotes." *Mol Biol Evol* 18(10): 1970-5.
- Horner, P. J., et al.** (1996). "Antigen capture ELISA for the heat shock protein (hsp60) of *Chlamydia trachomatis*." *J Clin Pathol* 49(8): 642-7.
- Huber, K., et al.** (2006). "*Histomonas meleagridis* in turkeys: dissemination kinetics in host tissues after cloacal infection." *Poult Sci* 85(6): 1008-14.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist** (2001). "MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees." *Bioinformatics* 17(8): 754-5.
- Hughes, M. A., et al.** (2009). "Reconstitution of the Death-Inducing Signaling Complex Reveals a Substrate Switch that Determines CD95-Mediated Death or Survival." *Molecular Cell* 35(3): 265-279.

I

- Inbal, B., et al.** (2002). "DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death." *J Cell Biol* 157(3): 455-68.
- Irmeler, M., et al.** (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* 388(6638): 190-5.

J

- Jakobsen, E. B., et al.** (1987). "*Trichomonas* species in a subhepatic abscess." *Eur J Clin Microbiol* 6(3): 296-7.
- Jang, C. W., et al.** (2002). "TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase." *Nat Cell Biol* 4(1): 51-8.
- Jaso-Friedmann, L., et al.** (2000). "Role of nonspecific cytotoxic cells in the induction of programmed cell death of pathogenic protozoans: participation of the Fas ligand-Fas receptor system." *Exp Parasitol* 96(2): 75-88.
- Jensen, E. A. and D. M. Hammond** (1964). "A Morphological Study of Trichomonads and Related Flagellates from the Bovine Digestive Tract." *J Protozool* 11: 386-94.
- Jeong, S. Y., et al.** (2004). "Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers." *Embo J* 23(10): 2146-55.
- Jesus, J. B., et al.** (2004). "*Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate." *Parasitol Res* 93(5): 369-77.
- Jiang, X. and X. Wang** (2000). "Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1." *J Biol Chem* 275(40): 31199-203.
- Jones, D. T., et al.** (1992). "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences." *Comput Appl Biosci* 8(3): 275-82.
- Jongwutiwes, S., et al.** (2000). "*Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(2): 185-6.
- Joyon L., et al.** (1969) "Compléments à l'étude des Trichomonadida et plus particulièrement de leur cinétide." *Protistologica*, 5:309-326.

K

- Kang, T.-B., et al.** (2008). "Mutation of a Self-Processing Site in Caspase-8 Compromises Its Apoptotic but Not Its Nonapoptotic Functions in Bacterial Artificial Chromosome-Transgenic Mice." *J Immunol* 181(4): 2522-2532.
- Kaufmann, T., et al.** (2003). "Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane." *J Cell Biol* 160(1): 53-64.
- Keeling, P. J.** (2002) "Molecular phylogenetic position of *Trichomitopsis termopsidis* (Parabasalina) and evidence for the Trichomitopsiinae." *Europ. J. Protistol.*, 38:279-286.
- Keeling, P. J.** (2007). "Genomics. Deep questions in the tree of life." *Science* 317(5846): 1875-6.
- Keeling, P. J., et al.** (2005). "The tree of eukaryotes." *Trends Ecol Evol* 20(12): 670-6.
- Keeling, P. J. and J. D. Palmer** (2000). "Parabasal flagellates are ancient eukaryotes." *Nature* 405(6787): 635-7.
- Keeling, P. J., et al.** (1998). "Phylogenetic diversity of parabasal symbionts from termites, including the phylogenetic position of *Pseudotrypanosoma* and *Trichonympha*." *J Eukaryot Microbiol* 45(6): 643-50.
- Kerr, J. F., et al.** (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-57.
- Kim, H. E., et al.** (2005). "Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(49): 17545-50.

- Kim, Y. A., et al.** (2010) "PCR detection and molecular characterization of *Pentatrichomonas hominis* from feces of dogs with diarrhea in the Republic of Korea." *Korean J Parasitol* 48(1): 9-13.
- Kirby H.** (1941) "Devescovinid flagellates of termites. I. The genus *Devescovina*." *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 45:1-92.
- Kirby, H. and L. Margulis** (1994). "Harold Kirby's symbionts of termites: karyomastigont reproduction and calonymphid taxonomy." *Symbiosis* 16(1): 7-63.
- Kleina, P., et al.** (2004). "Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences." *Int J Parasitol* 34(8): 963-70.
- Klionsky, D. J., et al.** (2003). "A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes." *Dev Cell* 5(4): 539-45.
- Kluck, R. M., et al.** (1999). "The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol." *J Cell Biol* 147(4): 809-22.
- Kobayashi, T. and H. Endoh** (2005). "A possible role of mitochondria in the apoptotic-like programmed nuclear death of *Tetrahymena thermophila*." *Febs J* 272(20): 5378-87.
- Koopmann, R., et al.** (2009). "*Trypanosoma brucei* ATG8: structural insights into autophagic-like mechanisms in protozoa." *Autophagy* 5(8): 1085-91.
- Korsmeyer, S. J., et al.** (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." *Cell Death Differ* 7(12): 1166-73.
- Kosec, G., et al.** (2006). "Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators." *Mol Biochem Parasitol* 145(1): 18-28.
- Kothakota, S., et al.** (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." *Science* 278(5336): 294-8.
- Kraft, C., et al.** (2009). "Selective types of autophagy in yeast." *Biochim Biophys Acta* 1793(9): 1404-12.
- Krajewska, M., et al.** (1997). "Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease." *Cancer Res* 57(8): 1605-13.
- Krajewski, S., et al.** (1993). "Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes." *Cancer Res* 53(19): 4701-14.
- Krashin, J. W., et al.** (2010) "*Trichomonas vaginalis* prevalence, incidence, risk factors and antibiotic-resistance in an adolescent population." *Sex Transm Dis* 37(7): 440-4.
- Krieger, J. N.** (1995). "Trichomoniasis in men: old issues and new data." *Sex Transm Dis* 22(2): 83-96.
- Kubai, D. F.** (1973). "Unorthodox mitosis in *Trichonympha agilis*: kinetochore differentiation and chromosome movement." *J Cell Sci* 13(2): 511-52.
- Kulda J., et al.** (1986) "Basic structure and function of the trichomonad cell." *Acta Universitatis Carolinae-Biologica*, 30:181-210.
- Kulda, J.** (1999). "Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance." *Int J Parasitol* 29(2): 199-212.
- Kumarswamy, R. and S. Chandna** (2009). "Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them?" *Mitochondrion* 9(1): 1-8.
- Kutisova, K., et al.** (2005). "Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans." *Parasitology* 131(Pt 3): 309-19.
- Kuwana, T., et al.** (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." *Cell* 111(3): 331-42.

L

- Lacombe, M. L., et al.** (2000). "The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases." *J Bioenerg Biomembr* 32(3): 247-58.

- Lamkanfi, M., et al.** (2002). "Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man." *Cell Death Differ* 9(4): 358-61.
- Lavrik, I. N., et al.** (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death." *J Clin Invest* 115(10): 2665-72.
- Le Chat, L., et al.** (2007). "The role of metacaspase 1 in *Plasmodium berghei* development and apoptosis." *Molecular and Biochemical Parasitology* 153(1): 41-47.
- Lee, N., et al.** (2007). "Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*." *Eukaryot Cell* 6(10): 1745-57.
- Lehker, M. W. and J. F. Alderete** (2000). "Biology of trichomonosis." *Curr Opin Infect Dis* 13(1): 37-45.
- Leipe, D. D., et al.** (1993). "Small subunit ribosomal RNA+ of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree." *Molecular and Biochemical Parasitology* 59(1): 41-48.
- Lemasters, J. J., et al.** (2009). "Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death." *Biochim Biophys Acta* 1787(11): 1395-401.
- Levine, B. and D. J. Klionsky** (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." *Dev Cell* 6(4): 463-77.
- Levine, N. D., et al.** (1980). "A newly revised classification of the protozoa." *J Protozool* 27(1): 37-58.
- Li, L. Y., et al.** (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* 412(6842): 95-9.
- Li, P., et al.** (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* 91(4): 479-89.
- Liebhart, D., et al.** (2006). "In-situ hybridization for the detection and identification of *Histomonas meleagridis* in tissues." *J Comp Pathol* 135(4): 237-42.
- Lindmark, D. G. and M. Muller** (1973). "Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism." *J Biol Chem* 248(22): 7724-8.
- Liston, P., et al.** (1996). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes." *Nature* 379(6563): 349-53.
- Liston, P., et al.** (1997). "Life and death decisions: the role of the IAPs in modulating programmed cell death." *Apoptosis* 2(5): 423-41.
- Lithgow, T. and A. Schneider** (2010) "Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1541): 799-817.
- Lockshin, R. A. and Z. Zakeri** (2004). "Apoptosis, autophagy, and more." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(12): 2405-2419.
- Locksley, R. M., et al.** (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104(4): 487-501.
- Lomonosova, E. and G. Chinnadurai** (2008). "BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview." *Oncogene* 27 Suppl 1: S2-19.
- Lorenzo, H. K. and S. A. Susin** (2004). "Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death." *FEBS Lett* 557(1-3): 14-20.
- Lorenzo, H. K., et al.** (1999). "Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death." *Cell Death Differ* 6(6): 516-24.
- Ludovico, P., et al.** (2001). "Saccharomyces cerevisiae commits to a programmed cell death process in response to acetic acid." *Microbiology* 147(Pt 9): 2409-15.
- Lum, J. J., et al.** (2005). "Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6): 439-48.
- Lund, E. E.** (1963). "Histomonas Wenrichi N. Sp. (Mastigophora: Mastigamoebidae), a Nonpathogenic Parasite of Gallinaceous Birds." *J Protozool* 10: 401-4.

Luthi, A. U. and S. J. Martin (2007). "The CASBAH: a searchable database of caspase substrates." *Cell Death Differ* 14(4): 641-50.

M

- Madeo, F., et al.** (1999). "Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast." *J Cell Biol* 145(4): 757-67.
- Madeo, F., et al.** (2002). "A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast." *Mol Cell* 9(4): 911-7.
- McDougald LR** (2003) "Other protozoan diseases of the intestinal tract: trichomoniasis (Blackhead)." In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (eds) *Diseases of poultry*, 11th edn. Iowa State University Press, Ames, pp 1001-1008
- Maiuri, M. C., et al.** (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9): 741-52.
- Majno, G. and I. Joris** (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *Am J Pathol* 146(1): 3-15.
- Malladi, S., et al.** (2009). "The Apaf-1[bulb]procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer." *EMBO J* 28(13): 1916-1925.
- Mallat, H., et al.** (2004). "Molecular characterization of *Trichomonas tenax* causing pulmonary infection." *J Clin Microbiol* 42(8): 3886-7.
- Mariante, R. M., et al.** (2003). "Hydrogen peroxide induces caspase activation and programmed cell death in the amitochondrial *Tritrichomonas foetus*." *Histochem Cell Biol* 120(2): 129-41.
- Mariante, R. M., et al.** (2006). "Cell death in trichomonads: new insights." *Histochem Cell Biol* 125(5): 545-56.
- Martinou, J. C. and D. R. Green** (2001). "Breaking the mitochondrial barrier." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 63-7.
- Martinvalet, D., et al.** (2005). "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis." *Immunity* 22(3): 355-70.
- Marzo, I., et al.** (1998). "The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes." *Biomed Pharmacother* 52(6): 248-51.
- Mateyak, M. K. and T. G. Kinzy** "eEF1A: Thinking Outside the Ribosome". 285: 21209-21213.
- Mattern, C. F., et al.** (1967). "The mastigont system of *Trichomonas gallinae* (Rivolta) as revealed by electron microscopy." *J Protozool* 14(2): 320-39.
- Mattern C.F.T. & Honigberg B.M.** (1971) "Observations on the undulatory motion of the costa in the Zooflagellate *Trichomitopsis termopsisidis*." *Trans. Amer. Micros. Soc. USA*, 90:309-313.
- Mattern C.F.T., et al.**(1972) "Structure of *Monocercomonas* sp. as revealed by electron microscopy." *J. Protozool.*, 19:265-274.
- Mazzoni, C., et al.** (2005). "Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast." *EMBO Rep* 6(11): 1076-81.
- McClelland, R. S., et al.** (2007). "Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition." *J Infect Dis* 195(5): 698-702.
- Meloni, B. P., et al.** (1993). "The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cats from aboriginal communities in the Kimberley." *Med J Aust* 158(3): 157-9.
- Menna-Barreto, R. F., et al.** (2009). "Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*." *Parasitology* 136(5): 499-510.
- Mentel, M., et al.** (2008). "Protein Import into Hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* Involves both N-Terminal and Internal Targeting Signals: a Case Study of Thioredoxin Reductases." *Eukaryotic Cell* 7(10): 1750-1757.

- Meslin, B. t., et al.** (2007). "Features of Apoptosis in *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stage through a Putative Role of PfMCA1 Metacaspase Like Protein." *The Journal of Infectious Diseases* 195(12): 1852-1859.
- Mikolajczyk, J., et al.** (2003). "Sequential autolytic processing activates the zymogen of Arg-gingipain." *J Biol Chem* 278(12): 10458-64.
- Miller, W. C., et al.** (2005). "The prevalence of trichomoniasis in young adults in the United States." *Sex Transm Dis* 32(10): 593-8.
- Miramar, M. D., et al.** (2001). "NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *J Biol Chem* 276(19): 16391-8.
- Monaghan, P., et al.** (1992). "Ultrastructural localization of bcl-2 protein." *J Histochem Cytochem* 40(12): 1819-25.
- Moon, E.-K., et al.** (2009). "Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 168(1): 43-48.
- Moreno, S. N. and R. Docampo** (2003). "Calcium regulation in protozoan parasites." *Curr Opin Microbiol* 6(4): 359-64.
- Moss, C. X., et al.** (2007). "Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing." *FEBS Letters* 581(29): 5635-5639.
- Mottram, J. C., et al.** (2003). "Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa." *Trends in Parasitology* 19(4): 182-187.
- Mukherjee, S. B., et al.** (2002). "Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes." *J Biol Chem* 277(27): 24717-27.
- Muller, M.** (1993). "The hydrogenosome." *J Gen Microbiol* 139: 2879 - 2889.
- Mundodi, V., et al.** (2006). "A novel surface protein of *Trichomonas vaginalis* is regulated independently by low iron and contact with vaginal epithelial cells." *BMC Microbiol* 6: 6.
- Mundodi, V., et al.** (2004). "Silencing the ap65 gene reduces adherence to vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*." *Mol Microbiol* 53(4): 1099-108.
- Muzio, M., et al.** (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex." *Cell* 85(6): 817-27.
- Muzio, M., et al.** (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." *J Biol Chem* 273(5): 2926-30.

N

- Nasirudeen, A. M., et al.** (2004). "Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*." *Microbiology* 150(Pt 1): 33-43.
- Nguewa, P. A., et al.** (2004). "Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness?" *Trends in Parasitology* 20(8): 375-380.
- Nicholson, D. W.** (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." *Cell Death Differ* 6(11): 1028-42.
- Nickel, D. D., et al.** (2002). "An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Trichomonas foetus* in cattle." *Can Vet J* 43(3): 213-6.
- Noel, C., et al.** (2003). "Morphogenesis during division and griseofulvin-induced changes of the microtubular cytoskeleton in the parasitic protist, *Trichomonas vaginalis*." *Parasitol Res* 89(6): 487-94.
- Norberg, E., et al.** (2010) "Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)." *Biochem Biophys Res Commun* 396(1): 95-100.

O

- O'Hara, C. M., et al.** (1980). "Immunoperoxidase staining of *Trichomonas vaginalis* in cytologic material." *Acta Cytol* 24(5): 448-51.
- Oakes, S. A., et al.** (2005). "Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(1): 105-10.
- Oberst, A., et al.** (2010) "Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation." *Journal of Biological Chemistry*: -.
- Ogunsanya, T. I., et al.** (1994). "A study of the aetiological agents of childhood diarrhoea in Lagos, Nigeria." *J Med Microbiol* 40(1): 10-4.
- Ohkuma, M.** (2003). "Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose." *Appl Microbiol Biotechnol* 61(1): 1-9.
- Ohkuma, M.** (2008). "Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites." *Trends Microbiol* 16(7): 345-52.
- Ohkuma, M., et al.** (2005). "Molecular phylogeny of parabasalids inferred from small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Hypermastigea." *Mol Phylogenet Evol* 35(3): 646-55.
- Ohkuma, M., et al.** (1998). "Phylogenetic identification of the symbiotic hypermastigote *Trichonympha agilis* in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus* based on small-subunit rRNA sequence." *J Eukaryot Microbiol* 45(4): 439-44.
- Ohkuma, M., et al.** (2000). "Phylogenetic identification of hypermastigotes, *Pseudotriconympha*, *Spirotriconympha*, *Holomastigotoides*, and parabasalians symbionts in the hindgut of termites." *J Eukaryot Microbiol* 47(3): 249-59.
- Ohkuma, M., et al.** (2007). "Comparison of four protein phylogeny of parabasalians symbionts in termite guts." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42(3): 847-853.
- Ohsumi, Y.** (1994). "[Autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*]." *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 39(4): 632-9.
- Oltvai, Z. N., et al.** (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell* 74(4): 609-19.
- Ott, M., et al.** (2002). "Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1259-63.

P

- Padmanabhan, N., et al.** (2009). "The yeast HtrA orthologue Ynm3 is a protease with chaperone activity that aids survival under heat stress." *Mol Biol Cell* 20(1): 68-77.
- Parker, S., et al.** (2003). "Sample collection factors affect the sensitivity of the diagnostic test for *Trichomonas foetus* in bulls." *Can J Vet Res* 67(2): 138-41.
- Parker, S., et al.** (2001). "Application of a PCR assay to enhance the detection and identification of *Trichomonas foetus* in cultured preputial samples." *J Vet Diagn Invest* 13(6): 508-13.
- Pecka Z., et al.** (1996) "Ultrastructure of *Cochlosoma anatis* Kotlan, 1923 and taxonomic position of the family Cochlosomatidae (Parabasala: Trichomonadida)." *Europ. J. Protistol.*, 32:190-201.
- Petrin, D., et al.** (1998). "Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*." *Clin Microbiol Rev* 11(2): 300-17.
- Petros, A. M., et al.** (2004). "Structural biology of the Bcl-2 family of proteins." *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 83-94.
- Pfaffl, M. W.** (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.

- Philippe, H. and A. Germot** (2000). "Phylogeny of eukaryotes based on ribosomal RNA: long-branch attraction and models of sequence evolution." *Mol Biol Evol* 17(5): 830-4.
- Philippe, H., et al.** (2000). "The new phylogeny of eukaryotes." *Curr Opin Genet Dev* 10(6): 596-601.
- Philippe, H. and J. Laurent** (1998). "How good are deep phylogenetic trees?" *Curr Opin Genet Dev* 8(6): 616-23.
- Phillips, A. J., et al.** (2003). "Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14327-32.
- Picazarri, K., et al.** (2008). "Analysis of autophagy in the enteric protozoan parasite *Entamoeba*." *Methods Enzymol* 451: 359-71.
- Picot, S., et al.** (1997). "Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91(5): 590-1.
- Pinan-Lucarre, B., et al.** (2005). "Accelerated cell death in *Podospora* autophagy mutants." *Eukaryot Cell* 4(11): 1765-74.
- Pindak, F. F., et al.** (1989). "Acquisition and retention of viruses by *Trichomonas vaginalis*." *Genitourin Med* 65(6): 366-71.
- Plumper, E., et al.** (2000). "Competition and protease sensitivity assays provide evidence for the existence of a hydrogenosomal protein import machinery in *Trichomonas vaginalis*." *Mol Biochem Parasitol* 106(1): 11-20.
- Pop, C., et al.** (2006). "The apoptosome activates caspase-9 by dimerization." *Mol Cell* 22(2): 269-75.

R

- Rappelli, P., et al.** (1998). "Mycoplasma hominis parasitism of *Trichomonas vaginalis*." *Lancet* 352(9136): 1286.
- Raveh, T., et al.** (2001). "DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation." *Nat Cell Biol* 3(1): 1-7.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett** (1993). "Evolutionary families of peptidases." *Biochem J* 290 (Pt 1): 205-18.
- Reed, J. C.** (2000). "Mechanisms of apoptosis." *Am J Pathol* 157(5): 1415-30.
- Reggiori, F. and D. J. Klionsky** (2002). "Autophagy in the Eukaryotic Cell." *Eukaryotic Cell* 1(1): 11-21.
- Renatus, M., et al.** (2001). "Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14250-5.
- Rico, E., et al.** (2009). "Leishmania infantum expresses a mitochondrial nuclease homologous to EndoG that migrates to the nucleus in response to an apoptotic stimulus." *Mol Biochem Parasitol* 163(1): 28-38.
- Ridgley, E. L., et al.** (1999). "Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*." *Biochem J* 340 (Pt 1): 33-40.
- Riedl, S. J., et al.** (2001). "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." *Cell* 104(5): 791-800.
- Riedl, S. J. and G. S. Salvesen** (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 405-13.
- Riedl, S. J. and Y. Shi** (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11): 897-907.
- Rizzuto, R., et al.** (1993). "Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria." *Science* 262(5134): 744-7.
- Rizzuto, R., et al.** (2002). "Ca²⁺ on the move: ways and means to translate a multifarious signal." *Trends Pharmacol Sci* 23(8): 348-50.

- Rodriguez-Enriquez, S., et al.** (2006). "Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes." *Autophagy* 2(1): 39-46.
- Rodriguez, J. and Y. Lazebnik** (1999). "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." *Genes Dev* 13(24): 3179-84.
- Roger, A. J., et al.** (1996). "A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14618-22.
- Rong, Y. P., et al.** (2009). "The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34): 14397-402.
- Rothe, M., et al.** (1995). "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." *Cell* 83(7): 1243-52.
- Rubinsztein, D. C., et al.** (2007). "Potential therapeutic applications of autophagy." *Nat Rev Drug Discov* 6(4): 304-12.
- Rustia, M. and P. Shubik** (1972). "Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole." *J Natl Cancer Inst* 48(3): 721-9.
- Rybicka K., et al.** (1972) "Fine structure of the mastigont system in culture forms of *Histomonas meleagridis* (Smith)." *Protistologica*, 8:107-120

S

- Saelens, X., et al.** (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death." *Oncogene* 23(16): 2861-74.
- Saito, T., et al.** (2006). "Identification of new differentiation inducing factors from *Dictyostelium discoideum*." *Biochim Biophys Acta* 1760(5): 754-61.
- Saleh, A., et al.** (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." *J Biol Chem* 274(25): 17941-5.
- Saleudin ASM** (1971) "Fine structure of *Tetratrichomonas limacis* (Dujardin)." *Can J Zool* 50:695-701
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit** (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 10964-7.
- Scaffidi, C., et al.** (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *Embo J* 17(6): 1675-87.
- Schneider, R. J. and T. Shenk** (1987). "Impact of virus infection on host cell protein synthesis." *Annu Rev Biochem* 56: 317-32.
- Schonmann, M. J., et al.** (1994). "Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls." *Vet Rec* 134(24): 620-2.
- Schotte, P., et al.** (1999). "Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases." *FEBS Lett* 442(1): 117-21.
- Schwartzman, R. A. and J. A. Cidlowski** (1993). "Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death." *Endocr Rev* 14(2): 133-51.
- Schwebke, J. R. and E. W. Hook, 3rd** (2003). "High rates of *Trichomonas vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases clinic: implications for screening and urethritis management." *J Infect Dis* 188(3): 465-8.
- Schweichel, J. U. and H. J. Merker** (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." *Teratology* 7(3): 253-66.
- Scorrano, L., et al.** (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis." *Science* 300(5616): 135-9.
- Scott, F. L., et al.** (2009). "The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering." *Nature* 457(7232): 1019-1022.

- Sen, N., et al.** (2004). "Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*." *J Biol Chem* 279(50): 52366-75.
- Sena, A. C., et al.** (2007). "*Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention." *Clin Infect Dis* 44(1): 13-22.
- Shaha, C.** (2006). "Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis." *Indian J Med Res* 123(3): 233-44.
- Sharon, A., et al.** (2009). "Fungal apoptosis: function, genes and gene function." *FEMS Microbiol Rev* 33(5): 833-54.
- Shemarova, I. V.** (2010) "Signaling mechanisms of apoptosis-like programmed cell death in unicellular eukaryotes." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 155(4): 341-53.
- Shi, Y.** (2002). "Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9." *Structure* 10(3): 285-8.
- Shiflett, A. M. and P. J. Johnson** (2010) "Mitochondrion-Related Organelles in Eukaryotic Protists." *Annu Rev Microbiol*.
- Shintani, T. and D. J. Klionsky** (2004). "Autophagy in health and disease: a double-edged sword." *Science* 306(5698): 990-5.
- Shiozaki, E. N., et al.** (2003). "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." *Mol Cell* 11(2): 519-27.
- Shiozaki, E. N., et al.** (2002). "Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4197-202.
- Silberman, J. D., et al.** (1996). "*Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads." *Mol Biochem Parasitol* 76(1-2): 311-4.
- Silke, J., et al.** (2001). "Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP." *Embo J* 20(12): 3114-23.
- Silva, R. D., et al.** (2005). "Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol* 58(3): 824-34.
- Simpson, A. G.** (2003). "Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota)." *Int J Syst Evol Microbiol* 53(Pt 6): 1759-77.
- Simpson, A. G., et al.** (2006). "Comprehensive multigene phylogenies of excavate protists reveal the evolutionary positions of "primitive" eukaryotes." *Mol Biol Evol* 23(3): 615-25.
- Simpson, A. G. and A. J. Roger** (2004). "The real 'kingdoms' of eukaryotes." *Curr Biol* 14(17): R693-6.
- Singh, B. N., et al.** (2004). "*Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells." *Infect Immun* 72(7): 4151-8.
- Sinha, S., et al.** (2008). "Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11." *Autophagy* 4(8): 989-97.
- Smith, L. M., et al.** (2002). "*Trichomonas vaginalis* infection in a premature newborn." *J Perinatol* 22(6): 502-3.
- Sogin M.L.** (1989) "Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs." *Amer. Zool.*, 29:487-499.
- Sogin, M. L.** (1991). "Early evolution and the origin of eukaryotes." *Curr Opin Genet Dev* 1(4): 457-63.
- Sogin, M.** (1997). "History assignment: when was the mitochondrion founded?" *Curr Opin Genet Dev* 7(6): 792-9.
- Sogin, M. L., et al.** (1996). "Ancestral relationships of the major eukaryotic lineages." *Microbiologia* 12(1): 17-28.
- Sogin, M. L. and J. D. Silberman** (1998). "Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics." *International Journal for Parasitology* 28(1): 11-20.
- Sommer, U., et al.** (2005). "Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells." *J Biol Chem* 280(25): 23853-60.

- Sperandio, S., et al.** (2000). "An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14376-81.
- Sperandio, S., et al.** (2004). "Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix." *Cell Death Differ* 11(10): 1066-75.
- Sprinzi, M.** (1994). "Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector." *Trends Biochem Sci* 19(6): 245-50.
- Srinivasula, S. M., et al.** (2000). "Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway." *J Biol Chem* 275(46): 36152-7.
- Srinivasula, S. M., et al.** (2003). "Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2." *J Biol Chem* 278(34): 31469-72.
- Srinivasula, S. M., et al.** (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." *Nature* 410(6824): 112-6.
- Stark, D. J., et al.** (2006). "Dientamoebiasis: clinical importance and recent advances." *Trends in Parasitology* 22(2): 92-96.
- Stennicke, H. R., et al.** (1999). "Caspase-9 can be activated without proteolytic processing." *J Biol Chem* 274(13): 8359-62.
- Stingl, U., et al.** (2005). "'Endomicrobia': cytoplasmic symbionts of termite gut protozoa form a separate phylum of prokaryotes." *Appl Environ Microbiol* 71(3): 1473-9.
- Stratakis, D. F., et al.** (1999). "[Pulmonary trichomoniasis: diagnosis based on identification of irritation in bronchoalveolar lavage]." *Pneumologie* 53(12): 617-9.
- Straube, E., et al.** (1991). "Peritonitis caused by *Trichomonas*-a preliminary case report." *Zentralbl Bakteriol* 275(3): 394-6.
- Suarez, M. F., et al.** (2004). "Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis." *Current Biology* 14(9): R339-R340.
- Susin, S. A., et al.** (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *Nature* 397(6718): 441-6.
- Sutton, M. Y., et al.** (1999). "Trichomoniasis in pregnant human immunodeficiency virus-infected and human immunodeficiency virus-uninfected congolese women: prevalence, risk factors, and association with low birth weight." *Am J Obstet Gynecol* 181(3): 656-62.
- Suzuki, K. and Y. Ohsumi** (2007). "Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 581(11): 2156-61.
- Suzuki, Y., et al.** (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." *Mol Cell* 8(3): 613-21.
- Szallies, A., et al.** (2002). "A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Letters* 517(1-3): 144-150.
- Szarka, K., et al.** (2002). "Neonatal pneumonia caused by *Trichomonas vaginalis*." *Acta Microbiol Immunol Hung* 49(1): 15-9.

T

- Tan, K. S. and A. M. Nasirudeen** (2005). "Protozoan programmed cell death--insights from *Blastocystis* deathstyles." *Trends Parasitol* 21(12): 547-50.
- Taylor, F. J.** (1978). "Problems in the development of an explicit hypothetical phylogeny of the lower eukaryotes." *Biosystems* 10(1-2): 67-89.
- Taylor, R. C., et al.** (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3): 231-241.
- Thornberry, N. A., et al.** (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." *Nature* 356(6372): 768-74.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik** (1998). "Caspases: enemies within." *Science* 281(5381): 1312-6.

- Totino, P. R., et al.** (2008). "Plasmodium falciparum: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure." *Exp Parasitol* 118(4): 478-86.
- Tresse, E., et al.** (2008). "Autophagy and autophagic cell death in *Dictyostelium*." *Methods Enzymol* 451: 343-58.
- Tsai, C. D., et al.** (2002). "Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*." *J Biol Chem* 277(7): 5153-62.
- Tsujimoto, Y., et al.** (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." *Science* 228(4706): 1440-3.
- Turner, G. and M. Muller** (1983). "Failure to detect extranuclear DNA in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*." *J Parasitol* 69(1): 234-6.

U

- Upcroft, J. A., et al.** (2009). "Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* from highland women in Papua New Guinea." *Sex Health* 6(4): 334-8.
- Upcroft, P. and J. A. Upcroft** (2001). "Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa." *Clin. Microbiol. Rev.* 14(1): 150-164.
- Uren, A. G., et al.** (2000). "Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma." *Mol Cell* 6(4): 961-7.
- Uren, A. G., et al.** (1996). "Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 4974-8.

V

- Vachova, L. and Z. Palkova** (2005). "Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia." *J. Cell Biol.* 169(5): 711-717.
- Vahsen, N., et al.** (2006). "Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA." *Oncogene* 25(12): 1763-74.
- Van Bruggen J.J.A., et al.** (1983) "Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa." *Arch. Microbiol.*, 136:89-95.
- Van der Heijden, H. M., et al.** (2006). "Genotyping of *Histomonas meleagridis* isolates based on Internal Transcribed Spacer-1 sequences." *Avian Pathol* 35(4): 330-4.
- Van Der Pol, B.** (2007). "Editorial Commentary: *Trichomonas vaginalis* Infection: The Most Prevalent Nonviral Sexually Transmitted Infection Receives the Least Public Health Attention." *Clinical Infectious Diseases* 44(1): 23-25.
- Van Zandbergen, G., et al.** (2006). "*Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(37): 13837-42.
- Van Zandbergen, G., et al.** (2010) "Programmed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection?" *Trends in Parasitology* In Press, Corrected Proof.
- Vardi, A., et al.** (1999). "Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress." *Curr Biol* 9(18): 1061-4.
- Vassella, E., et al.** (1997). "Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway." *J Cell Sci* 110 (Pt 21): 2661-71.
- Vaux, D. L., et al.** (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." *Nature* 335(6189): 440-2.

- Vercammen, D., et al.** (2004). "Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine." *J Biol Chem* 279(44): 45329-36.
- Viikki, M., et al.** (2000). "Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia." *Acta Oncol* 39(1): 71-5.
- Viscogliosi E. & Brugerolle G.** (1993a) "Cytoskeleton in trichomonads." I. Immunological and biochemical comparative study of costal proteins in the genus *Tritrichomonas*. *Europ. J. Protistol.*, 29:160-170.
- Viscogliosi E. & Brugerolle G.** (1993b) "Cytoskeleton in trichomonads." II. Immunological and biochemical characterization of the preaxostylar fibres and undulating membrane in the genus *Tritrichomonas*. *Europ. J. Protistol.*, 29:381-389.
- Viscogliosi E. & Brugerolle G.** (1994a) "Cytoskeleton in trichomonads." III. Study of the morphogenesis during division by using monoclonal antibodies against cytoskeletal structures. *Europ. J. Protistol.*, 30:129-138.
- Viscogliosi, E. and G. Brugerolle** (1994b). "Striated fibers in trichomonads: costa proteins represent a new class of proteins forming striated roots." *Cell Motil Cytoskeleton* 29(1): 82-93.
- Viscogliosi, E., et al.** (1996). "Phylogenetic implication of iron-containing superoxide dismutase genes from trichomonad species." *Mol Biochem Parasitol* 80(2): 209-214.
- Viscogliosi, E. and M. Muller** (1998). "Phylogenetic relationships of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, from parabasalid flagellates." *J Mol Evol* 47(2): 190-9.
- Viscogliosi, E., et al.** (1993). "Phylogeny of trichomonads based on partial sequences of large subunit rRNA and on cladistic analysis of morphological data." *J Eukaryot Microbiol* 40(4): 411-21.

W

- Walker, N. P., et al.** (1994). "Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer." *Cell* 78(2): 343-52.
- Walker, R. L., et al.** (2003). "Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity." *J Vet Diagn Invest* 15(1): 14-20.
- Wang, C. W. and D. J. Klionsky** (2003). "The molecular mechanism of autophagy." *Mol Med* 9(3-4): 65-76.
- Wang, Y., et al.** (2004). "An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression." *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1525-32.
- Warton, A. and B. M. Honigberg** (1979). "Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy." *J Protozool* 26(1): 56-62.
- Watanabe, N. and E. Lam** (2005). "Two *Arabidopsis* Metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b Are Arginine/Lysine-specific Cysteine Proteases and Activate Apoptosis-like Cell Death in Yeast." *Journal of Biological Chemistry* 280(15): 14691-14699.
- Weber, C. H. and C. Vincenz** (2001). "A docking model of key components of the DISC complex: death domain superfamily interactions redefined." *FEBS Lett* 492(3): 171-6.
- Wei, Y., et al.** (2000). "The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity." *Chem Biol* 7(6): 423-32.
- Widlak, P. and W. T. Garrard** (2005). "Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G." *J Cell Biochem* 94(6): 1078-87.
- Wilson-Annan, J., et al.** (2003). "Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity." *J Cell Biol* 162(5): 877-87.
- Wilson, K. P., et al.** (1994). "Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme." *Nature* 370(6487): 270-5.

- Wissing, S., et al.** (2004). "An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast." *J Cell Biol* 166(7): 969-74.
- Wyllie, A. H., et al.** (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Wyllie, A. H., et al.** (1984). "Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis." *J Pathol* 142(1): 67-77.

X

- Xu, D. H., et al.** (2006). "Apoptosis in *Ichthyophthirius multifiliis* is associated with expression of the Fas receptor of theronts." *J Fish Dis* 29(4): 225-32.

Y

- Yamin M.A.** (1979) Flagellates of the orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé, and Hypermastigida Grassi & Foà reported from lower termites (Isoptera families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach *Cryptocercus* (Dictyoptera: Cryptocercidae). *Sociobiology*, 4:5-119.
- Yang, C. R., et al.** (1990). "Diarrhoea surveillance in children aged under 5 years in a rural area of Hebei Province, China." *J Diarrhoeal Dis Res* 8(4): 155-9.
- Yang, E. and S. J. Korsmeyer** (1996). "Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death." *Blood* 88(2): 386-401.
- Yarlett, N., et al.** (1981). "Hydrogenosomes in the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium* Schuberg." *Biochem J* 200(2): 365-72.
- Yarlett N., et al.** (1984) Hydrogenosomes in known species of rumen entodiniomorphid protozoa. *FEMS Microbiol. Lett.*, 21:15-19.
- Yarlett, N., et al.** (1986). "Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*." *Biochem J* 236(3): 729-39.
- Yin, J., et al.** (2010a) "Staurosporine-induced programmed cell death in *Blastocystis* occurs independently of caspases and cathepsins and is augmented by calpain inhibition." *Microbiology* 156(Pt 5): 1284-93.
- Yin, J., et al.** (2010b) "Autophagy is involved in starvation response and cell death in *Blastocystis*." *Microbiology* 156(Pt 3): 665-77.
- Yin, Q., et al.** (2006). "Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine." *Mol Cell* 22(2): 259-68.
- Yoon, J. H., et al.** (2005). "Characterization of the 3' --> 5' exonuclease activity found in human nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1) and several of its homologues." *Biochemistry* 44(48): 15774-86.
- Yousefi, S., et al.** (2006). "Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis." *Nat Cell Biol* 8(10): 1124-32.
- Yu, L., et al.** (2006). "Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13): 4952-7.
- Yu, X., et al.** (2005). "A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform." *Structure* 13(11): 1725-35.
- Yuan, J., et al.** (1993). "The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." *Cell* 75(4): 641-52.
- Yule, A., et al.** (1989). "Bovine trichomoniasis." *Parasitol Today* 5(12): 373-7.

Z

- Zhang, Z. F. and C. B. Begg** (1994). "Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies." *Int J Epidemiol* 23(4): 682-90.
- Zhou, Q., et al.** (1997). "Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases." *J Biol Chem* 272(12): 7797-800.