



# Culture in vitro et caractérisation d'enzymes hydrogénomales chez *Histomonas meleagridis*, protozoaire flagellé parasite de gallinacés

Muriel Mazet

## ► To cite this version:

Muriel Mazet. Culture in vitro et caractérisation d'enzymes hydrogénomales chez *Histomonas meleagridis*, protozoaire flagellé parasite de gallinacés. Microbiologie et Parasitologie. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2007. Français. <NNT : 2007CLF21568>. <tel-00718217>

**HAL Id: tel-00718217**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00718217>**

Submitted on 16 Jul 2012

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL  
N° D.U. : 1768

UNIVERSITE D'AUVERGNE

**Ecole Doctorale  
des Sciences de la Vie et de la Santé**  
N° Ordre : 464

**THESE**

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Spécialité : **Parasitologie Moléculaire**

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Muriel MAZET**

**Le 27 Septembre 2007**

**CULTURE *IN VITRO* ET  
CARACTERISATION D'ENZYMES HYDROGENOSOMALES  
CHEZ *HISTOMONAS MELEAGRIDIS*,  
PROTOZOAIRE FLAGELLE PARASITE DE GALLINACES**

**JURY :**

Président : Pr. Claude-Marie CHAUVE, Ecole Nationale Vétérinaire, Lyon.  
Rapporteurs : Pr. Jacques GUILLOT, Ecole Nationale Vétérinaire, Maison-Alfort.  
Dr. Eric VISCOGLIOSI, Institut Pasteur, Lille.  
Examineur : Dr. Frédéric DELBAC, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.  
Directeur de thèse : Pr. Christian VIVARES, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

*Laboratoire Biologie des Protistes UMR CNRS 6023, Parasitologie Moléculaire et Cellulaire,  
Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.*







## Résumé

Le protozoaire flagellé *Histomonas meleagridis*, appartenant à l'ordre des trichomonadines, est responsable de l'histomonose, une maladie parasitaire entérique infectieuse chez les oiseaux galliformes, et qui affecte plus particulièrement la dinde. La culture *in vitro* de ce parasite anaérobie est qualifiée d'agnotobiotique car il y a présence d'une flore bactérienne non déterminée, provenant du caecum de dindes infectées. Les observations en MET indiquent qu'*H. meleagridis* est capable d'ingérer des bactéries par phagocytose. Un travail préliminaire sur l'identification des bactéries présentes dans la culture a été initié et montre l'existence d'une flore très diversifiée, avec des bactéries aérobies et anaérobies. Nos essais de mise en place de cultures axénique et monoxénique suggèrent que les bactéries sont essentielles au développement *in vitro* du parasite et que cette culture est un véritable écosystème où les différents acteurs sont interdépendants.

Par des stratégies de PCR, RT-PCR et RACE-PCR, nous avons identifié les gènes complets codant trois protéines intervenant dans le métabolisme énergétique chez *H. meleagridis*: une enzyme malique, la sous-unité  $\alpha$  de la succinyl coenzyme A synthétase ( $\alpha$ -SCS) et une hydrogénase à fer. Ces trois protéines sont localisées dans des organites particuliers à double membrane, appelés hydrogénosomes, qui sont retrouvés chez des organismes à métabolisme anaérobie et qui produisent de l'hydrogène moléculaire et de l'énergie sous forme d'ATP. Les anticorps produits contre l' $\alpha$ -SCS montrent également un marquage de la surface des parasites, suggérant un rôle de cette enzyme dans les processus d'adhésion, comme c'est le cas chez *Trichomonas vaginalis*, protozoaire parasite chez l'Homme possédant des hydrogénosomes. Dans le but de préciser la fonction des protéines hydrogénosomales chez *H. meleagridis*, nous avons initié une étude fonctionnelle en utilisant une technique d'ARN interférence par « feeding ».

Une autre partie de mon travail a porté sur le suivi d'élevages de dindes pour surveiller l'apparition éventuelle d'histomonose en réalisant des coupes semi-fines de caeca et de foies de dindes potentiellement infestées. La réalisation de tests anti-parasitaires a aussi permis d'identifier des produits naturels actifs contre le parasite.

**Mots-clés :** *Histomonas meleagridis*, culture agnotobiotique, hydrogénosomes, enzyme malique,  $\alpha$ -SCS, hydrogénase, adhésion, RNAi, anti-parasitaires.



## *Remerciements*

C'est avec une grande sincérité que je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail de thèse.

Je remercie Monsieur Christian Amblard, Directeur du Laboratoire de Biologie des Protistes UMR CNRS 6023, de m'avoir accueillie au sein de son unité.

Je remercie mon directeur de thèse, monsieur le Professeur Christian Vivarès, responsable de l'équipe de Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, pour m'avoir accueillie dans son équipe, et m'avoir fait confiance en me proposant un nouveau sujet passionnant.

Un très grand merci à Frédéric Delbac qui « m'a rattrapée au vol » ! Un immense merci Fred pour ton amitié, ta gentillesse, tes conseils, ta disponibilité !

Je remercie Messieurs Jacques Guillot et Eric Viscogliosi pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Madame Claude-Marie Chauve pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Marie, Hicham et Catherine qui ont toujours trouvé du temps pour discuter et me conseiller tout au long de cette thèse.

Quand je suis arrivée la première fois au Laboratoire de Biologie des Protistes, je me suis sentie toute, toute petite... et oui le monsieur qui devait s'occuper de moi était très, très grand !! Un grand merci à Monsieur Guy pour sa gentillesse, son savoir illimité et ses précieux conseils.

Je remercie également Monsieur Prensier qui m'a formée à la microscopie électronique et qui m'a été d'une grande aide pour réaliser les coupes et les observations des jolis morceaux de dindes !

Je n'oublie pas miss Annie pour son aide technique précieuse.

Pendant ces années, j'ai connu des moments très douloureux qui m'ont fait douter mais j'ai toujours trouvé du réconfort auprès de ma petite famille du labo ! Votre présence et votre soutien m'ont permis de me reconstruire et d'avancer. Merci à vous tous !



Mille mercis à mes deux extraordinaires copines, ma Vanessa et ma Cécile !

Merci à mes parents et à ma petite Pauline, sans vous tout aurait été plus difficile, merci pour votre confiance et votre affection sans limite !



# SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
<u>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	5
<b>I - LES PARASITES PATHOGENES IMPORTANTS EN AVICULTURE</b>	<b>6</b>
<b>I-1- Les coccidies</b>	<b>8</b>
I-1-1- Taxinomie	9
I-1-2- Biologie et cycle de développement du genre <i>Eimeria</i>	10
I-1-3- La détermination des espèces et le diagnostic	11
I-1-4- La distribution et le contrôle des coccidies	12
<b>I-2- Les parasites flagellés</b>	<b>14</b>
I-2-1- <i>Histomonas meleagridis</i>	14
I-2-1-1- Un peu d'histoire	15
I-2-1-2- Importance économique	15
I-2-1-3- Taxinomie d' <i>H. meleagridis</i>	16
I-2-1-4- Cycle de développement	17
I-2-1-5- La biologie d' <i>Histomonas meleagridis</i>	19
I-2-1-6- Symptômes cliniques et lésions de l'histomonose	20
I-2-1-7- Epidémiologie	21
I-2-1-8- Diagnostic	21
I-2-1-9- La lutte contre l'histomonose	22
I-2-2- <i>Trichomonas</i> et les autres flagellés	24
<b>II - METABOLISME CHEZ LES ORGANISMES « AMITOCHONDRIAUX »</b>	<b>25</b>
<b>II-1- Les hydrogénosomes</b>	<b>26</b>
II-1-1- Morphologie des hydrogénosomes	27



II-1-2- Origine et description des hydrogénosomes	28
II-1-3- Le métabolisme hydrogénosomal	31
II-1-4- Particularité des protéines hydrogénosomales chez <i>T. vaginalis</i>	33
<b>II-2- Les mitosomes</b>	<b>35</b>
II-2-1- Morphologie	36
II-2-2- Origine des mitosomes	36
II-2-3- Capacité métabolique des mitosomes	37
<b>II-3- Evolution des organites : adaptation aux conditions environnementales</b>	<b>38</b>
<b>III - UTILISATION DES HUILES ESSENTIELLES DANS LE CONTROLE DE L'HISTOMONOSE</b>	<b>41</b>
<b>III-1- Phytothérapie et aromathérapie : définitions et différences</b>	<b>41</b>
<b>III-2- Les huiles essentielles</b>	<b>42</b>
III-2-1- Définition	42
III-2-2- Localisation dans la plante et composition chimique	42
III-2-3- Extraction des huiles essentielles	43
<b>III-3- Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles</b>	<b>43</b>
III-3-1- Mode d'action des huiles essentielles	43
III-3-2- Champs d'action des huiles essentielles	44
III-3-3- Toxicité	45
<b>III-4- Activité <i>in vitro</i> sur <i>Histomonas meleagridis</i></b>	<b>45</b>



RESULTATS 46

Chapitre I :

**CULTURE *IN VITRO* ET CYTOLOGIE DU PARASITE  
*HISTOMONAS MELEAGRIDIS*** 48

**I-1- Culture d'*H. meleagridis*** 49

**I-2- Description d'*H. meleagridis* en microscopies photonique  
et électronique à transmission** 50

**I-3- Essais de mise en place d'une culture axénique** 53

**I-4- Premières identifications des bactéries associées  
à notre souche en culture** 55

**I-5- Essais de mise en place d'une culture monoxénique** 58

**I-6- Conclusions** 59

Chapitre II :

**IDENTIFICATION D'ENZYMES HYDROGENOSOMALES  
CHEZ *H. MELEAGRIDIS* ET ROLE POTENTIEL DANS L'ADHESION** 61

**Article:** First molecular characterization of hydrogenosomes  
in the protozoan parasite *Histomonas meleagridis* 63

**Caractérisation par RACE-PCR de la partie 5' du gène codant  
pour l'hydrogénase à fer** 85

Chapitre III :

**PREMIERE APPROCHE DE GENETIQUE FONCTIONNELLE  
CHEZ *HISTOMONAS MELEAGRIDIS* PAR LA TECHNIQUE DE  
L'ARN INTERFERENCE** 88



## Chapitre IV :

<b>SUIVI DE DIFFERENTS ELEVAGES DE DINDES ET MISE EN PLACE DE TESTS ANTI-PARASITAIRES <i>IN VITRO</i></b>	<b>93</b>
<b>IV-1- Observation des parasites dans des tissus infestés</b>	<b>94</b>
<b>IV-2- Activité des huiles essentielles <i>in vitro</i> sur <i>Histomonas meleagridis</i></b>	<b>96</b>
<b><u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u></b>	<b>98</b>
<b>I- LA CULTURE NON AXENIQUE D'<i>HISTOMONAS MELEAGRIDIS</i></b>	<b>99</b>
<b>I-1- Les conditions de culture d'<i>H. meleagridis</i></b>	<b>99</b>
<b>I-2- La culture d'<i>H. meleagridis</i> : un véritable écosystème</b>	<b>101</b>
<b>I-3- Perspectives de travail sur la culture d'<i>H. meleagridis</i></b>	<b>102</b>
<b>II- CARACTERISATION DES HYDROGENOSOMES CHEZ <i>H. MELEAGRIDIS</i></b>	<b>104</b>
<b>II-1- Les hydrogénosomes chez les trichomonadines</b>	<b>104</b>
<b>II-2- Rôle des protéines hydrogénosomales dans l'adhésion chez les trichomonadines</b>	<b>111</b>
<b>III- PREMIERES APPROCHES DE GENETIQUE FONCTIONNELLE CHEZ <i>HISTOMONAS MELEAGRIDIS</i></b>	<b>115</b>
<b>III-1- Essais de RNAi par feeding</b>	<b>115</b>
<b>III-2- Premiers essais de transfection par électroporation chez <i>Histomonas meleagridis</i></b>	<b>117</b>



<b>IV- RECHERCHE DE NOUVELLES MOLECULES ACTIVES CONTRE <i>H. MELEAGRIDIS</i></b>	<b>118</b>
<b>IV-1- Nouvelles molécules actives d'origine naturelle     à base d'huiles essentielles</b>	<b>118</b>
<b>IV-2- Les enzymes hydrogénomales : cibles thérapeutiques ?</b>	<b>119</b>
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	 <b>120</b>



---

# INTRODUCTION

---



Parmi les protozoaires parasites intestinaux affectant les volailles, le flagellé anaérobie *Histomonas meleagridis*, appartenant à l'ordre des trichomonadines, est responsable d'une maladie nommée histomonose ou maladie de la tête noire (« blackhead disease »). Depuis quelques années, cette maladie a connu une très forte recrudescence en Europe en raison des retraits successifs des molécules actives qui étaient utilisées en traitement thérapeutique (métronidazole) mais aussi comme additifs alimentaires (nifursol). Ceci a entraîné de sérieux problèmes économiques pour les éleveurs de volailles, notamment en France.

Cette typhlo-hépatite touche plus particulièrement les élevages de dindes, les taux de mortalité pouvant atteindre 100% en l'absence de traitement. Les lieux de prédilection du parasite sont le caecum, organe en cul de sac accroché à la jonction iléo-caecale, ainsi que le foie où il y a formation de lésions, en forme de cocardes, caractéristiques de la maladie. Le cycle de développement d'*H. meleagridis* est très complexe et peut être lié à celui du ver nématode *Heterakis gallinarum*, lui-même parasite du caecum des oiseaux. La contamination peut également se faire par coprophagie ou par aspiration cloacale, phénomènes que l'on peut notamment observer dans le cas d'élevages intensifs.

Les études concernant la biologie et la physiologie d'*H. meleagridis* ont été longtemps négligées principalement du fait que le parasite se développe en présence de concentrations très faibles en oxygène et dans des conditions de culture non axéniques. En effet, la culture *in vitro* de ce protozoaire flagellé montre la présence d'une flore bactérienne non déterminée qui a été récupérée en même temps que le parasite au niveau du caecum de dindes infestées.

Actuellement, aucune information n'est disponible sur les acteurs entrant en jeu dans les processus d'infestation des tissus par *H. meleagridis*. En ce qui concerne son métabolisme énergétique, il faut signaler que ce parasite est dépourvu de mitochondries. Des observations en microscopie électronique à transmission montrent cependant la présence d'organites apparentés aux mitochondries et ressemblant aux hydrogénosomes de *Trichomonas vaginalis*, un autre protozoaire parasite phylogénétiquement très proche d'*H. meleagridis*. Les hydrogénosomes sont des organites à double membrane, retrouvés chez certains eucaryotes à métabolisme anaérobie qui, sous des conditions anoxiques, sont capables de produire de l'énergie sous forme d'ATP, ainsi que de l'hydrogène moléculaire.



Le travail présenté ici fait l'objet d'une thèse réalisée dans le cadre d'une convention CIFRE. Il sera dans un premier temps consacré à l'optimisation des conditions de culture *in vitro* d'*H. meleagridis* avec des essais de mise en place de cultures axénique et monoxénique qui confirmeront l'importance des bactéries dans la croissance du parasite. Une étude préliminaire visant à identifier les bactéries présentes dans la culture sera également exposée.

La deuxième partie de mon travail a porté sur la caractérisation morphologique des hydrogénosomes d'*H. meleagridis*, par des descriptions en microscopie électronique à transmission sur le parasite mais aussi à partir d'organites isolés. Trois gènes codant des enzymes hydrogénosomales impliquées dans le métabolisme énergétique ont été identifiés chez *H. meleagridis* : l' $\alpha$ -succinyl coenzyme A synthétase ( $\alpha$ -SCS), l'enzyme malique et une hydrogénase à fer. L'une d'entre elles, l' $\alpha$ -SCS étant également retrouvée à la surface du parasite, pourrait jouer un rôle dans l'adhésion au cours du processus infectieux, rôle précédemment démontré chez *T. vaginalis*.

Le dernier volet de ce travail de thèse concerne le suivi d'élevages de dindes pour contrôler l'apparition d'éventuelles infestations par *H. meleagridis*. Cette étude a consisté à réaliser des coupes semi-fines de caeca et de foies de dindes potentiellement infestées de manière à mieux préciser la chronologie d'infestation. En parallèle, la mise en place de tests anti-parasitaires a été réalisée et nous a permis de déterminer l'efficacité *in vitro* de certains produits naturels à base d'huiles essentielles.

Ces travaux ont donné lieu :

- à la publication suivante:

Mazet M, Diogon M, Alderete JF, Vivares CP, Delbac F.

**First molecular characterisation of hydrogenosomes in the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*.** International Journal for Parasitology, sous presse.



- aux communications orales suivantes:

**International Symposium on protozoal infections in poultry.**

Vienne - AUTRICHE, 5-7 July 2007.

First molecular characterization of hydrogenosomes in the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*.

**44<sup>ème</sup> Congrès du Groupement des Protistologues de Langue Française.**

Dakar - SENEGAL, 22-26 Mai 2006.

Identification d'enzymes du métabolisme énergétique pouvant jouer un rôle dans l'adhésion chez *Histomonas meleagridis*.

Journal of Eukaryotic Microbiology- Résumé de congrès - 2007. 54, 63A.

**Congrès JED (Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la vie et de la terre)**

Clermont-Ferrand - FRANCE, 30-31 mars 2006.

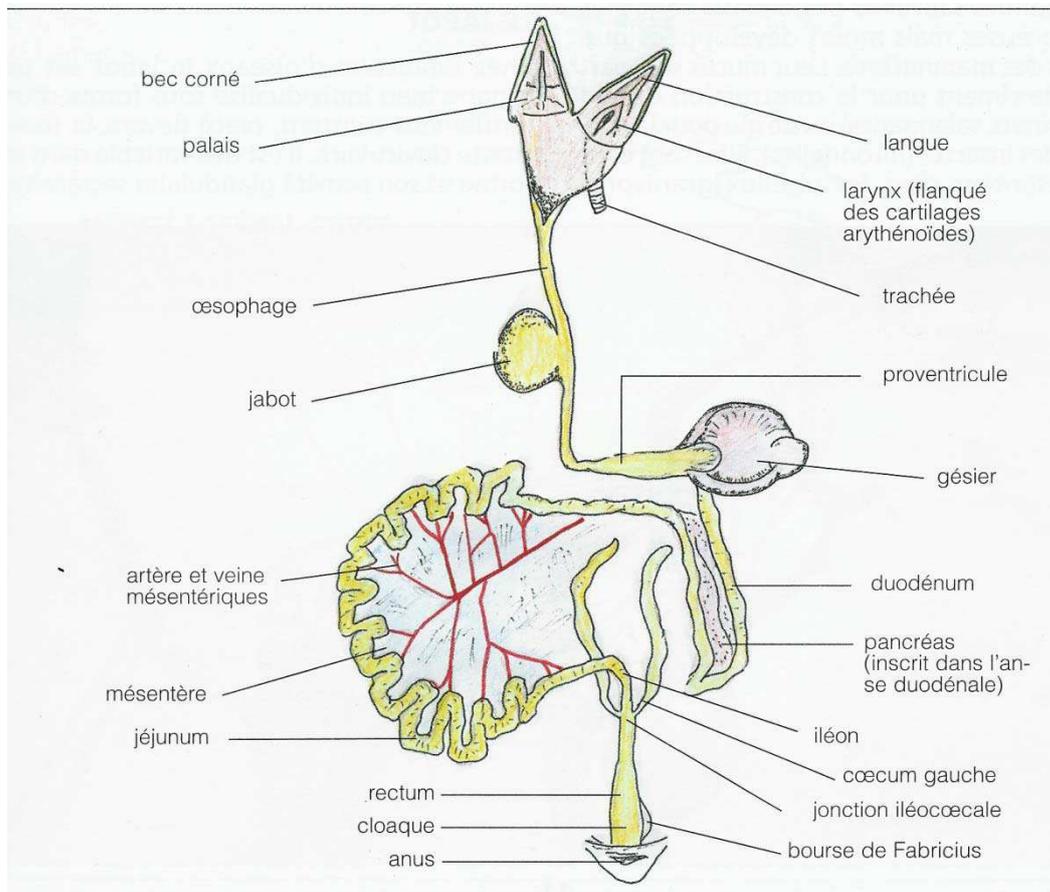
Enzymes hydrogénomales chez *Histomonas meleagridis*.



---

# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---



**Figure 1- Vue centrale du tractus digestif du poulet après autopsie et étalement anatomique (d'après Villate, 2001).**

## **I - LES PARASITES PATHOGENES IMPORTANTS EN AVICULTURE**

La France est aujourd'hui le premier pays exportateur de volailles en Europe. On entend sous le vocable volailles, les poules pondeuses et les poulets de chair, les dindes, les pintades, les oies et les canards. Les élevages de volailles peuvent se diviser en trois types :

- l'élevage familial ou fermier où les volailles sont élevées en bandes peu nombreuses et multiples,
- l'élevage semi-industriel où les volailles sont élevées de la même manière que dans les élevages familiaux mais sous un label qui permet aux consommateurs de connaître l'origine et la qualité du produit,
- l'élevage industriel où les volailles sont menées en bande unique de quelques milliers d'oiseaux en claustration totale et à croissance très rapide.

Plus le nombre de volailles est important, plus les risques de maladies s'amplifient, par la promiscuité, les stress divers et la concentration en éléments contagieux. Un élevage est toujours en équilibre instable par rapport à l'environnement. En aviculture, les maladies vont en effet résulter d'agresseurs provenant de l'environnement mais elles peuvent également être la conséquence d'erreurs zootechniques.

La flore intestinale normale des poulets est un très grand réservoir bactérien où les bactéries des genres *Lactobacillus* et *Clostridium* sont principalement retrouvées. Cependant, seulement 25% des bactéries seraient identifiées (Gabriel et al., 2005). Cette flore est relativement différente de celle des mammifères (Smith, 1965), probablement en raison de différences anatomiques et physiologiques (figure 1), comme la présence ou non de caecum, mais aussi la taille du côlon qui est plus importante chez les mammifères que chez les oiseaux. Chez les animaux en bonne santé, la composition de cette microflore intestinale reste stable. Cependant, elle peut être perturbée par différents facteurs comme l'invasion par des microorganismes pathogènes capables de coloniser le système digestif et créant des infections graves. L'administration d'antibiotiques (Havenaar et Huis in't Veld, 1992) ou les stress environnementaux (surpeuplement, faible alimentation, températures extrêmes...) sont aussi des facteurs entraînant des modifications de cette flore intestinale.



Chez les volailles, trois groupes de pathogènes majeurs sont retrouvés : les bactéries, les virus et les protistes.

Chez les poulets, les genres *Campylobacter*, *Salmonella* et l'espèce *Escherichia coli* sont les bactéries pathogènes les plus importantes qui colonisent le tractus digestif. En général, ces infections ne vont pas provoquer de maladies sérieuses et les pertes économiques sont acceptables. Cependant, la contamination de la carcasse au moment de l'abattage par les bactéries du tractus digestif peut affecter la qualité sanitaire des produits avicoles, certaines de ces bactéries, telles les salmonelles, pouvant en effet être transmises à l'Homme (Tauxe, 1991).

Pour prévenir ces infections, les antibiotiques ont été utilisés en masse dans les élevages depuis les années 1960, dans un but thérapeutique ou comme additifs alimentaires. En effet, ajoutés en petites quantités dans les aliments pour animaux, les antibiotiques améliorent le potentiel de croissance des volailles. Ces utilisations abusives ont malheureusement entraîné l'apparition de bactéries résistantes (Lu et al., 2006) combinée avec des phénomènes de transmission des pathogènes de l'animal aux consommateurs.

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2006, l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance dans les aliments pour animaux tels que l'avilamycine et le lavophospholipol est définitivement interdite en Europe. Cette interdiction a entraîné une demande importante de nouveaux additifs alimentaires par les industriels de volailles. Une alternative biologique est le développement des probiotiques (Garriga et al., 1998 ; Klose et al., 2006). Ce sont des cultures de microorganismes vivants (bactéries du genre *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) qui, après administration en quantité suffisante chez les animaux, vont renforcer la barrière intestinale et les défenses naturelles. Leur utilisation est en pleine expansion (Mountzouris et al., 2007) car elle est une bonne alternative pour les producteurs et permet de rassurer les consommateurs.

Parmi les virus affectant les élevages de volailles, le virus H5N1 responsable de la grippe aviaire a entraîné de sérieux problèmes dans les pays d'Asie mais aussi dans certains pays européens. Ce virus appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* et au genre *Influenzavirus A* qui a été isolé chez différents animaux, incluant l'Homme, les porcs, les chevaux, les mammifères marins, les chats, les chiens et les oiseaux. L'infection de la volaille domestique par le virus de la grippe aviaire provoque chez les animaux deux formes de



maladies qui se distinguent par leur degré de virulence. La forme dite « faiblement pathogène », qui ne cause généralement que des symptômes bénins (ébouriffage des plumes, baisse de la production d'œufs), peut échapper à la détection. En revanche, la forme « hautement pathogène » se répand rapidement dans les élevages de volaille, où elle cause des atteintes multiviscérales, avec des taux de mortalité pouvant atteindre 90 à 100 %, parfois en l'espace de 48 heures. Chez ces oiseaux infectés, le virus est retrouvé dans les sécrétions nasales et les excréments. La plupart des infections de l'Homme par les virus de la grippe aviaire sont dues à des contacts avec des volailles infectées (poules, canards, dindes domestiques) ou avec des surfaces contaminées par les sécrétions ou les excréments d'oiseaux infectés. Depuis 1996, la propagation de la grippe aviaire a été dévastatrice pour beaucoup de pays asiatiques où plus de 150 millions de poulets et canards ont été emportés par la maladie ou abattus. L'impact économique est estimé à plus de 10 milliards de dollars dans les pays affectés. La répartition mondiale actuelle du virus H5N1 chez les oiseaux pose une sérieuse menace de pandémie et nécessite donc de mettre au point des vaccins efficaces (Horimoto et al., 2006).

Le travail, exposé ici, porte sur un troisième groupe de pathogènes retrouvés fréquemment dans les élevages de volailles : les protozoaires intestinaux. Parmi eux, deux groupes majeurs sont responsables de maladies parasitaires causant des dommages économiques très importants dans les élevages de volailles. Le premier correspond aux coccidies avec en particulier le genre *Eimeria* ; le second comprend des protozoaires flagellés, notamment ceux appartenant aux genres *Histomonas* et *Trichomonas*.

### **I-1- Les coccidies**

Les coccidies, appartenant au phylum des Apicomplexa, provoquent les maladies parasitaires entériques qui ont le plus grand impact économique sur la production de volailles (Shirley et al., 2005). Le coût mondial annuel dû aux coccidioses est estimé à 800 millions de dollars. Ce coût inclut les traitements prophylactiques dans la nourriture des volailles, la mortalité et la morbidité (Allen et Fetterer, 2002). Les coccidies les plus communes responsables d'infections chez les poulets et les autres volailles appartiennent au genre



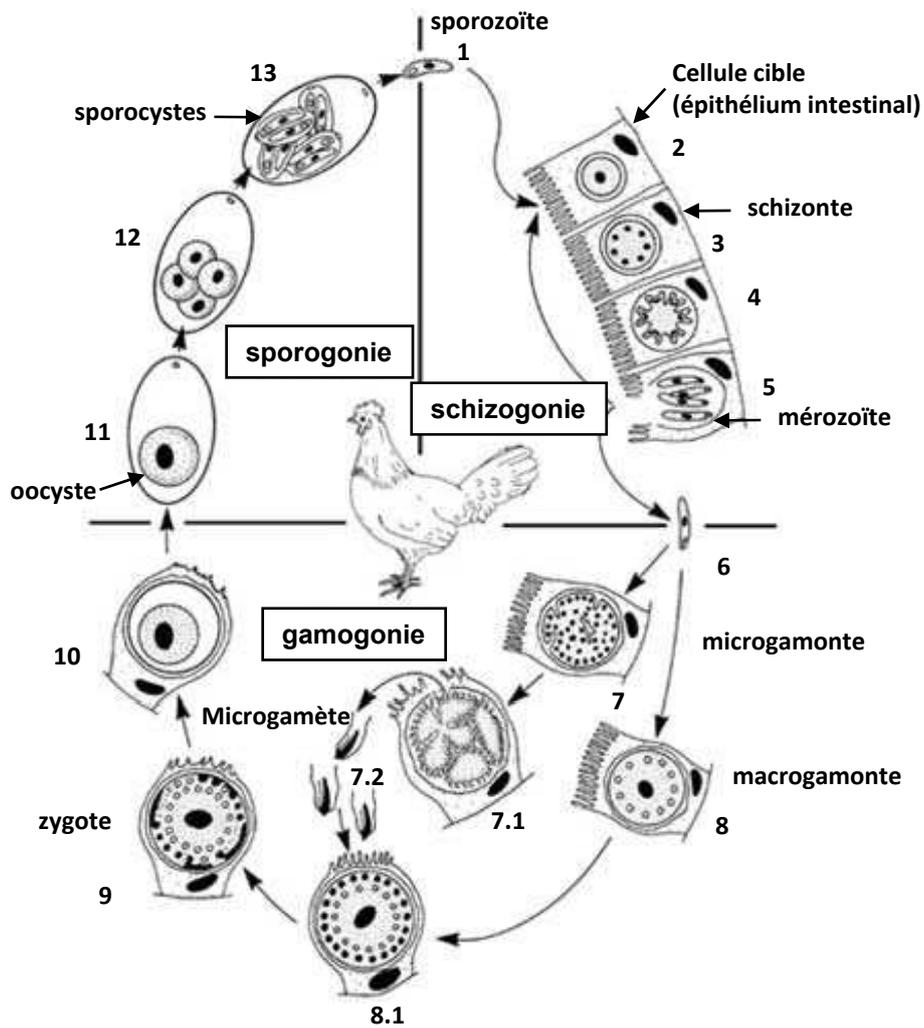
*Eimeria*, parasite réalisant un cycle direct (monoxène). Les genres *Toxoplasma* et *Sarcocystis*, parasites hétéroxènes à deux hôtes, peuvent infecter les poulets mais causent rarement des problèmes économiques. Le genre *Isospora* est également retrouvé chez les oiseaux sauvages. Enfin, le genre *Cryptosporidium* est très répandu chez les poulets et les dindes mais n'a, à l'heure actuelle, aucune importance économique sur la production de volailles (McDougald, 1998).

Le contrôle des coccidioses dans les élevages de volailles se fait par l'utilisation d'anticoccidiens, en traitement préventif. Cependant, cette méthode est très onéreuse et entraîne l'apparition de résistance aux drogues dans les populations d'*Eimeria* (Shirley et al., 2004, 2005). En raison de ces problèmes de résistance, une alternative est l'utilisation de vaccins qui s'est répandue particulièrement dans les élevages intensifs (Williams, 2002). En plus de la chimiothérapie et de la vaccination, le diagnostic spécifique des coccidioses a récemment connu une avancée technologique importante permettant la caractérisation précise des espèces du genre *Eimeria* impliquées dans ces pathologies. Ces nouvelles méthodes de diagnostic de l'infection jouent un rôle clé dans la prévention, la surveillance et le contrôle des coccidioses.

Nous nous intéresserons plus particulièrement au genre *Eimeria*, auquel appartiennent les coccidies les plus fréquemment retrouvées chez les volailles.

### **I-1-1- Taxinomie**

Le genre *Eimeria* regroupe des parasites intracellulaires obligatoires appartenant au phylum des *Apicomplexa*. Les membres de ce phylum sont caractérisés par des stades invasifs présentant une ultrastructure complexe au niveau du pôle apical de la cellule. Le complexe apical comprend en effet, le conoïde, et certains organites sécrétoires (rhoptries et micronèmes) qui sont impliqués dans le processus d'invasion de la cellule-hôte. Les *Eimeria* appartiennent à la classe des *Sporozoasida* (absence de flagelles chez les éléments invasifs mobiles : sporozoïtes et mérozoïtes), à la sous classe des *Coccidiasina* (localisation intracellulaire, hôtes vertébrés, reproduction par fusion des gamètes), et à l'ordre des *Eucoccidiorida* (multiplication asexuée par mérogonie).



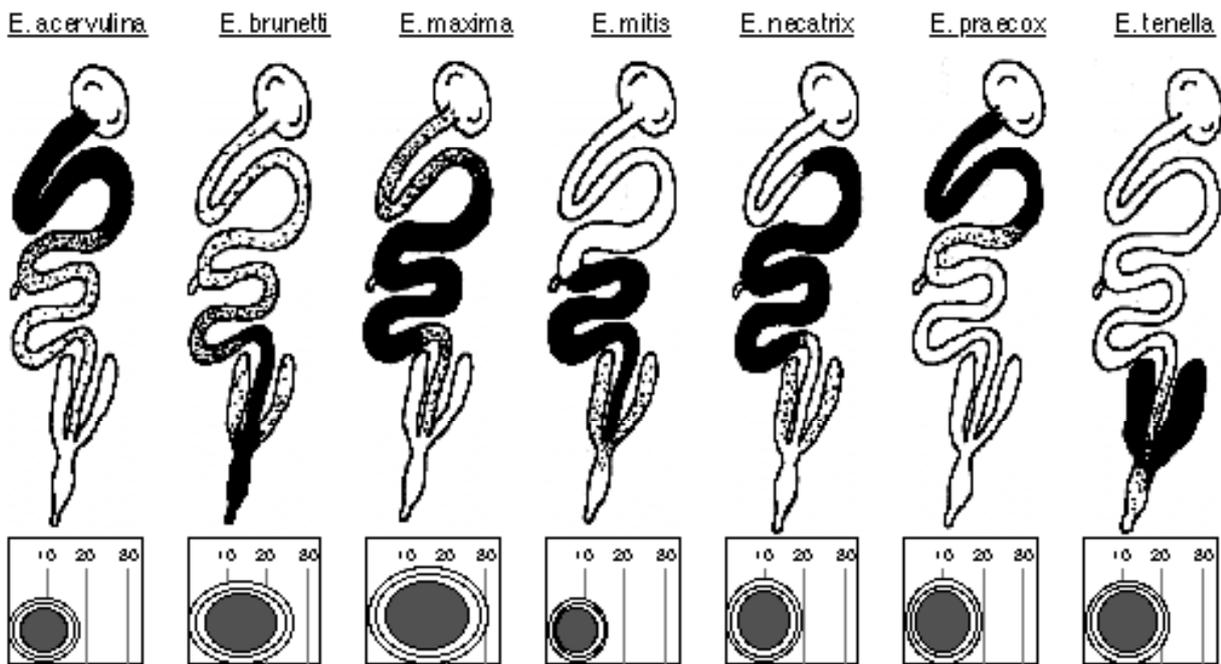
**Figure 2- Cycle de développement des coccidies du genre *Eimeria* chez le poulet.** Ce cycle est composé de trois phases : la **sporogonie** (11 à 13) ou étape de sporulation à l'extérieur de l'hôte, la **schizogonie** ou mérogonie (1 à 5) et la **gamogonie** ou phase de multiplication sexuée qui ont lieu dans les cellules de l'hôte (6 à 10).

### **I-1-2- Biologie et cycle de développement du genre *Eimeria***

Le cycle de développement des coccidies est un cycle direct, sans hôte intermédiaire (figure 2). La dissémination du parasite d'oiseaux à oiseaux et d'élevages en élevages est dépendante de la survie des oocystes qui sont les formes de résistance retrouvées dans le sol ou dans les batteries de poulets.

Ces oocystes sont libérés dans les fientes des volailles. Sous des conditions environnementales favorables (chaleur, oxygène et humidité) les oocystes sporulent et deviennent par conséquent infectants (Williams, 1998 ; Allen et Fetterer, 2002). Après sporulation, les oocystes vont contenir 4 sporocystes chacun renfermant 2 sporozoïtes (figure 1, **étapes 11 à 13**). Ces oocystes, après avoir été ingérés par un poulet, sont dégradés dans le gésier et relarguent les sporocystes. Les actions combinées de la trypsine et de la bile dans le duodénum vont permettre la libération des sporozoïtes (**1**) qui vont ensuite envahir les cellules de la paroi intestinale (McDougald, 2003).

A l'intérieur des cellules-hôtes, les sporozoïtes entrent dans une phase de reproduction asexuée nommée schizogonie ou mérogonie, au cours de laquelle la division nucléaire est suivie par une différenciation cytoplasmique (**2 à 4**). Cette étape de mérogonie aboutit à la production des mérozoïtes qui sont libérés par éclatement de la cellule infectée (**5**) et peuvent pénétrer dans une nouvelle cellule-hôte (**6**). Après plusieurs générations mérogoniques, va avoir lieu la phase de multiplication sexuée appelée gamogonie. Les mérozoïtes entrent dans la cellule-hôte et se développent en un macrogamonte (qui donneront des macrogamètes femelles) (**8**) et microgamonte (mâle) (**7**). Le microgamonte donne naissance à plusieurs microgamètes (**7.1 et 7.2**) qui, après libération, vont féconder les macrogamètes (**8.1**). Il va ainsi y avoir développement d'un oocyste qui sera libéré dans les fientes (**9-10**). Le cycle complet se déroule habituellement en 4 à 6 jours, mais sa durée peut être variable selon les espèces. Ce cycle possède une capacité de reproduction massive pendant les phases intracellulaires. Ce groupe de parasites est donc un très gros problème pour les élevages en condition intensive. Ce sont les phases répliquatives asexuées qui entraînent le plus de dommages au niveau des tissus intestinaux, causant différents degrés de perturbations digestives, et pouvant ainsi favoriser le développement d'autres pathogènes (McDougald, 2003). Les mécanismes biochimiques et génétiques qui contrôlent le développement des



**Figure 3. Localisation des lésions et taille des oocystes (en micromètres) des 7 espèces de coccidies du genre *Eimeria* chez le poulet.** Chez le poulet, il existe sept espèces qui peuvent être identifiées en fonction de leur localisation intestinale (en noir), des lésions induites, et de la taille de leurs oocystes (d'après Yvoré, 1992).

espèces du genre *Eimeria* à l'intérieur des cellules-hôtes sont à l'heure actuelle très mal connus.

### **I-1-3- La détermination des espèces et le diagnostic**

Sept espèces du genre *Eimeria* ont été identifiées comme étant des pathogènes chez les poulets : *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* et *E. tenella* (Shirley, 1986). Ces espèces ont un tropisme différent dans le tube digestif des poulets (figure 3).

Cinq d'entre elles (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* et *E. tenella*) sont bien connues et sont facilement identifiables, car elles sont responsables de grosses lésions caractéristiques. Les deux autres espèces (*E. mitis* et *E. praecox*) sont en général responsables d'infections bénignes. Néanmoins, des infections expérimentales ont montré que ces 2 espèces pouvaient entraîner des diarrhées et une perte d'appétit des volailles causant alors des pertes économiques relativement importantes (Williams, 1998).

Les cinq espèces les plus pathogènes peuvent être différenciées chez leur hôte sur la base de différents signes cliniques, sur l'apparence et la localisation des lésions dans l'intestin, selon le lieu de développement des sporozoïtes (soit directement au site de pénétration, soit vers des sites plus éloignés dans l'intestin) (Al-Attar et Fernando, 1987 ; Lawn et Rose, 1982) mais aussi selon la taille des oocystes et la morphologie des stades intracellulaires. Cependant, ces méthodes traditionnelles ne sont pas suffisantes pour permettre un diagnostic rapide et spécifique des coccidies. En 1975, Shirley a été le premier à développer une approche de diagnostic moléculaire basée sur la migration d'isoenzymes des oocystes. Cette technique de MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) est aujourd'hui largement utilisée pour la distinction des variations génétiques entre les espèces d'*Eimeria* infectant les oiseaux. De plus, d'autres méthodes de diagnostic moléculaire ont été mises au point et sont utilisées actuellement. C'est le cas notamment d'une technique de PCR couplée à une électrophorèse capillaire qui permet de détecter de la variabilité génétique entre espèces avec une grande précision et très rapidement (Gasser et al., 2005).



#### **I-1-4- La distribution et le contrôle des coccidies**

Les sept espèces d'*Eimeria* infectant les poulets sont cosmopolites et ont un impact prépondérant dans les élevages intensifs. Williams, en 1999, a en effet indiqué qu'il était extrêmement rare de trouver des élevages industriels de volailles sans présence du parasite *Eimeria*. Par exemple, une enquête sur des fermes au Brésil et en Argentine montre la présence d'oocystes dans 89 fermes sur 90 examinées (Mc Dougald et al, 1987). De plus, d'autres études ont montré que l'infection ne se faisait pas par une seule espèce mais qu'il y avait généralement présence de deux, ou de trois espèces simultanément (Mc Dougald et al, 1986). L'hygiène, l'utilisation des molécules anti-coccidiennes et les vaccins jouent un rôle clé dans le contrôle de ces maladies parasitaires.

##### ✓ **L'hygiène**

Etant donné que les espèces d'*Eimeria* réalisent un cycle de développement monoxène, la transmission mécanique est le principal moyen de dissémination des oocystes entre les hangars d'une même ferme ou entre différentes fermes (McDougald, 2003).

Les oocystes sont très résistants dans l'environnement ; ils sont en effet capables de survivre de plusieurs semaines à plusieurs mois dans le sol et dans des conditions climatiques extrêmes. Ils sont également résistants à de nombreux désinfectants mais survivent moins longtemps dans les litières au niveau desquelles ils sont exposés à la fermentation et/ou à l'ammoniaque libérée par le matériel fécal. Il est donc important de bien désinfecter les hangars où vivent les volailles.

##### ✓ **Les molécules anti-coccidiennes**

La chimiothérapie a été la meilleure approche pour contrôler le développement de coccidies chez les volailles (Allen et Fetterer, 2002). Ces molécules anti-coccidiennes sont classées en deux familles, les produits de synthèse et les antibiotiques ionophores, interférant dans la balance ionique. Elles sont utilisées habituellement en traitement préventif en tant qu'additifs alimentaires. En effet, si les éleveurs attendent les premiers signes de l'infection,



la mortalité et la morbidité dans l'élevage peuvent être trop importantes et vont entraîner alors des pertes économiques relativement importantes.

Depuis les années 1970, les antibiotiques ionophores, sont les anti-coccidiens les plus utilisés en prophylaxie. Beaucoup de producteurs utilisent la roxarsone, composé arsenical, durant les périodes de croissance en association avec les ionophores, particulièrement contre l'espèce *E. tenella*.

L'efficacité des molécules anti-coccidiennes a été le premier facteur permettant le développement économique de l'agriculture aviaire. Sans traitement préventif, il aurait en effet été impossible d'élever les volailles sous des conditions intensives (Chapman, 1997). Cependant, cette prophylaxie qui consiste à utiliser ces molécules en grande quantité, entraîne l'apparition de résistance chez certaines espèces d'*Eimeria*. Cette prophylaxie a également un impact important sur la santé humaine par l'accumulation de résidus des drogues dans les œufs et parfois même dans la viande, notamment dans le cas des poulets de chair (Shirley et Bedrnik, 1997).

#### ✓ **Les vaccins**

Les coccidies aviaires étant hautement immunogènes, il semble évident que les vaccins offrent une alternative à l'utilisation des drogues. Les efforts dans le développement des vaccins ont été très importants ces dernières années. Des vaccins vivants (oocystes sporulés) à partir de souches virulentes d'*Eimeria* ont été réalisés (Shirley et al., 1995, 2005). Les vaccins doivent contenir les espèces les plus importantes d'*Eimeria* (habituellement de 3 à 7) pour être efficaces puisque le système immunitaire de l'hôte est spécifique de chaque espèce. Cependant, même si la dose administrée est faible, le parasite va se développer et commencer les premiers cycles réplicatifs, causant alors les premières lésions au niveau de l'intestin.

Plus récemment, des vaccins vivants atténués contenant plusieurs espèces d'*Eimeria* ont été testés (Williams, 1998, 2002). Ces espèces atténuées ont été isolées après des passages rapides à travers l'oiseau-hôte (Shirley et Bedrnik, 1997). Par conséquent, elles ont développé un faible potentiel reproducteur et une virulence réduite mais possèdent toujours un fort pouvoir immunogène (Williams, 1998). A l'heure actuelle, les poulets vaccinés avec ce type



de vaccins montrent une mortalité plus faible comparée aux poulets non vaccinés ou traités avec des anti-coccidiens.

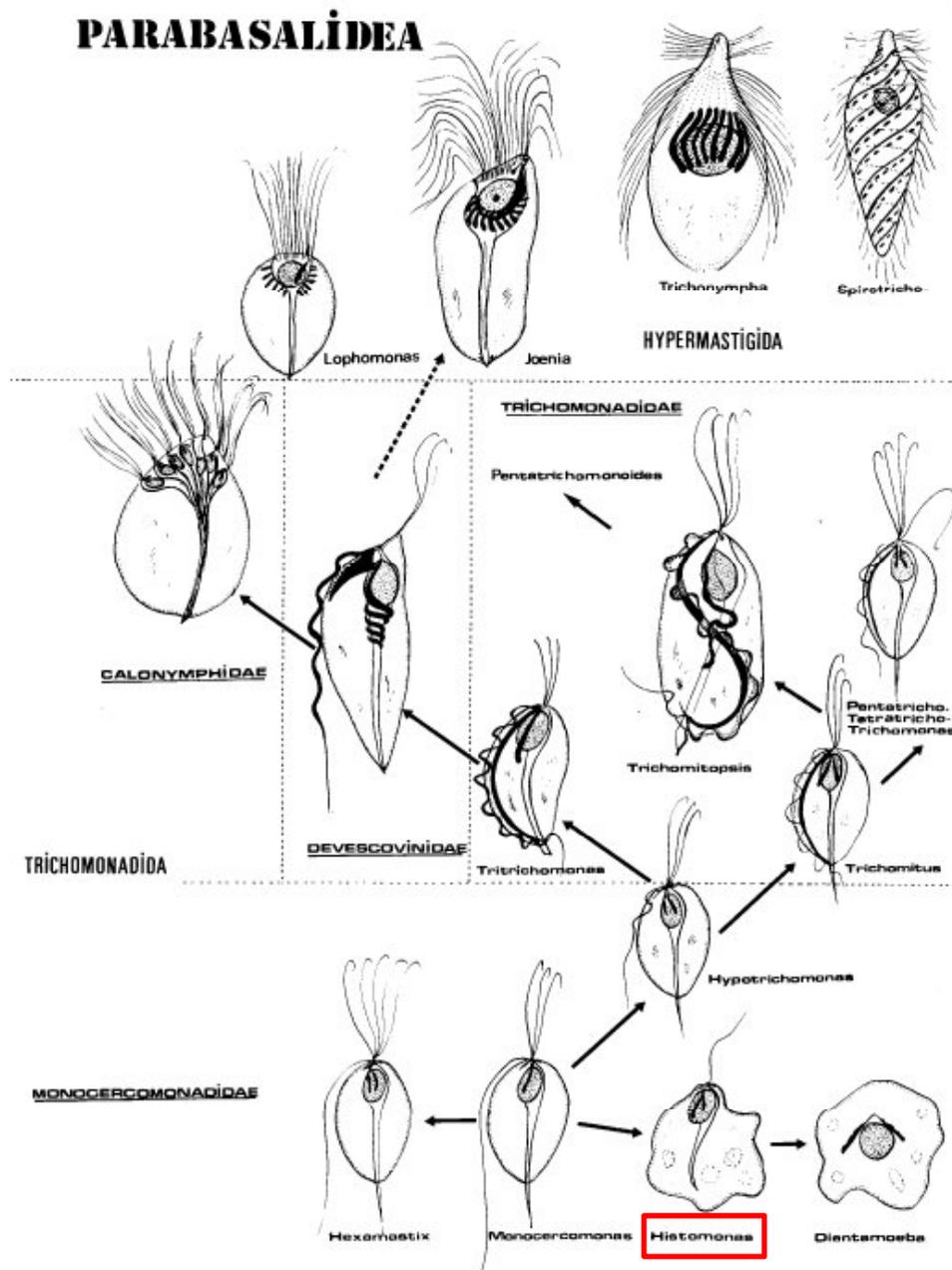
En pratique, les campagnes de vaccination sont souvent associées à l'utilisation des anti-coccidiens (Chapman et al., 2002).

## **I-2- Les parasites flagellés**

Les parasites flagellés sont des microorganismes eucaryotes que l'on trouve fréquemment dans le tractus digestif des oiseaux. Peu sont responsables de maladies sérieuses et de pertes économiques. Les flagellés diffèrent beaucoup des coccidies par leur biologie, leur phylogénie mais aussi par les méthodes de traitements et de contrôle. Parmi les flagellés les plus communs causant d'énormes problèmes économiques sont retrouvés *Histomonas meleagridis*, responsable de l'histomonose, ainsi que d'autres trichomonadines telles que *Tetratrichomonas gallinarum* responsable de la trichomonose chez le poulet.

### **I-2-1- *Histomonas meleagridis***

Le parasite *Histomonas meleagridis* est responsable d'une maladie parasitaire infectieuse propre aux oiseaux galliformes appelée histomonose. Cette maladie est une typhlo-hépatite affectant particulièrement la dinde. Elle se manifeste par une diarrhée jaune soufre entraînant souvent une mortalité importante. L'observation d'une cyanose des appendices charnus de la tête fait que cette maladie porte le nom de « maladie de la tête noire » (« Blackhead disease »). Le lieu de prédilection du parasite est le caecum, organe en cul de sac accroché à la jonction iléo-caecale. Le second organe touché est le foie qui est atteint de nécroses en forme de cocardes, en dépression, concaves plus au moins rondes pouvant parfois atteindre plusieurs centimètres de diamètre. Les espèces de galliformes concernées sont surtout la dinde et le poulet mais aussi la pintade, le faisan, la perdrix, la caille et le paon (Savay et Chermette, 1981).



**Figure 4- Taxinomie d'*Histomonas meleagridis*.** Le parasite flagellé *Histomonas meleagridis* appartient à la classe des Parabasala, à l'ordre des Trichomonadida et à la famille des Monocercomonadidae (d'après Brugerolle, 1975).

### **I-2-1-1- Un peu d'histoire**

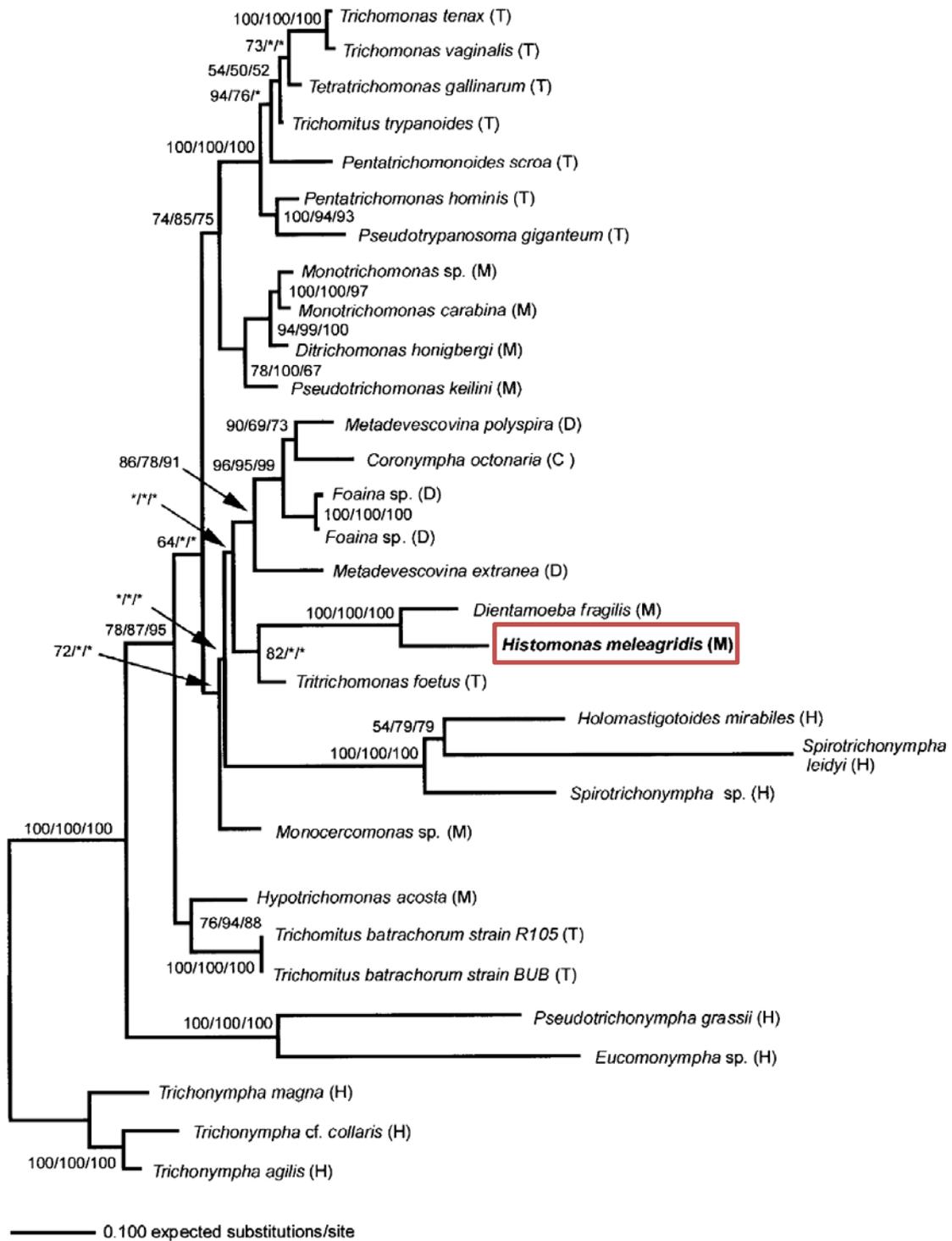
La « maladie de la tête noire » ou histomonose a été découverte dans les années 1890 à Rhode Island (USA). Cette maladie a décimé l'industrie de la dinde en Nouvelle-Angleterre et est restée une cause majeure de la mortalité des dindes dans le monde entier jusqu'à l'apparition de la chimiothérapie après la deuxième guerre mondiale. La première description de la maladie date de 1895 par Smith qui décrit un nouvel agent pathogène dans des lésions hépatiques. Cet agent fut nommé *Amoeba meleagridis* en raison de sa structure relativement simple et de la ressemblance des symptômes avec ceux de la dysenterie amoéboïque (Lund, 1969).

La plupart des connaissances actuelles sur ce parasite ont été publiées entre 1919 et 1932 par Tyzzer, qui renomma le parasite *Histomonas meleagridis*, à savoir la nature zoologique de ce parasite, son caractère de flagellé et le rôle du poulet dans son cycle épidémiologique. En 1920, l'agent responsable de la transmission du parasite aux dindes fut découvert comme étant le ver *Heterakis gallinarum*, lui-même parasite du caecum des oiseaux (Graybill, 1920 ; Tyzzer, 1920).

Depuis les années 1980, très peu de travaux ont été réalisés sur cette pathologie. Cette typhlo-hépatite s'était fait oublier car les dindes recevaient en prévention une chimiothérapie à base de diméridazole, (famille des nitroimidazoles) ou de nifursol (famille des nitrofuranes). Cependant ces molécules ont été récemment retirées du marché. Depuis le 31 mars 2003, date du retrait du nifursol, il n'existe en effet plus aucune molécule active contre le parasite dans la communauté européenne. L'interdiction de ces produits actifs pourrait entraîner une recrudescence de la maladie.

### **I-2-1-2- Importance économique**

L'importance économique de l'histomonose est liée au fort taux de mortalité ainsi qu'à la baisse de performances du lot atteint (BonDurant et Wakenell, 1994). En France, les productions de volailles les plus sévèrement touchées sont les dindes « bio », label ou AOC, mais il semble que les élevages industriels peuvent également être atteints. La situation est devenue difficile avec l'interdiction progressive de traitements thérapeutiques à base de



**Figure 5- Arbre phylogénétique des Parabasala décrit de l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale. Il indique la position phylogénétique d'*H. meleagridis*. (M) Monocercomonadidae, (T) Trichomonadidae, (D) Devescovinidae, (C) Calonymphidae, (H) Hypermastigidae (d'après Gerbod et al., 2001).**

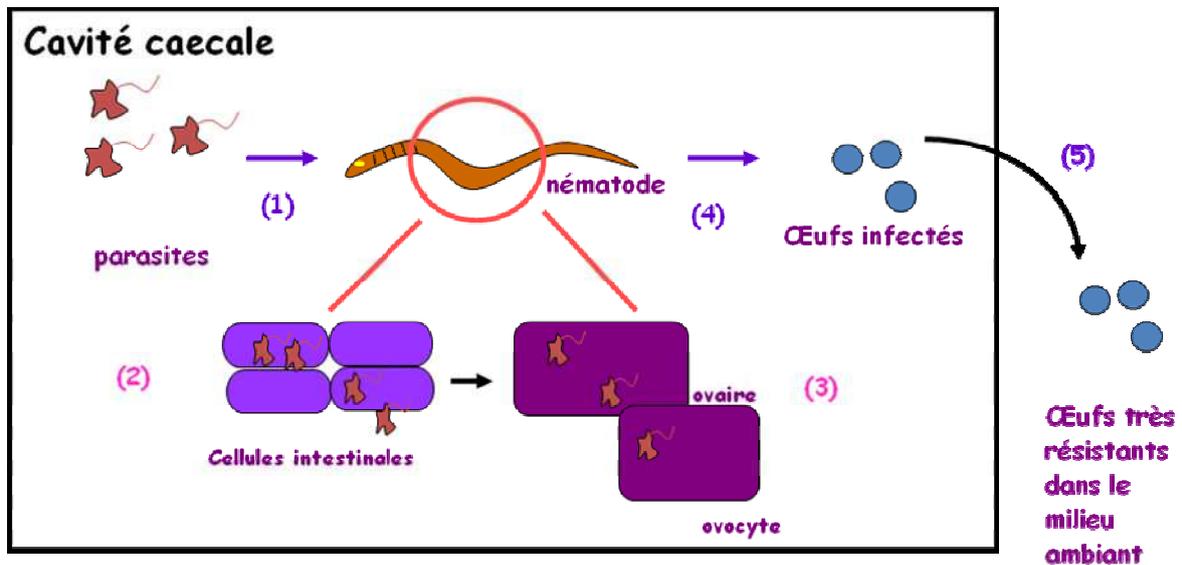
diméridazole mais les éleveurs réussissaient à contrôler la situation par l'utilisation d'additifs alimentaires. Aujourd'hui, la situation a évolué avec l'application de nouveaux textes réglementaires qui ont conduit à l'interdiction du dernier traitement préventif, le nifursol. De nouvelles données épidémiologiques provenant des Etats-Unis montrent aussi une recrudescence de la maladie dans les élevages de poulets de chair en filière industrielle (McDougald et Hu, 2001).

### **I-2-1-3- Taxinomie d'*H. meleagridis***

Tyzzar, en 1920, s'appuyant principalement sur les mouvements typiques des flagellés puis sur la visualisation d'un flagelle, classa le parasite dans l'ordre des Rhizomastigida et dans la famille des Mastigamoebidae.

La structure détaillée d'*H. meleagridis* a ensuite été étudiée en microscopie électronique à transmission (MET) par Schuster (1968) qui révèle la présence chez ce flagellé de nombreuses caractéristiques propres à la classe des Parabasala et à l'ordre des Trichomonadida : présence du complexe pelta-axostylaire et d'un appareil parabasal composé de l'appareil de Golgi, absence de mitochondrie. En 1969, le parasite fut ainsi positionné au sein de la classe des Parabasala dans l'ordre des Trichomonadida, famille des Monocercomonadidés, sous-famille des Protrichomonadinae (Honiberg et Kuldova, 1969) (figure 4).

Cette classification sera confortée par Rybicka et al. en 1972 qui montrent la présence du complexe cinétique typique des trichomonadines. Plus récemment, la position phylogénétique d'*H. meleagridis* a été confirmée par l'analyse de la séquence de l'ARNr de la petite sous unité ribosomale (figure 5) (Gerbod et al., 2001). Cette analyse révèle que *H. meleagridis* est phylogénétiquement proche du parasite intestinal humain *Dientamoeba fragilis* et montre que ces deux espèces sont probablement le résultat d'une évolution réductive liée à la perte de nombreuses structures typiques du cytosquelette des trichomonadines.



**Figure 6-** Cycle d'*H. meleagridis* dans le ver femelle *Heterakis gallinarum*. Le ver ingère le parasite flagellé dans le caecum de l'oiseau (1). Le parasite passe alors dans l'intestin du ver (2) gagne l'ovaire (3) et les oocystes en développement (4). Les œufs ainsi parasités sont expulsés dans les matières fécales de l'oiseau (5). Ils sont très résistants dans le milieu extérieur.

#### I-2-1-4- Cycle de développement

Le cycle de développement d'*H. meleagridis*, très complexe, est lié à celui du ver nématode *Heterakis gallinarum*, lui-même parasite du caecum des oiseaux. Cependant, la transmission par l'intermédiaire de ce ver ne peut pas expliquer l'étendue rapide de l'histomonose dans les élevages de dindes, entraînant 50 à 90 % de mortalité en quelques semaines (Hu et McDougald, 2003). Il existe donc certainement un mode de transmission direct.

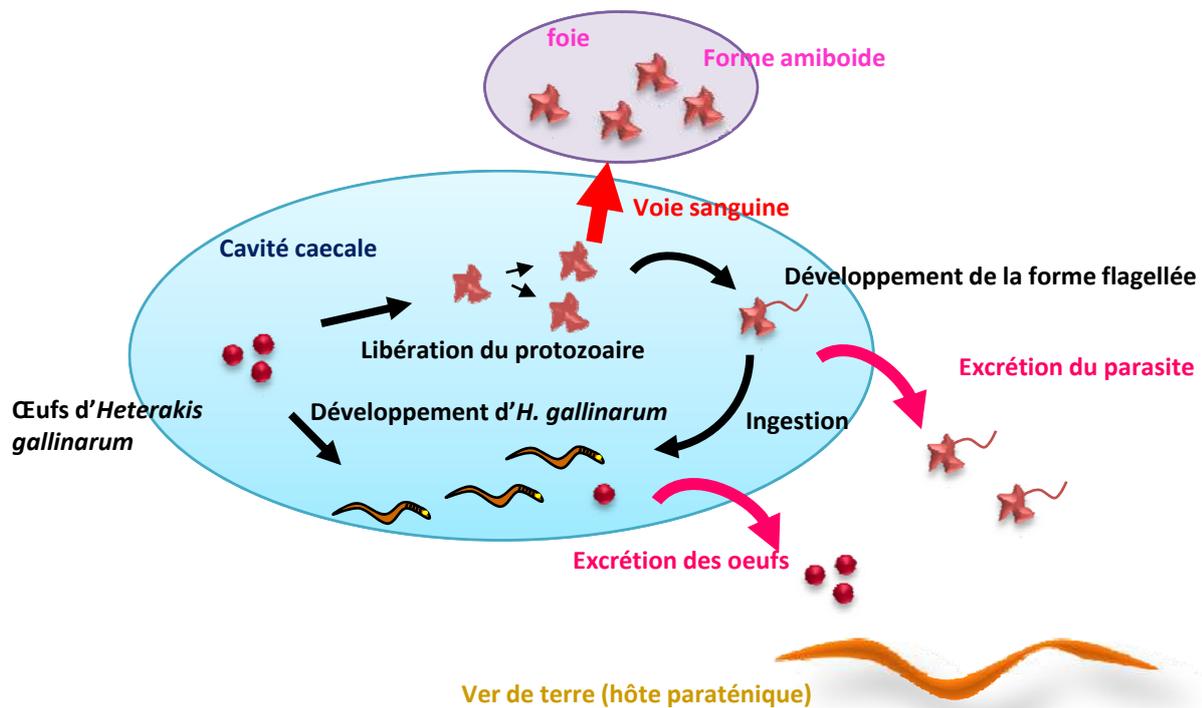
##### ✓ Le rôle d'*Heterakis gallinarum*

*Heterakis gallinarum* est un nématode qui parasite le caecum des galliformes. En 1920, Grabbill et Smith furent les premiers à montrer que la transmission d'*Histomonas meleagridis* pouvait se faire par l'intermédiaire des œufs embryonnés d'*Heterakis gallinarum*.

##### - infection d'*H. gallinarum*

Dans le caecum des oiseaux cohabitent *Histomonas meleagridis* et *Heterakis gallinarum*. Après ingestion par le ver, le parasite passe alors dans l'intestin du ver puis migre de la paroi intestinale au pseudocoelome, pour ensuite atteindre l'appareil reproducteur (Gibbs, 1962). Dans l'appareil reproducteur mâle, le parasite est présent dans le testicule sous forme amiboïde puis migre dans la vésicule séminale (Lee, 1971). L'infection de la femelle lors de la copulation est possible dans la mesure où des parasites sont retrouvés dans les spermatozoïdes chez le mâle : ils peuvent remonter l'utérus jusqu'à l'ovaire et gagner la zone germinale.

La femelle peut être infectée par *H. meleagridis* par ingestion du parasite de la même manière que le mâle. Dans l'appareil reproducteur femelle (figure 6), *H. meleagridis* occupe dans un premier temps une position extracellulaire dans la zone germinale de l'ovaire. Les parasites migrent ensuite dans les oocystes en développement puis dans les œufs du ver.



**Figure 7- Cycle d'*H. meleagridis* dans l'oiseau.** Les œufs larvés peuvent être ingérés par un oiseau. Le protozoaire est ensuite libéré dans la cavité caecale au niveau de laquelle il va se multiplier sous sa forme flagellée et va envahir la paroi caecale. Le parasite gagne le foie par voie sanguine (forme amiboïde). Dans le caecum, le protozoaire peut être ingéré par le ver *H. gallinarum*. Les œufs d'*H. gallinarum* contenant le parasite sont excrétés dans le milieu extérieur. Ils peuvent être transportés par des hôtes paraténiques tels que le ver de terre.

- rejet d'œufs embryonnés infectés

Les œufs sont expulsés dans les fientes de l'oiseau. Ces œufs sont très résistants et peuvent survivre plusieurs années dans le milieu extérieur. Au cours du développement post-embryonnaire, *H. meleagridis* passe dans les larves d'*H. gallinarum* dans lesquelles il pourra se multiplier.

- contamination des oiseaux sensibles (figure 7)

Les œufs larvés peuvent être ingérés par un oiseau. De par leur résistance, ils assurent une protection pour la survie du parasite. Ces œufs libèrent ensuite le protozoaire dans la cavité caecale où il va se multiplier. Les parasites peuvent gagner le foie par voie sanguine.

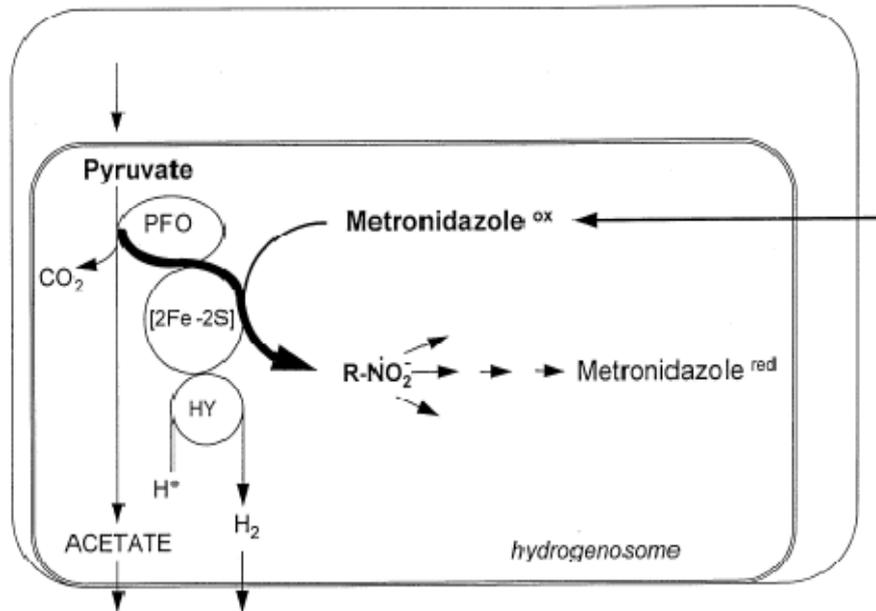
Il faut aussi souligner que, dans le caecum, le protozoaire cohabite avec les adultes d'*H. gallinarum* et peut alors être ingéré par ces derniers. De plus, le ver de terre peut jouer le rôle d'hôte paraténique d'*H. gallinarum* permettant lors de conditions climatiques extrêmes la protection des larves (Lund, 1963). La possibilité de transmission par des arthropodes tels que les mouches, les sauterelles ou criquets a été décrite mais l'importance de ces vecteurs reste minime (Spindler, 1967).

✓ la transmission directe

La transmission latérale directe du parasite par ingestion a souvent été négligée pour deux raisons : d'une part, parce que chez les oiseaux correctement nourris, l'acidité des premières portions du tube digestif entraîne une destruction des protozoaires et, d'autre part, parce qu'il a été remarqué que les parasites se multipliant dans les fientes ne survivent que quelques heures (Tyzzer, 1934).

Cependant, une étude récente a démontré que même en absence de vecteurs la contamination par *H. meleagridis* peut être très rapide. Elle se fait par coprophagie ou par ingestion d'eau ou d'aliments souillés par des fientes contaminées. Bien que le protozoaire soit détruit par l'acidité gastrique, un nombre suffisant d'*H. meleagridis* pourrait survivre et passer dans l'intestin (Hu et Mc Dougald, 2003).

De plus, une contamination par aspiration cloacale peut être envisagée. Lorsque le cloaque est en contact avec la litière, le protozoaire peut probablement être transporté jusque



**Figure 8- Activation du métronidazole dans les hydrogénosomes chez *T. vaginalis*.** En présence de métronidazole, les électrons générés par la pyruvate :ferredoxine oxydoréductase (PFO) sont transportés par la ferrédoxine [2Fe-2S] à la drogue (flèche épaisse) et non pas vers l'hydrogénase (HY). Il n'y a plus production d'H<sub>2</sub> et le radical cytotoxique R-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> est formé comme un produit intermédiaire de la réduction de la drogue (d'après Kulda, 1999).

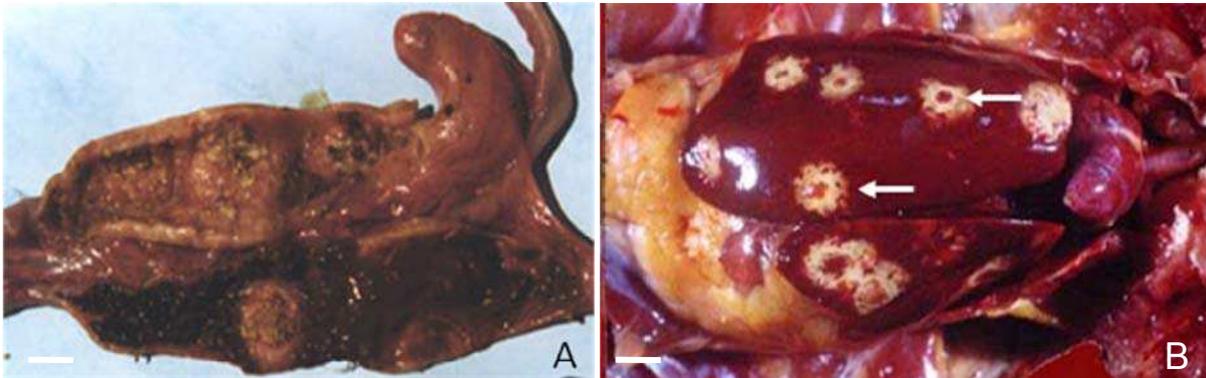
dans les caeca par un mouvement antipéristaltique (Hu et al., 2004). Néanmoins, cette aspiration cloacale n'est significative que lorsqu'un très grand nombre d'oiseaux sont déjà infectés et expulsent de nombreux parasites (De Gussem et al., 2003).

#### **I-2-1-5- La biologie d'*Histomonas meleagridis***

L'étude du métabolisme d'*H. meleagridis* a été longtemps négligée principalement du fait que le parasite se développe dans des conditions de culture non axéniques. Cependant, de nombreuses études ont été réalisées chez des protozoaires phylogénétiquement très proches d'*H. meleagridis* tels que *Trichomonas vaginalis*. *T. vaginalis* et les autres parasites du même groupe ne possèdent pas de mitochondrie et ont de ce fait un métabolisme énergétique anaérobie. Les échanges énergétiques se font à l'intérieur d'organites appelés hydrogénosomes. Les hydrogénosomes sont définis comme des organites qui, sous des conditions anoxiques, sont capables de réaliser la décarboxylation oxydative du malate ou du pyruvate en acétate, en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et en hydrogène moléculaire (H<sub>2</sub>). Ceci va s'accompagner d'une production d'énergie sous forme d'ATP (Müller, 1993).

Les observations en microscopie électronique à transmission d'*H. meleagridis* montrent la présence de saccules cytoplasmiques entourés par une « épaisse » membrane qui pourraient correspondre à des hydrogénosomes (Schuster, 1968). Cependant à cette époque, les hydrogénosomes de *T. vaginalis* n'ayant pas encore été décrits, la nature de ces saccules est restée incertaine. De plus, *H. meleagridis* est sensible au métronidazole, molécule appartenant à la famille des nitroimidazoles et agissant sur des organismes présentant un métabolisme anaérobie. En effet, chez les protozoaires sensibles comme *T. vaginalis*, le métronidazole entre dans la cellule et dans les hydrogénosomes par simple diffusion (figure 8). Les électrons générés par la pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase (PFOR), sont transportés par la ferrédoxine non pas vers leur accepteur normal, l'hydrogénase à fer, mais jusqu'à la drogue (Kulda et al., 1999). Il n'y a plus production de H<sub>2</sub> mais formation d'un radical toxique NO<sub>2</sub>.

Les données moléculaires chez *H. meleagridis* sont limitées à la séquence du gène codant l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale (Gerbod et al., 2001). Ce gène peut être utilisé pour le diagnostic par PCR (Bleyen et al., 2006).



**Figure 9-** Lésions provoquées par le parasite *H. meleagridis* au niveau du caecum (A) et au niveau du foie (B) , les flèches montrent les lésions hépatiques en forme de coquilles. Echelle: 1cm, (d'après [www.poultrymed.com](http://www.poultrymed.com)).

### **I-2-1-6- Symptômes cliniques et lésions de l'histomonose**

Cinq jours après ingestion des œufs d'*Heterakis gallinarum*, le parasite est libéré dans la cavité caecale. Une phase de multiplication d'au moins 6 jours a lieu avant l'apparition des premiers symptômes (Lund, 1972). La période d'incubation, de 7 à 10 jours, est la même quelle que soit la modalité d'infestation, œufs d'*H. gallinarum* ou vers de terre contaminés (McDougald, 1997a). Un des premiers signes de la maladie est le déclenchement d'une diarrhée jaune soufre, résultat de lésions précoces au niveau du caecum. Les autres signes cliniques sont les plumes tachées de fientes, l'anorexie, la somnolence, la démarche anormale, la tête basse ou cachée sous une aile. On observe parfois une coloration plus sombre de la tête, manifestation qui est à l'origine d'une des synonymies de la maladie.

Les lésions au niveau du caecum et du foie (figure 9) sont en général très précoces et précèdent les premiers symptômes. Après invasion des tissus par les parasites, les parois caecales sont épaissies et congestionnées. Les caeca se présentent ensuite comme de gros boudins et des lésions ulcératives se forment pouvant aboutir à la perforation de la paroi caecale provoquant une péritonite généralisée (BonDurant et al., 1994). Les lésions hépatiques apparaissent chez la dinde vers le 10<sup>ème</sup> jour sous forme de foyers nécrotiques. Cependant, il a été montré que ces lésions hépatiques pouvaient être totalement absentes (Lund, 1972). D'autres organes tels que les reins, les poumons et la rate, présentent parfois des foyers arrondis nécrotiques, hémorragiques ou nodulaires, mais sans présence de parasites (Malewitz et al., 1958).

Une mortalité importante est observée à partir du 14<sup>ème</sup> jour. En absence de traitement, plus de 90% des animaux peuvent mourir. Les dindes qui survivent vont présenter un retard de croissance par rapport aux dindes non atteintes cliniquement. Le flagellé entraîne donc une baisse importante des fonctions physiologiques de ces organes. D'autres facteurs doivent aussi être pris en compte dans l'évolution de la maladie, comme la déstabilisation de la flore bactérienne caecale qui pourrait accentuer la maladie en créant des lésions supplémentaires.



### **I-2-1-7- Epidémiologie**

De nombreux galliformes peuvent héberger le parasite. La dinde et la perdrix sont très sensibles, alors que le poulet, la pintade, le faisan, la caille et le paon développent en général une pathologie beaucoup moins marquée (Savey et Chermette., 1981 ; McDougald., 1997). Les formes les plus graves d'histomonose chez la dinde sont majoritairement observées de la 8<sup>ème</sup> à la 18<sup>ème</sup> semaine de vie (Nicholas, 1972).

Bien que les poulets soient beaucoup moins sensibles que les dindes, ils excrètent de nombreux œufs d'*H. gallinarum* et jouent ainsi un rôle important dans la transmission du flagellé (McDougald et Reid, 1978). Les oiseaux porteurs sains (volailles peu sensibles, dindes âgées, oiseaux sauvages) constituent donc des réservoirs pour ces protozoaires.

Le rôle du nématode comme vecteur est très important du fait qu'il parasite les mêmes hôtes et qu'il protège le parasite dans le milieu extérieur. Les vers de terre jouent aussi un rôle épidémiologique important en disséminant et en concentrant les parasites.

### **I-2-1-8- Diagnostic**

Le diagnostic clinique de cette affection en élevage est principalement basé sur les symptômes (diarrhée jaune soufre, anorexie, somnolence...). Le diagnostic nécrosique permet d'observer les lésions caecales et les lésions hépatiques.

Les premières observations dans un élevage présentant des mortalités et des morbidités sont :

- La présence d'une diarrhée jaune soufre
- Des caeca engorgés remplis de mucus et de sang
- Des lésions nécrotiques dans le foie en forme de cocardes qui sont en dépression, avec des bordures bien délimitées (figure 9)

Cependant, les lésions peuvent être très variables. En effet, les lésions hépatiques peuvent soit être petites et nombreuses, soit larges et bien soulignées. Elles peuvent ressembler à des lésions caractéristiques des infections bactériennes (Shivaprasaud et al., 2002).



Les protozoaires vivants peuvent être observés dans les fientes de volailles en microscopie photonique. De plus des coupes histologiques de foie et de caecum peuvent permettre de diagnostiquer la présence d'*H. meleagridis*. Cependant, de nombreux travaux ont montré que la morphologie de ce protozoaire est similaire à d'autres protozoaires tels que *Tetratrichomonas gallinarum* et *Blastocystis sp.*, qui peuvent eux aussi être présents dans le caecum des volailles (Kemp et Reid, 1965). De plus, le diagnostic basé sur les premiers signes de la maladie est ambigu étant donné la similarité des symptômes avec ceux causés par les coccidies (McDougald et Galloway, 1973).

Enfin, la culture du parasite comme un outil de détection est extrêmement difficile de par la présence d'autres microorganismes dans les fientes et les caeca des oiseaux, lesquels peuvent inhiber la croissance d'*H. meleagridis* (Delappe, 1953a).

Pour ces différentes raisons, il est d'un grand intérêt de mettre au point de nouvelles stratégies de diagnostic moléculaire. Ainsi, des approches de diagnostic d'*H. meleagridis* par PCR ont été récemment décrites, en utilisant des amorces spécifiques de la séquence de l'ARNr 18S (Hafez et al., 2005, Bleyen et al., 2006). Enfin, une étude récente d'hybridation *in situ* sur des coupes semi-fines montre également que l'on peut mettre en évidence *H. meleagridis* dans les caeca et dans le foie mais aussi au niveau des reins, de la rate et du cerveau de dindes infestées expérimentalement par le parasite (Hauck et al., 2006).

#### **I-2-1-9- La lutte contre l'histomonose**

Différents types de traitements ont été testés dans le but d'éradiquer cette maladie. Dès les années 1950, diverses molécules à base d'arsenic étaient connues pour avoir une certaine efficacité dans la lutte contre l'histomonose telles que l'oxophénarsine ou la tryparsamide (Wehr et al., 1958). Cependant, ces molécules avaient une activité très variable et étaient trop toxiques et trop onéreuses pour être utilisées régulièrement.

Les nitro-imidazoles tels que l'Ipronidazole, le Ronidazole ou le Dimétridazole (D.M.Z) sont très actifs contre *H. meleagridis* (Savey et Chermette, 1981). L'administration du D.M.Z à des dindons déjà sévèrement atteints d'histomonose est à l'origine d'une rémission rapide qui s'accompagne d'une régénération des tissus hépatiques et caeaux (Morehouse et al., 1968).



D'autres molécules telles que l'acinitrazole, un dérivé des furanes (Savey et Chermette, 1981) ont été utilisées. Le mode d'action précis de ces principes actifs n'est cependant pas connu. On peut noter que contrairement aux espèces du genre *Trichomonas*, il n'existe pas de souches d'*H. meleagridis* résistantes à ces composés (Bondurant et Wakenell, 1994).

Cependant, ces molécules, ont été retirées du marché en raison de leur toxicité pour les consommateurs. Ainsi, depuis 1995, le D.M.Z est interdit en tant que médicament destiné aux productions animales et une loi datant de 1998 généralise cette interdiction à tous les nitroimidazoles (Cahen et Vandaële, 2000). Il faut noter qu'aucun laboratoire pharmaceutique ne fait actuellement de recherches afin de pallier ces interdictions (McDougald, 1997).

De plus, l'albendazole et les autres benzimidazoles, ne semblent pas efficaces pour traiter l'histomonose (Hegngi et al., 1999). Les anticoccidiens comme la roxarsone (dérivé arsenical) et les antibiotiques actuellement autorisés sur le marché ne sont également pas efficaces contre *H. meleagridis* (Callait et al., 2002). Enfin, les essais de vaccination avec des souches atténuées ont jusqu'alors tous échoué (BonDurant et Wakenell, 1994).

Certains produits tels que le dimétridazole et le ronidazole ont aussi été utilisés en temps qu'additifs alimentaires ce qui a permis alors une prophylaxie permanente de la maladie. Mais ces molécules ont été interdites et le dernier additif alimentaire, le nirfusol, appartenant à la famille des nitrofuranes, a été retiré du marché en 2003. De ce fait, la prophylaxie sanitaire qui consiste à la séparation des espèces, notamment la séparation des dindes et les poulets, à l'utilisation de vermifuge contre le ver *H. gallinarum*, est le seul moyen de lutte actuel contre cette maladie.

En France, comme dans l'ensemble de l'Union Européenne, il n'existe plus de molécules efficaces pour traiter l'histomonose ou pour prévenir son apparition dans les élevages de volailles. On peut noter qu'aux Etats-Unis seule la nitarosone, appartenant à la famille des nitrofuranes, reste encore autorisée pour lutter contre cette maladie.



### **I-2-2- *Trichomonas* et les autres flagellés**

Plusieurs autres flagellés sont capables d'infecter les oiseaux importants pour l'industrie et les oiseaux sauvages. La plupart de ces infections sont asymptomatiques mais il existe plusieurs souches très virulentes. *Trichomonas gallinae* qui infecte les pigeons présente plusieurs souches avec des degrés de virulence différents.

*Tetratrichomonas gallinarum* est un parasite flagellé commun retrouvé chez les poulets, chez les autres galliformes mais aussi chez les oiseaux sauvages. Le genre *Tetratrichomonas* est facilement reconnaissable avec la présence de 4 flagelles antérieurs, d'un long flagelle postérieur et de l'appareil parabasal typique (Brugerolle, 1976). La virulence de cette espèce a été négligée lors de la mise en évidence d'*H. meleagridis*. Cependant, plusieurs auteurs insistent sur le fait que *T. gallinarum* peut induire des lésions au niveau du foie et de caecum chez des dindes et des poulets. De plus, de nouvelles manifestations pathologiques continuent à apparaître remettant en cause la virulence de ce parasite (Norton, 1997 ; Crespo et al., 2001).

Il a été montré que certaines souches de *T. gallinarum* sont également capables d'infecter l'Homme (Cepicka et al., 2005 ; Kutisova et al., 2005). Il est donc nécessaire d'examiner le potentiel zoonotique de ces souches.

Enfin, d'autres protozoaires sont retrouvés dans le tractus intestinal des oiseaux : *Chilomastix gallinarum* qui forme des kystes et qui est non pathogène, *Cochlostoma anatis* et *Hexamita meleagridis* qui sont pathogènes. Mais il n'y a pas de recherche sur ces espèces depuis plusieurs années.



## II- METABOLISME CHEZ LES ORGANISMES « AMITOCHONDRIAUX »

La plupart des théories sur l'évolution des eucaryotes proposent que les mitochondries et les chloroplastes, organites clés de l'évolution, sont apparus selon des mécanismes d'endosymbioses (Cavalier-Smith, 2002 ; Gray, 1999). En effet, des analyses moléculaires et phylogénétiques de plusieurs gènes et protéines de cellules eucaryotes et de bactéries démontrent que les mitochondries proviendraient d'une endosymbiose qui se serait passée il y a environ 1,8 milliards d'années (Gray et al., 1999 ; Nisbet et Sleep, 2001).

L'état actuel du génome nucléaire et du génome mitochondrial est le résultat d'un procédé complexe d'évolution réductive, d'une perte progressive des gènes redondants existant à la fois chez l'hôte et chez l'endosymbionte, mais aussi d'un transfert horizontal de gènes le plus souvent de l'endosymbionte au noyau de la cellule. Cette évolution s'accompagne aussi de phénomènes de mutations et de recombinaisons (Gray, 1999 ; Gray et al., 1999 ; Kurland et Andersson, 2000 ; Martin et Schnarrenberger, 1997). La majorité des protéines mitochondriales étant codées par le génome nucléaire, elles possèdent des pré-séquences caractéristiques à leur extrémité N-terminale permettant leur adressage à la matrice mitochondriale.

La mitochondrie a un rôle physiologique primordial pour les cellules: la production d'énergie sous forme d'ATP. Cependant, elle intervient aussi dans d'autres processus tels que l'apoptose, la  $\beta$ -oxydation des acides gras, l'assemblage des protéines à centre fer-soufre, la synthèse des stéroïdes hormonaux ou la régulation de la concentration intracellulaire en calcium (van der Giezen et Tovar, 2005).

Les organismes eucaryotes qui ne possèdent pas de mitochondries typiques ont été considérés pendant de nombreuses années comme des cellules primitives eucaryotes « amitochondriales » et étaient groupés dans le sous-règne des Archezoa (Cavalier-Smith, 1998 ; 2002). Plus récemment, chez la plupart de ces organismes, des gènes d'origine mitochondriale ont été mis en évidence. De plus, pour certains de ces organismes, il a été décrit la présence d'organites « vestigiaux » (reliques de mitochondries). Ces nouvelles découvertes ont suggéré que ces organismes avaient une origine post-mitochondriale.



Une classification a été proposée par Martin et Müller en 1998, indiquant que les organismes eucaryotes qui n'ont pas de mitochondrie typique peuvent être classés dans 3 groupes:

- le type I regroupe les organismes qui seraient apparus avant l'endosymbiose mitochondriale et qui ne possèdent donc aucun organite servant de compartiment au métabolisme énergétique.
- le type II regroupe les organismes qui ont perdu la plupart des fonctions mitochondriales typiques mais qui ont gardé des organites servant de compartiment au métabolisme énergétique. De tels organites ont été nommés hydrogénosomes.
- le type III regroupe les organismes qui ont perdu les fonctions mitochondriales typiques et ont gardé des compartiments nommés mitosomes qui n'ont plus la capacité de produire de l'énergie.

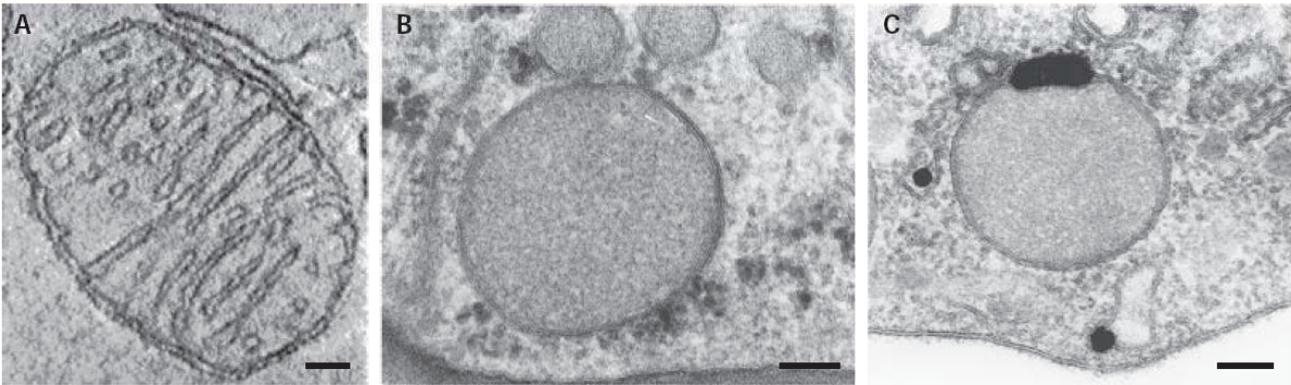
Cependant, il faut noter que les données actuelles suggèrent que la plupart des eucaryotes anaérobies appartiennent aux groupes II et III car ils possèdent des gènes d'origine mitochondriale et parfois des organites « vestigiaux ».

Nous allons dans cette partie nous attacher à décrire la morphologie des hydrogénosomes et des mitosomes, et à discuter de leur origine et de leurs capacités métaboliques.

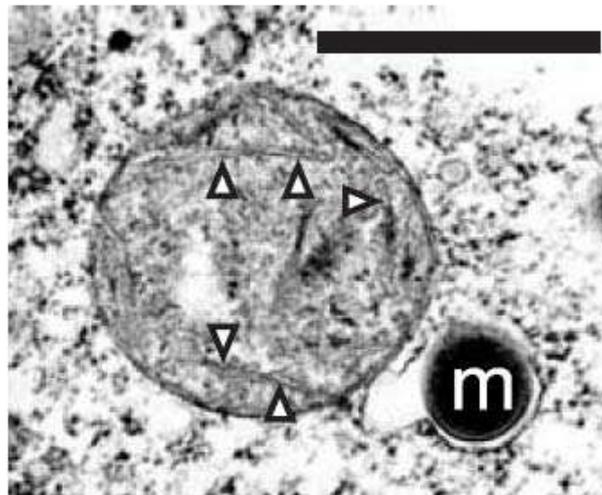
## **II-1- Les hydrogénosomes**

Les hydrogénosomes sont définis comme des organites qui, sous des conditions anoxiques, sont capables de réaliser la décarboxylation oxydative du malate ou du pyruvate en acétate, en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et en hydrogène moléculaire (H<sub>2</sub>). Ceci va s'accompagner d'une production d'énergie sous forme d'ATP (Müller, 1993). Contrairement aux mitochondries, les hydrogénosomes ne contiennent pas de cytochromes et il n'y a pas de cycle de Krebs, ni de phosphorylation oxydative liée à un transport d'électrons.

La plupart des enzymes présentes dans les hydrogénosomes sont des enzymes caractéristiques des mitochondries. Il existe cependant, deux enzymes spécifiques à ces organites : la pyruvate : ferrédoxine oxidoréductase (PFOR) et l'hydrogénase à fer (Embley et



**Figure 10-** Observations en microscopie électronique à transmission (MET) d'une mitochondrie dans le cerveau de poulet (A), d'un hydrogénosome du champignon anaérobie *Neocallimastix patriciarum* (B) et d'un hydrogénosome du flagellé de bovins *Tritrichomonas fetus* (C). Echelle : 100 nm, (d'après Van der Giezen et Tovar, 2005).



**Figure 11-** Observations en MET d'un hydrogénosome du cilié *Nictotherus ovalis*. Les flèches indiquent les crêtes. m : archae méthanogène. Echelle : 1µm, (d'après Boxma et al., 2005).

al., 2003). Les hydrogénosomes sont retrouvés chez une grande variété d'eucaryotes mais sont absents chez des organismes contenant des mitochondries, suggérant que ces deux organites sont mutuellement exclusifs.

Nous verrons dans ce chapitre qu'il existe une grande variété d'hydrogénosomes à la fois sur le plan structural et sur le plan biochimique.

### **II-1-1- Morphologie des hydrogénosomes**

Les hydrogénosomes sont des organites de forme ovoïde, de 1 à 2 µm de diamètre qui sont présents en très grand nombre dans la cellule. Chez *Tritrichomonas foetus*, flagellé parasite de bovins appartenant aux trichomonadines et pour lequel les descriptions morphologiques sont les plus nombreuses, les hydrogénosomes représentent environ 4% du volume total de la cellule (Benchimol et al., 1996). Comme les mitochondries, les hydrogénosomes sont, sans exception, entourés par deux membranes très fortement accolées (figure 10B). Dans la plupart des cas, aucun espace n'est observé entre les deux membranes. Il y a souvent présence d'une vésicule aplatie très dense aux électrons, à la périphérie de l'organite (Benchimol et al., 1996). Cette vésicule serait impliquée dans l'accumulation des ions  $Ca^{2+}$ , fonction décrite chez la mitochondrie (figure 10C) (De Souza et Benchimol, 1988). Les crêtes (repliements) de la membrane interne, caractéristiques des mitochondries (figure 10A) sont en général absentes chez les hydrogénosomes. Les eucaryotes possédant les hydrogénosomes, sont en effet des organismes anaérobies stricts ou facultatifs qui, par conséquent, n'utilisent pas l'oxygène comme accepteur final d'électrons. La large surface de la membrane interne de la mitochondrie qui a pour rôle d'augmenter la capacité de la chaîne de transport d'électrons n'est donc pas nécessaire au niveau des membranes hydrogénosomales. Cette explication est confortée par l'observation des mitochondries de levures qui sous des conditions anoxiques perdent rapidement leurs crêtes et prennent alors une morphologie de type hydrogénosomal (Llyod, 1974).

Cependant, il a été récemment montré l'existence de crêtes mitochondriales dans les hydrogénosomes chez le cilié anaérobie, *Nyctotherus ovalis*, parasite de l'intestin postérieur des cafards (Boxma et al., 2005) (figure 11).



## II-1-2- Origine et description des hydrogénosomes

Les hydrogénosomes ont été découverts dans les années 1970 chez *Tritrichomonas foetus*, parasite de chèvre (Cerkasovova et al., 1973 ; Lindmark et Müller, 1973) et chez le parasite humain *Trichomonas vaginalis* (Lindmark et al., 1975). Ces organites ont ensuite été décrits chez plusieurs ciliés anaérobies (Berger et Lynn, 1992 ; Paul et al., 1990) et chez certains champignons anaérobies (Yarlett et al., 1986). Il est intéressant de noter que ces différents organismes ont une distribution phylogénétique relativement éloignée, seules leurs conditions environnementales de survie sont similaires.

L'origine de ces organites est encore très controversée. Nous nous appuierons dans ce paragraphe sur les trois classes d'organismes présentant des hydrogénosomes pour en discuter.

### ✓ Chez les Trichomonadines

Les hydrogénosomes chez les trichomonadines (phylum Parabasala), ont été beaucoup étudiés depuis ces trente dernières années (Lindmark and Müller, 1973 ; Müller, 1993). Peu de temps après leur découverte, il a été suggéré que les hydrogénosomes provenaient d'une endosymbiose réalisée entre un eucaryote primitif et une eubactérie anaérobie du genre *Clostridium*, bactérie capable de produire de l'hydrogène en utilisant comme enzymes la pyruvate : ferrédoxine oxydo-réductase (PFOR) et l'hydrogénase à fer (Whatley et al., 1979). De plus, la mise en évidence d'une double membrane autour des hydrogénosomes de *T. foetus* a conforté l'hypothèse d'une origine endosymbiotique mais n'a pas permis de conclure sur l'origine exacte de cette endosymbiose (Benchimol et De Souza, 1983). En effet, malgré la présence d'une double membrane, ces organites étaient considérés morphologiquement et biochimiquement distincts des mitochondries (Benchimol et al., 1996).

Cependant, les études moléculaires et biochimiques ont véritablement changé cette vision. Tout d'abord, l'identification de gènes chez *T. vaginalis* codant pour des protéines chaperonnes de type mitochondrial (Hsp70 et Hsp60) suggère que les hydrogénosomes partagent un ancêtre commun avec la mitochondrie (Germot et al., 1996 ; Bui et al., 1996 ; Horner et al., 1996 ; Roger et al., 1996). De plus, la localisation d'une de ces protéines



(Hsp60) au niveau des hydrogénosomes (Bui et al., 1996 ; Bozner, 1997), la présence de la protéine membranaire hydrogénomale (HMP31) de la famille des transporteurs mitochondriaux (Dyall et al., 2001) et d'une enzyme l'acétate : succinate coenzyme A synthétase retrouvée aussi chez les mitochondries (Tielens et al., 2002) fournissent des preuves supplémentaires à l'hypothèse de l'origine mitochondriale. Plus récemment, deux protéines de 24 et 51 kDa correspondant à des sous-unités de la NADH déshydrogénase du complexe I, faisant partie de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie, ont été identifiées (Dyall et al., 2004a ; Hrdy et al., 2004). Ces protéines seraient d'origine mitochondriale et participeraient au métabolisme hydrogénomal pour la production de l'hydrogène moléculaire (Dyall et al., 2004b).

Cependant, malgré ces ressemblances, les hydrogénosomes de *T. vaginalis* présentent des différences importantes avec les mitochondries : absence de génome, de ribosomes, de cytochromes, de chaînes de transport d'électrons, de cardiolipine et de crêtes mitochondriales (Benchimol et al., 1996 ; Voncken et al., 2002). De plus, les hydrogénosomes de *T. vaginalis* possèdent deux enzymes clés, sensibles à l'oxygène et retrouvées chez des bactéries de type anaérobie : l'hydrogénase à fer et la pyruvate : ferrédoxine oxydo-réductase. Notons que les enzymes hydrogénomales chez *T. vaginalis* ne possèdent pas de préséquences identiques à celles des protéines mitochondriales. Par contre elles possèdent une extension N-terminale très courte (8 à 13 acides aminés) commençant par la séquence Met-Leu-Ala/ Ser/ Thr et avec une arginine en position -2 par rapport au site de coupure (Lahti et al., 1994; Alderete et al., 1995).

✓ **Chez les Chytrides anaérobies du genre Neocallimastix**

Les chytrides anaérobies sont des champignons symbiontes importants retrouvés dans le tractus gastrointestinal de nombreux mammifères. Il a été montré que ces organismes se sont adaptés secondairement à un système de vie anaérobie (Yarlett, 1994 ; Voncken et al., 2002).

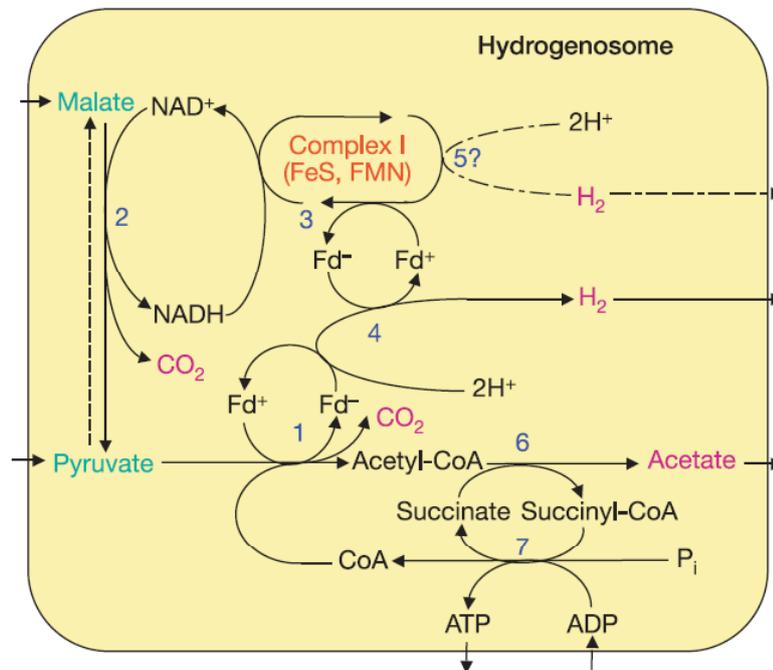
Les hydrogénosomes ont été mis en évidence en 1986, chez le genre *Neocallimastix* qui ne possède pas de mitochondrie (Yarlett et al., 1986). L'observation en MET d'une simple membrane (Yarlett et al., 1986) laissait supposer que ces hydrogénosomes pourraient être des



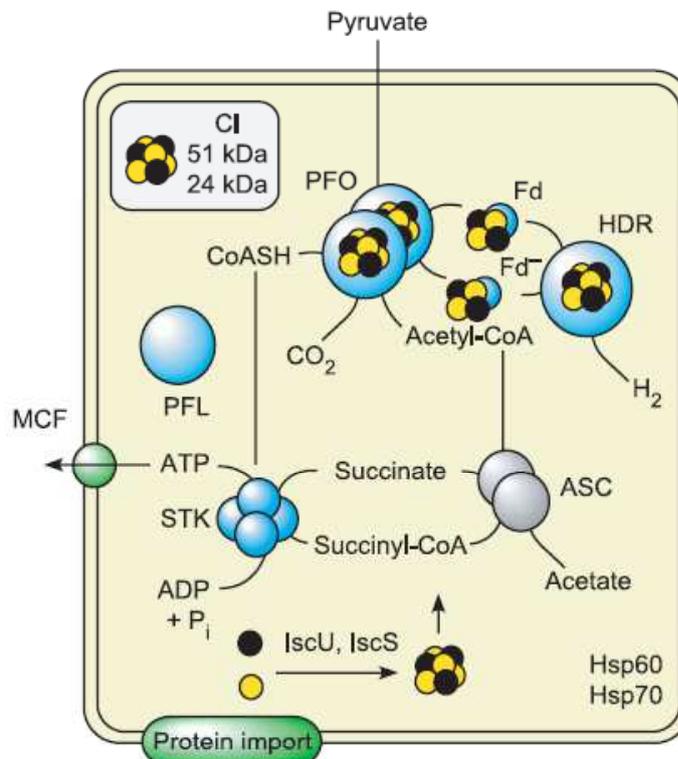
peroxysomes modifiés (Cavalier-Smith, 1987). Deux autres études ont ensuite permis de montrer qu'il y a en fait deux membranes autour des hydrogénosomes de *Neocallimastix* (Benchimol et al., 1997 ; van der Giezen et al., 1997). Ces deux membranes ressemblent à celles des hydrogénosomes du flagellé *T. vaginalis*. De plus, comme chez *T. vaginalis*, il n'a pas été mis en évidence de génome hydrogénosomal chez *Neocallimastix* (van der Giezen et al., 1997). Il est intéressant de noter que les protéines hydrogénosomales de ces champignons contiennent des pré-séquences classiques des protéines mitochondriales. Des expériences de génétique fonctionnelle montrent en effet que ces pré-séquences sont capables de cibler les protéines à la mitochondrie chez un organisme hétérologue. Ainsi, l'enzyme malique hydrogénosomale de *N. frontalis* est adressée dans la mitochondrie de la levure *Hansenula polymorpha* (van der Giezen et al., 1998, 2003). Enfin, les hydrogénosomes des champignons possèdent des transporteurs ADP/ATP d'origine mitochondriale permettant l'échange d'ATP dans les hydrogénosomes (Van der Giezen et al., 2002 ; Voncken et al., 2002) et possèdent aussi des protéines chaperonnes de type mitochondrial ( Van der Giezen et al., 2003), ainsi que la succinyl-CoenzymeA synthétase qui confirme également l'affiliation mitochondriale (Dacks et al., 2006).

✓ **Chez le cilié anaérobie *Nyctotherus ovalis***

Les ciliés anaérobies sont le troisième groupe d'organismes contenant des organites de type hydrogénosome. Chez le cilié *Nyctotherus ovalis*, parasite de l'intestin postérieur des cafards, les hydrogénosomes ont une morphologie et une composition particulières. En effet, la membrane interne possède des crêtes ressemblant à celles caractéristiques des mitochondries, et des ribosomes ont été observés. De plus, il a été montré, récemment, la présence d'un génome rudimentaire dans ces hydrogénosomes (Akhmanova et al., 1998 ; Boxma et al., 2005). L'amplification partielle de ce génome montre qu'il code au moins pour quatre sous-unités du complexe I mitochondrial (*nad2*, *nad4L*, *nad5* et *nad7*) et pour deux protéines ribosomales mitochondriales (RPL2 et RPL14). L'analyse phylogénétique de ces protéines révèle qu'elles sont homologues aux protéines de la chaîne respiratoire chez les ciliés vivant dans des conditions aérobies (Van Hoek et al., 2000 ; Hackstein et al., 2001). De plus, plusieurs protéines codées par des gènes nucléaires ont une origine mitochondriale : la



**Figure 12- Métabolisme hydrogénosomal chez *Trichomonas vaginalis*.** (1) pyruvate : ferrédoxine oxydo réductase ; (2) NAD(P) enzyme malique ; (3) NADH :ferrédoxine oxydoréductase (51kDa (Tvh-47) et 24 kDa (Tvh-22)) ; (4) hydrogénase à fer dépendante de la ferrédoxine ; (5) hydrogénase à fer hypothétique de 65 kDa dépendante de NAD ; (6) acétate : succinate CoA transférase ; (7) succinate thiokinase (succinyl coA synthétase) (d'après Hrdy et al., 2004).



**Figure 13- Enzymes potentiellement retrouvées dans les hydrogénosomes.** Toutes les enzymes représentées ici sont présentes chez *T. vaginalis*, seule la PFL est spécifique à *Neocallimastix*. CI, complexe I mitochondrial ; PFO, pyruvate : ferrédoxine oxydo réductase ; Fd, ferrédoxine ; HDR, hydrogénase à fer ; PFL, pyruvate formate lyase ; MCF, transporteur mitochondrial ATP/ADP ; STK, succinate thiokinase (succinyl coA synthétase) ; ASC, acétate : succinate CoA transférase ; IscU, protéines impliquées dans la synthèse des centres fer-soufre ; IscS, cystéine désulfurase (d'après Embley et Martin, 2006).

pyruvate déshydrogénase et les protéines du complexe II de la chaîne mitochondriale. Les hydrogénosomes de *N. ovalis* sont donc actuellement uniques et ne sont pas représentatifs de tous les hydrogénosomes.

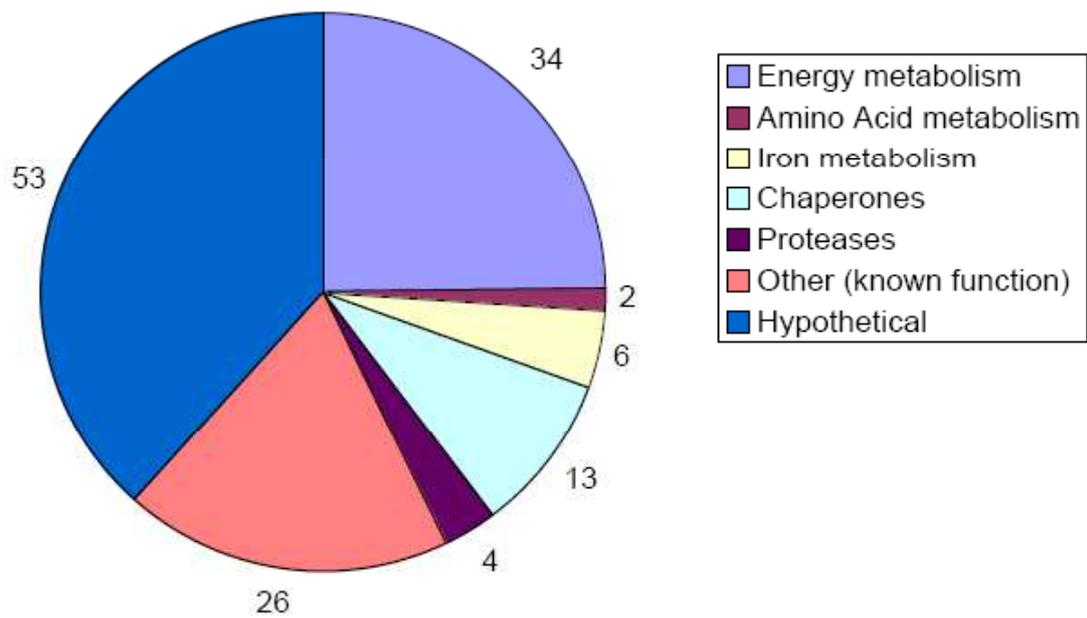
### II-1-3- Le métabolisme hydrogénosomal

La fonction majeure de la mitochondrie est de convertir le pyruvate en acétyl-coenzymeA et de produire de l'énergie sous forme d'ATP (26 à 30 molécules d'ATP produites par l'oxydation complète d'une molécule de glucose). La fonction principale de l'hydrogénosome est la décarboxylation oxydative du pyruvate couplée à la production d'ATP. Cependant l'énergie produite dans l'hydrogénosome est minime comparée à celle produite par la mitochondrie (une seule molécule d'ATP est en effet produite par molécule de pyruvate consommée). De plus, la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA dans la mitochondrie se fait grâce à la pyruvate déshydrogénase, complexe multienzymatique de très grande taille, alors que l'hydrogénosome utilise une seule protéine qui est une enzyme clé de ce métabolisme, la pyruvate: ferrédoxine oxydoréductase (PFOR).

Nous nous attacherons, dans un premier temps, à décrire le métabolisme hydrogénosomal chez *T. vaginalis* qui a été plus largement étudié que chez les autres organismes (figure 12).

Le pyruvate, formé lors de la glycolyse entre dans l'hydrogénosome et est décarboxylé par la PFOR en acétyl-coenzymeA (1). Cette décarboxylation est également liée à un transport d'électrons, réalisé grâce à la ferrédoxine et entraîne la production de molécules d'hydrogène. L'étape suivante consiste au transfert du résidu coA au succinate par l'acétate : succinate coA transférase, l'acétate étant le produit final de la réaction (6). Le succinyl-coA sert de substrat à la succinyl coA synthétase, qui va permettre la production de molécules d'ATP (7). Le résidu CoA est libéré et va être recyclé pour la réaction catalysée par la PFOR.

Le malate peut aussi pénétrer dans l'hydrogénosome. Il est alors décarboxylé en pyruvate par une enzyme malique dépendante de NAD (P<sup>+</sup>) (2). La réoxydation du NAD se fait par une enzyme du complexe I, la NADH: ferrédoxine oxydoréductase (3), liée à la ferrédoxine. Il a été montré, sur des organites isolés, que la réaction peut se faire en sens inverse, le malate étant alors un produit final du métabolisme hydrogénosomal.



**Figure 14- Représentation graphique des 138 protéines putatives hydrogénomales classées par fonction chez *T. vaginalis* (d'après Carlton et al., 2007).**

La seconde différence majeure entre l'hydrogénosome et la mitochondrie est que les protons sont les derniers accepteurs d'électrons et non pas l'oxygène. Une hydrogénase (4), enzyme dépendante du fer, liée à la ferrédoxine, est l'enzyme qui va permettre le couplage des électrons aux ions hydrogènes pour produire la molécule d'hydrogène. De plus, une autre hydrogénase à fer de 65 kDa de *T. vaginalis* dépendant du NAD serait capable d'interagir avec la NADH déshydrogénase du complexe I pour produire de l'hydrogène (5) (Hrdy et al., 2004).

Plusieurs autres fonctions des hydrogénosomes de *T. vaginalis* ont été décrites. Les hydrogénosomes peuvent ainsi servir de réservoirs d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Humphreys et al., 1994; Benchimol et al., 1996). Les études sur le fonctionnement du métabolisme des hydrogénosomes ont montré l'existence de deux gènes codant des cystéine désulfurases de type mitochondrial (*iscS*) chez *T. vaginalis* (figure 13) (Tachezy et al., 2001). Les protéines IscS jouent un rôle central dans la biosynthèse des complexes fer-soufre, une fonction essentielle de la mitochondrie (Lill et al., 1999 ; Lill et Kispal, 2000). Ces protéines étant retrouvées dans l'hydrogénosome de *T. vaginalis*, il est donc suggéré qu'un autre rôle des hydrogénosomes est de permettre la biosynthèse des centres fer-soufre (Sutak et al., 2004). L'analyse récente du génome de *T. vaginalis* montre que les protéines impliquées dans la formation des centres fer-soufre possèdent en effet les signaux d'adressage aux hydrogénosomes et que la machinerie complète, permettant la formation des ces centres, est présente dans l'organite (Carlton et al., 2007).

Les hydrogénosomes interviennent également dans le métabolisme des acides aminés (Mukherjee et al., 2006a). Il a en effet été identifié deux composants du complexe de clivage de la glycine (GCV), la protéine L et la protéine H, ainsi que la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) qui, chez les eucaryotes, existe sous une isoforme cytosolique et un isoforme mitochondriale. Chez *T. vaginalis*, un seul gène codant l'isoforme mitochondriale est présent, et code pour une protéine présentant une séquence putative N-terminale d'adressage dans l'hydrogénosome (Carlton et al., 2007).

L'analyse du génome de *T. vaginalis* a mis en évidence 138 protéines présentant des pré-séquences d'import dans les hydrogénosomes. Parmi ces protéines, seules 34 sont impliquées dans le métabolisme énergétique, six interviennent dans le métabolisme du fer et deux sont impliquées dans le métabolisme des acides aminés (figure 14).



Le métabolisme hydrogénomal chez les ciliés et les champignons a été beaucoup moins étudié. Cependant, les premières données montrent des différences significatives avec *T. vaginalis*. Une des différences majeures entre l'hydrogénosome des trichomonadines et des chytrides concerne le catabolisme du pyruvate : alors que les trichomonadines utilisent la PFOR pour la décarboxylation du pyruvate en acétyl-coA, l'activité enzymatique majeure impliquée dans le métabolisme chez *Neocallimastix* est exercée par la pyruvate:formate lyase (PFL), enzyme que l'on retrouve chez les bactéries fermentatives qui scinde le pyruvate en acétyl coenzymeA et en formate (Akhamanova et al., 1999 ; Boxma et al., 2004). Les hydrogénosomes des chytrides utilisent donc le malate à la place du pyruvate pour la formation de l'hydrogène moléculaire. Les produits du métabolisme énergétique final sont alors l'hydrogène moléculaire, le formate et l'acétate.

Enfin, l'hydrogénosome de *N. ovalis* ne possède également pas de PFOR mais une enzyme que l'on retrouve dans la mitochondrie, située au carrefour de la glycolyse et du cycle de Krebs, la pyruvate déshydrogénase (PDH), complexe multienzymatique permettant la décarboxylation du pyruvate. Il a été montré que le succinate est synthétisé dans ces hydrogénosomes comme le produit métabolique majeur final, à la place de l'acétate produit final classique du métabolisme hydrogénomal des trichomonadines (Boxma et al., 2005). Ceci montre une parenté des hydrogénosomes de *N. ovalis* avec les mitochondries de type anaérobie retrouvées chez des helminthes aérobies capables de survivre en absence d'oxygène (*Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*). L'observation de caractéristiques mitochondriales, combinée à la production de dihydrogène, définit l'hydrogénosome de *N. ovalis* comme un chaînon manquant dans l'évolution de la mitochondrie et de l'hydrogénosome.

#### **II-1-4- Particularité des protéines hydrogénomales chez *Trichomonas vaginalis***

Le protozoaire flagellé *T. vaginalis* est l'agent de la trichomonose, une des maladies communes non virales transmissibles à l'Homme. L'adhésion du parasite aux cellules épithéliales vaginales est essentielle pour l'initiation et le maintien de l'infection par le parasite. Cette cytoadhérence est liée à des interactions de type récepteurs-ligands (Alderete et Garza, 1985 ; Alderete et al., 1988), dans lesquelles interviennent des protéines de surface



nommées AP65, AP51, AP33 et AP23 ( AP pour « adhesion protein ») (Alderete et Garza, 1988 ; Arroyo et al., 1992) .

Il a été montré que trois de ces quatre protéines (AP65, AP51, AP33), appartenant à des familles multigéniques, sont en réalité des enzymes hydrogénosomales (Müller, 1993 ; Kulda, 1999). La protéine AP65 correspond à l'enzyme malique hydrogénosomale, la protéine AP33 à la sous-unité  $\alpha$  de la succinyl-coenzyme A synthétase ( $\alpha$ -SCS) et la protéine AP51 à la sous-unité  $\beta$  de la succinyl-coenzyme A synthétase ( $\beta$ -SCS). La transcription des gènes codant ces protéines est régulée positivement par le fer (Alderete et al., 1995 ; 2001 ; Engbring et al., 1996 ; Engbring et Alderete, 1998a) excepté pour la protéine AP51 (Alderete et al., 1998b). Dans des conditions normales ces protéines sont localisées dans les hydrogénosomes mais lorsqu'il y a une augmentation de la concentration en fer dans la cellule ou lorsque les parasites sont en contact avec la cellule-hôte, les protéines se relocalisent au niveau de la membrane plasmique du parasite. Elles jouent alors le rôle de protéines d'adhésion (Alderete et al., 2001 ; Garcia et al., 2003). Des expériences d'extinction du gène codant pour la protéine AP65 montrent en effet une réduction du taux d'adhésion des parasites aux cellules épithéliales vaginales (Mundodi et al., 2004). De plus, l'expression hétérologue de la protéine AP65 de *T. vaginalis* chez *Tritrichomonas foetus* montre que cette protéine hétérologue est fonctionnelle et qu'elle est localisée dans les hydrogénosomes ainsi qu'à la surface du parasite (Kucknoor et al., 2005a). Enfin, il a été observé que ces parasites exprimant la protéine hétérologue Tv-AP65 étaient capables d'adhérer aux cellules humaines VECs (Vaginal Epithelial Cells) alors que ces cellules ne sont pas les hôtes naturels de *T. foetus*.

Récemment, une nouvelle protéine de 120 kDa (AP120), possédant cette dualité fonctionnelle, a été identifiée (Moreno-Brito et al., 2005). Elle correspond à l'enzyme hydrogénosomale permettant la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA, la pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase (PFOR). Cette enzyme a le même comportement que les protéines AP65 et AP33. En effet, elle est relocalisée à la surface du parasite lorsque du fer est rajouté dans le milieu de culture. De plus, une protéine de 130 kDa a été détectée à la surface de cellules HeLa comme étant un récepteur de la protéine AP120.

*T. vaginalis* fait partie des pathogènes qui possèdent des enzymes métaboliques associées à la surface, les SAEs (surface-associated metabolic enzymes) (Alderete et al.,

Function	Representative reference <sup>a</sup>
<b>Mammalian cells</b>	
1. Membrane fusion and transport	Morero <i>et al.</i> (1985); Hessler <i>et al.</i> (1998)
2. Nitric oxide	Dimmeler and Brune (1993); Brune and Lapetina (1995)
3. Apoptosis	Vartanian <i>et al.</i> (1997); Ishitani <i>et al.</i> (1998)
4. Neuronal disorders	Sawa <i>et al.</i> (1997); Wu <i>et al.</i> (1997); Ishitani <i>et al.</i> (1998)
5. Viral pathogenesis	De, Gupta <i>et al.</i> (1996); Carlile <i>et al.</i> (1998)
6. Prostate cancer	Scharief <i>et al.</i> (1994); Gong <i>et al.</i> (1996)
7. Endocytosis	Robbins <i>et al.</i> (1995)
8. Microtubule bundling	Kumagai and Sakai (1983)
9. Phosphotransferase/kinase	Duclos-Vallee <i>et al.</i> (1998); Engel <i>et al.</i> (1998)
10. Transcription/translational regulation	Morgenegg <i>et al.</i> (1986)
11. Nuclear RNA and tRNA export	Meyer-Siegler <i>et al.</i> (1991); Singh and Green (1993); Nagy and Rigby (1995); Zang <i>et al.</i> (1998)
12. DNA replication	Grosse <i>et al.</i> (1986); Baxi and Vishwanatha (1995)
13. DNA repair	Vollberg <i>et al.</i> (1987); Cool and Sirover (1989); Baxi and Vishwanatha (1995)
<b>Microbial pathogens</b>	
1. Plasmin-binding protein	Lottenberg <i>et al.</i> (1992); Pancholi and Fischetti (1992)
2. ADP-ribosylating enzyme	Pancholi and Fischetti (1993)
3. Phosphotransferase/kinase	Pancholi and Fischetti (1997)
4. Transferrin receptor	Modun and Williams (1999); Modun <i>et al.</i> (2000)
5. Binding protein for fibronectin, lysozyme, myosin, and actin	Pancholi and Fischetti (1992); Gil-Navarro <i>et al.</i> (1997); Gozalbo <i>et al.</i> (1998)
6. Flocculation	Fernandes <i>et al.</i> (1993); Moreira <i>et al.</i> (2000)
7. Immunogenic protein	Goudot-Crozel <i>et al.</i> (1989); Gil-Navarro <i>et al.</i> (1997)

**Tableau 1- Diversité fonctionnelle de la GAPDH dans les cellules de mammifères et chez les pathogènes microbiens (d'après Alderete et al., 2001).**

2001). Ces protéines ont été nommées « moonlighting » car elles peuvent changer de fonction suite à une modification de leur localisation cellulaire, une expression dans un nouveau type cellulaire mais aussi en raison d'une certaine concentration cellulaire en ligands, en substrats ou en cofacteurs. L'exemple clé de la diversité fonctionnelle des enzymes métaboliques qui présentent des fonctions alternatives est la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Pancholi et Fischetti, 1993 ; Alderete et al., 2001 ; Maeda et al., 2004) qui est classée comme une des protéines « moonlighting » typiques dans la nature (Jeffery et al., 1999). Il existe environ quinze fonctions décrites pour la GAPDH (tableau 1). En effet, cette enzyme intervient dans les réactions de la glycolyse mais elle joue un rôle à la fois dans des fonctions cellulaires classiques et dans certaines pathologies.

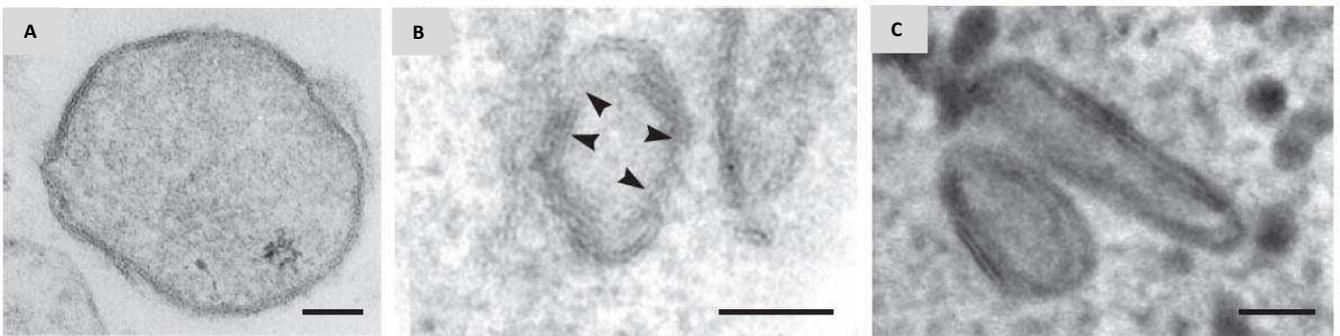
Ainsi, chez *T. vaginalis*, le fer est un des facteurs qui va déclencher le changement de fonction de ces protéines et donc moduler leur localisation à l'extérieur des hydrogénosomes (Garcia et al., 2003).

De la même façon, un phénomène similaire peut avoir lieu avec la PFOR d'*Entamoeba histolytica*, qui peut être localisée à la fois dans les organites ressemblant aux kinétoplastes (EhkO) (Rodriguez et al., 1996 ; Luna-Arias et al., 2003) mais aussi au niveau de la membrane plasmique (Rodriguez et al., 1998). Cependant le rôle de cette protéine à la surface du parasite n'a pas encore été élucidé.

## **II-2- Les mitosomes**

Plus récemment, il a été mis en évidence des organites dont l'origine semblait être mitochondriale, comme les hydrogénosomes, mais ne présentant pas d'hydrogénase (Mai et al., 1999 ; Riordan et al., 2003 ; Tovar et al., 1999 ; Williams et al., 2002). Les pressions de sélections environnementales étant différentes pour chaque organisme, ces organites, dérivés des mitochondries, ont du subir différents stades de réduction.

Ceci peut être illustré par la présence d'une protéine chaperonne 60 mitochondriale (Cpn 60) dans ces organites particuliers chez l'amibe *Entamoeba histolytica* et chez l'apicomplexe *Cryptosporidium parvum*. Cette protéine est apparemment absente chez les microsporidies, autres organismes à posséder des « reliques » mitochondriales (Kantika et al., 2001 ; Mai et al., 1999 ; Riordan et al., 2003 ; Tovar et al., 1999 ; Williams et al., 2002).



**Figure 15-** Photos en MET de mitosomes du parasite intestinal *Entamoeba histolytica* (A), de la microsporidie *Trachipleistophora hominis* (B) et de la diplomonadine *Giardia intestinalis* (C). Echelle : 100nm (A), 50 nm (B, C) ( d'après Van der Giezen et Tovar., 2005).

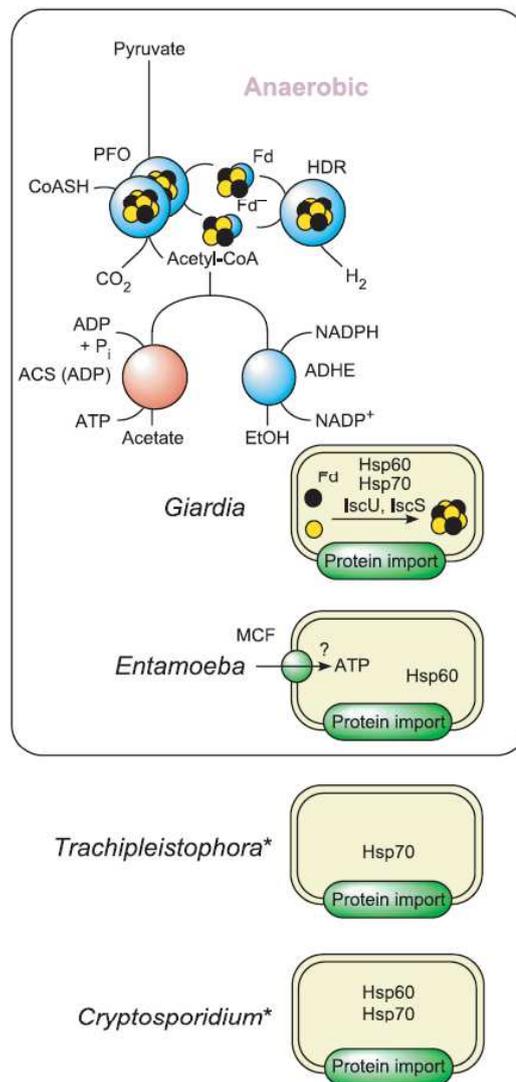
Deux noms différents ont été proposés pour nommer ces organites dérivés des mitochondries chez *Entamoeba histolytica* : (1) mitosomes (Tovar et al., 1999) pour indiquer leur ressemblance avec les mitochondries et (2) « cryptons » (Mai et al., 1999) pour indiquer leur nature cachée et leur fonction inconnue.

### **II-2-1- Morphologie**

Les mitosomes apparaissent moins uniformes en taille que les hydrogénosomes (figure 15). La taille, estimée sur des images de microscopie photonique, pour les mitosomes d'*E. histolytica*, est de 1 à 2 µm de diamètre (Tovar et al., 1999). Par ailleurs, la taille estimée en MET, des mitosomes de la microsporidie *Trachipleistophora hominis* est de 50nm x 90nm et celle de *Cryptosporidium parvum* est de 150 à 300 nm. Les mitosomes sont donc significativement plus petits que les mitochondries et les hydrogénosomes (Riordan et al., 2003 ; Williams et al., 2002). Ils sont entourés comme les hydrogénosomes et les mitochondries par une double membrane. Par contre, ni les mitosomes de *T. hominis* et ni ceux d'*E. histolytica* ne contiennent des crêtes au niveau de la membrane interne.

### **II-2-2- Origine des mitosomes**

Les mitosomes ont été identifiés, pour la première fois, chez le pathogène intestinal humain *Entamoeba histolytica* comme étant de petits organites dans lesquels on trouve la protéine de type mitochondrial Cpn60 (Mai et al., 1999 ; Tovar et al., 1999). Il faut préciser que les études ultrastructurales et biochimiques chez *E. histolytica* n'avaient pas permis d'identifier un compartiment cellulaire spécifique du métabolisme énergétique (Martinez-Palomo, 1993 ; McLaughlin et Aley, 1985). De plus, l'absence d'enzymes du cycle de Krebs et de cytochromes et la présence d'enzymes du métabolisme anaérobie dans le cytoplasme de la cellule ont laissé supposer que cette amibe appartenait à la classe des organismes de type I (amitochondriaux) (Reeves et al., 1997). En 1995, Clark et Roger ont identifié deux gènes nucléaires codant respectivement la pyridine nucléotide transhydrogénase (PNT) et la chaperonne Cpn60.



**Figure 16- Fonctions biochimiques connues dans les mitosomes.;** PFOR, pyruvate : ferrédoxine oxydo réductase ; Fd, ferrédoxine ; HDR, hydrogénase à fer ; PFL, pyruvate formate lyase ; MCF, transporteur mitochondrial ATP/ADP ; STK, succinate thiokinase (succinyl coA synthétase) ; ASC, acétate : succinate CoA transférase ; IscU, protéines impliquées dans la synthèse des centres fer-soufre ; IscS, cystéine désulfurase (d'après Embley et Martin, 2006).

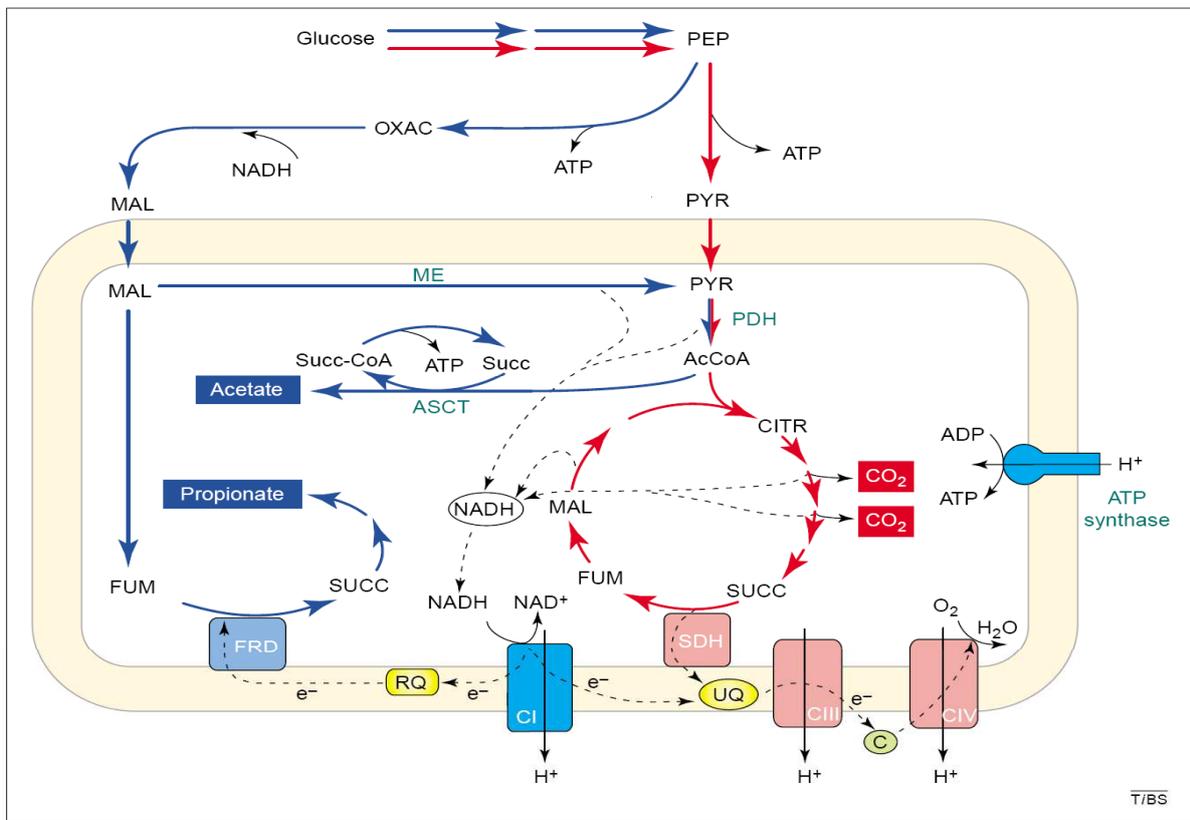
Le clonage et la caractérisation du gène Cpn60 et l'immunolocalisation de la protéine codée par ce gène ont permis de mettre en évidence le mitosome. Ces petits compartiments cytoplasmiques ont un mécanisme d'import des protéines conservé avec celui des mitochondries et des hydrogénosomes (Mai et al., 1999 ; Tovar et al., 1999).

Depuis, des organites de type mitosome ont été identifiés chez d'autres organismes amitochondriaux : la microsporidie *Trachipleistophora hominis* (Williams et al., 2002), l'apicomplexe *Cryptosporidium parvum* (Riordan et al., 2003), le pathogène intestinal humain *Giardia intestinalis* (Tovar et al., 2003).

### **II-2-3- Capacité métabolique des mitosomes**

La découverte des mitosomes est très récente ce qui fait que très peu de données sont connues sur les fonctions physiologiques de ces organites. Les mitosomes sont retrouvés chez les organismes amitochondriaux de type III. En effet, ils ne semblent pas avoir de rôle direct dans la synthèse d'ATP car ils n'ont été trouvés que chez des organismes dont la synthèse d'ATP se fait dans le cytosol (figure 16) (Müller, 2000).

Plusieurs protéines d'origine mitochondriale ont été mises en évidence à l'intérieur des mitosomes. C'est le cas de la protéine chaperonne Cpn60, protéine impliquée dans le repliement des protéines importées qui a été mise en évidence chez *E. histolytica* et *C. parvum* (Sigler et al., 1998 ; Mai et al., 1999. Tovar et al., 1999 ; Riordan et al., 2003). De plus, une protéine Hsp70 de type mitochondrial (mtHsp70), servant à internaliser les protéines dans les organites est aussi présente dans les mitosomes de *T. hominis* (Matouschek et al., 2000 ; Williams et al., 2002). La protéine Hsp70 a aussi été identifiée chez *Giardia* et *E. histolytica* mais sa localisation reste à l'heure actuelle inconnue (Bakatselou et al., 2000 ; Arisue et al., 2002). Enfin, la cardiolipine, qui est localisée dans la membrane interne de la mitochondrie, a été trouvée chez *Giardia* (Lloyd et al., 2002), ce qui renforcé l'idée que cet organisme dérive d'un organisme ancestral qui contenait des mitochondries. Notons qu'*E. histolytica* et *G. intestinalis* possèdent une hydrogénase à fer et une PFOR, mais que ces enzymes ne possèdent pas de pré-séquences caractéristiques du système d'import des protéines mitochondriales, ce qui pourrait expliquer que ces protéines restent dans le cytoplasme.



**Figure 17- Comparaison du métabolisme mitochondrial chez une mitochondrie fonctionnant en aérobie et en anaérobie.** La figure représente le métabolisme en aérobie (flèches rouges) et en anaérobie (flèches bleues) chez *Fasciola hepatica*. Le transport d'électrons est tracé en pointillés et les produits du métabolisme final sont encadrés. Abréviations : AcCoA, acétyl-CoA ; ASCT, acétate :succinate coA-transférase ; C, Cytochrome c ; CI, complexe I ; C III, complexe III ; CIV, complexe IV ; CITR, citrate ; FRD, fumarate réductase ; FUM, fumarate ; MAL, malate ; ME, Enzyme malique ; OXAC, oxaloacétate ; PDH, pyruvate déshydrogénase ; PEP, phosphoenolpyruvate ; PYR, pyruvate ; RQ, rholoquinone ; SDH, succinate déshydrogénase ; SUCC, succinate ; Succ-CoA, succinil-CoA ; UQ, ubiquinone (d'après Tielens et al., 2002).

La découverte la plus importante concernant la biologie des mitosomes est la démonstration directe que ces organites chez *Giardia* sont impliqués dans la biosynthèse des centres fer-soufre et leur incorporation dans des protéines fer-soufre fonctionnelles (figure 14) (Tovar et al., 2003). Les gènes codant plusieurs protéines impliqués dans les complexes fer-soufre ont été identifiés dans les génomes de plusieurs organismes amitochondriaux, incluant des microsporidies, *E. histolytica*, *C. parvum* (Katinka et al., 2001 ; Tachezy et al., 2001 ; Lagier et al., 2003). En effet, l'analyse du génome de la microsporidie d'*E. cuniculi* indique que plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans l'assemblage des centres Fe-S sont présents comme la protéine NiFu qui servirait de site intermédiaire pour les centres Fe/S transitoires, la frataxine (Yfh1) impliquée dans le transport et le stockage des atomes de fer dans les mitochondries, des transporteurs protéiques ATM1 et ERV1 impliqués dans l'export de protéines Fe-S.

Il a été suggéré que ces protéines fer-soufre représentent probablement la pression de sélection conduisant à la rétention de l'endosymbiose mitochondriale dans toutes les lignées eucaryotiques (Tovar et al., 2003 ; Van der Giezen et al., 2004, Embley et al., 2003).

### **II-3- Evolution des organites : adaptation aux conditions environnementales**

Il a été montré que les mitochondries présentaient une hétérogénéité morphologique. La représentation traditionnelle de la mitochondrie montre un organite délimité par une double membrane, la membrane interne présentant des crêtes bien définies (figure 8A). En réalité, la morphologie des mitochondries est dynamique et va dépendre du type cellulaire et de l'état physiologique de la cellule. C'est le cas de la mitochondrie de *Trypanosoma brucei* (Priest et Hajduk, 1994) dont la morphologie est variable au cours du cycle, et des cellules somatiques testiculaires humaines qui possèdent très peu de crêtes. C'est le cas aussi des mitochondries de levures qui sous des conditions anoxiques perdent rapidement leurs crêtes et prennent alors une morphologie de type hydrogénosomal, ce phénotype pouvant réverser en présence d'oxygène (Llyod, 1974).

La mitochondrie peut aussi présenter une hétérogénéité biochimique. En effet, sous des conditions anoxiques, la chaîne de transport d'électrons des mitochondries ne peut pas

**Table 1. Properties of various hydrogenosomes and mitochondrial-remnant organelles.**

Phylum	Order	Species	Organelle	HSP60	Hydrogenase	Pyruvate metabolism	Organelle genome	ADP /ATP carrier	Methanogenic endosymbiont	Comparable energy metabolism
Mastigophora	Trichomonadida	<i>Trichomonas</i> (parabasaliid)	Hydrogenosome	HSP60	[Fe]	PFO	No	HMP 31	No	Yes
	Diplomonadida	<i>Giardia</i> (diplomonad)	Cypton	Cytoplasm HSP60	[Fe] Cytoplasm	PFO	No	No mAAC	No	No
		<i>Spironucleus</i> (diplomonad)	None identified	Cytoplasm HSP60	[Fe]	PFO	No	ND	No	No
	Rhizomastigida	<i>Mastigamoeba</i> (delobont)	None identified	ND	[Fe]	PFO	No	ND	No	ND
Ciliophora	Amphoreia	<i>Nyctotherus</i> (clevelandellida)	Hydrogenosome	HSP60	[Fe] 24 kD + 51 kD	PDH	Yes	mAAC	Yes	Yes
		<i>Metopus</i> (armophorida)	Hydrogenosome	ND	[Fe]	ND	Yes	ND	Yes	Yes
	Vestibuliferida	<i>Dasytricha</i> (holotrich)	Hydrogenosome	ND	[Fe]	PFO	No	ND	No	Yes
	Plagiopylea	<i>Trimyxa</i> (plagiopylida)	Hydrogenosome	ND	Yes	PFL	ND	ND	Yes	Yes
		<i>Plagiopyla</i> (plagiopylida)	Hydrogenosome	ND	Yes	ND	ND	ND	Yes	ND
Sarodina	Amoebida	<i>Entamoeba</i> (lobosean)	Mitosome	HSP60	[Fe] Cytoplasm	PFO	No	No mAAC	No	No
Percolzoa	Vahlkampfiidae	<i>Psalteriomonas</i> (heterolobosean)	Hydrogenosome	ND	[Fe]	ND	No	ND	Yes	Yes
Apicomplexa	Eucoccidiorida	<i>Cryptosporidia</i> (coccidian)	Relict mitochondrion	Cpn60	NARF	PNOR	No	ND	No	No
	Stramenopiles	<i>Blastocystis</i> (stramenopile)	Modified mitochondrion	Cytoplasm HSP70	No	Unknown	Yes	ND	No	ND
Microspora	Pleistophorida	<i>Trachipleistophora</i> (microsporidian)	Relict mitochondrion	No HSP70	No	Rudiment PDH	No	No mAAC	No	No
Mastigomycotina	Spizellomycetales	<i>Piromyces</i> (chytrid)	Hydrogenosome	HSP60	[Fe]	PFL	No	ND	No	Yes
		<i>Neocallimastix</i> (chytrid)	Hydrogenosome	HSP60	[Fe]	PFL	No	mAAC	No	Yes

Abbreviations: Cpn, chaperonin; [Fe], iron only; HMP, hydrogenosomal membrane protein; HSP, heat shock protein; kDa, kilodalton; mAAC, mitochondrial ADP/ATP carriers; NARF, nuclear prelamina A recognition factor; ND, not determined; PDH, pyruvate dehydrogenase; PFL, pyruvate formate lyase; PFO, pyruvate ferredoxin oxidoreductase; PNOR, pyruvate NADH oxidoreductase.

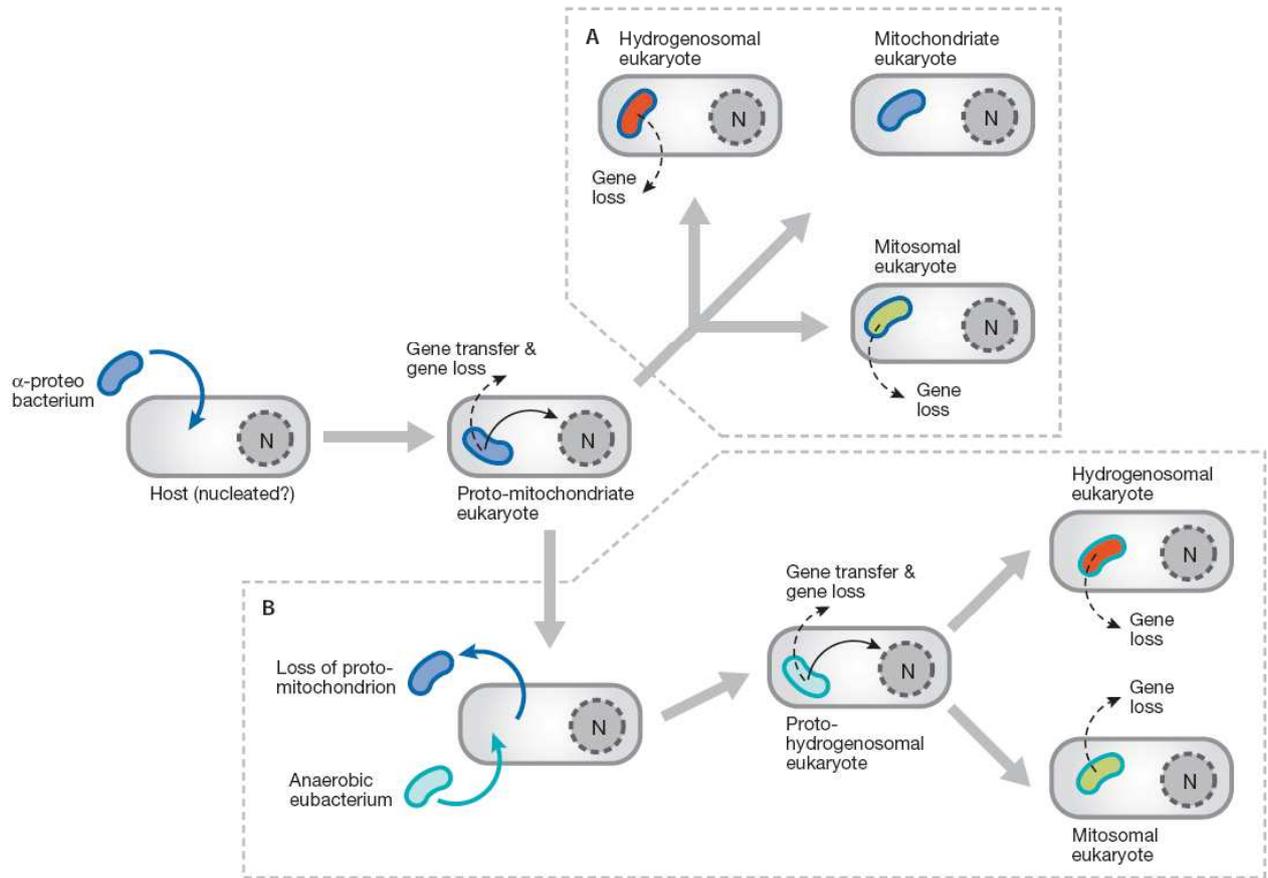
**Tableau 2- Propriétés des différents hydrogènesomes et des organites dérivés des mitochondries (D'après Yarlett et Hackstein, 2005).**

utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et la conversion d'énergie sous forme d'ATP ne peut donc pas être accomplie. Cependant, certaines mitochondries retrouvées chez plusieurs protistes, des champignons et des helminthes parasites comme *Fasciola hepatica*, semblent capables d'utiliser des accepteurs d'électrons alternatifs tels que le nitrate ou le fumarate, intermédiaires du cycle de Krebs. Ceci va permettre de faire fonctionner la chaîne de transport d'électrons de façon rudimentaire en absence complète d'oxygène (figure 17) (Tielens et al., 2002).

Cependant chez d'autres eucaryotes, tels que les protozoaires *T. vaginalis*, *E. histolytica* et *C. parvum*, l'adaptation aux conditions anoxiques a réduit les mitochondries à des compartiments cellulaires qui ont perdu la chaîne de transport des électrons (hydrogénosomes) et, pour certains, la capacité de produire de l'énergie (mitosomes). Néanmoins, certaines fonctions mitochondriales, comme la production d'acétyl coenzymeA, sont maintenues même en absence de la chaîne de transport des électrons. En effet, nous avons vu principalement que les hydrogénosomes et les mitosomes sont retrouvés chez des phyla différents, et malgré des propriétés variées sur le plan structural ainsi que sur le plan physiologique et biochimique (tableau 2), ils ont tous en commun une origine mitochondriale. C'est le cas de *Blastocystis hominis*, parasite intestinal humain, appartenant aux straménopiles, dont des MLOs (Mitochondria Like Organism) ont été décrits comme étant des mitochondries modifiées.

Les données actuelles sur les hydrogénosomes sont beaucoup plus importantes que sur les mitosomes. Ces informations permettent de proposer plusieurs scénarios sur une évolution cohérente sur l'origine de ces différents organites. Tous les eucaryotes dérivent d'un ancêtre commun qui devait posséder une proto-mitochondrie (figure 18) (Martin et Müller, 1998 ; Martin et al., 2005). La première hypothèse propose donc que les mitochondries, les hydrogénosomes et les mitosomes descendent directement de l'endosymbiose mitochondriale (Embley et al., 2003 ; Martin et Muller, 1998 ; Tielens et al., 2002 ; Van der Giezen et al., 2004). La deuxième hypothèse propose deux évènements endosymbiotiques : une endosymbiose mitochondriale originelle suivie par une autre qui va s'accompagner de la perte de la première endosymbiose (Dyall et al., 2004a).

La première hypothèse (A) est la plus plausible pour un grand nombre d'études. Ainsi, l'évolution directe à partir de l'endosymbiose mitochondriale peut expliquer la



**Figure 18- Evolution des mitochondries et des organites dérivés des mitochondries.** (A) origine verticale à partir de l'endosymbiose mitochondriale originelle. (B) origines chimériques des mitosomes et des hydrogénomosomes à partir d'endosymbioses séquentielles (d'après Van der Giezen et Tovar, 2005).

présence de la double membrane autour des hydrogénosomes, des mitosomes et des mitochondries mais aussi les mécanismes conservés fonctionnels de l'import des protéines dans ces organites.

La seconde hypothèse (**B**) beaucoup moins évidente, permet d'expliquer l'origine des enzymes anaérobies telles que l'hydrogénase et la pyruvate : ferrédoxine oxydo-réductase dans les hydrogénosomes. Mais, elle ne permet pas de comprendre pourquoi ces organites ont des origines indépendantes multiples dans des lignées eucaryotiques sans rapport entre elles.

Ainsi, ces organites présentant une grande hétérogénéité à la fois sur le plan morphologique, génétique et biochimique, montrent que les organismes vivants ont su s'adapter aux conditions environnementales (Van der Giezen et Tovar, 2005).



***Eucalyptus globulus***  
**(eucalyptus)**



***Laurus nobilis***  
**(laurier)**



***Melaleuca viridiflora***  
**(Niaouli)**

**Figure 19- Exemples de plantes aromatiques utilisées pour l'extraction d'huiles essentielles.**

### **III - UTILISATION DES HUILES ESSENTIELLES DANS LE CONTROLE DE L'HISTOMONOSE**

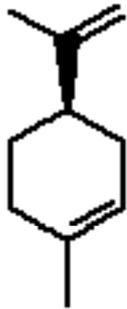
Comme nous en avons précédemment discuté, l'absence de molécules permettant de combattre l'histomonose, est à l'heure actuelle très préoccupante en France et dans les autres pays européens. En effet, le nombre d'élevages infestés est en nette augmentation depuis l'interdiction du nifursol. La prophylaxie sanitaire a donc des limites et il est maintenant nécessaire de rechercher de nouvelles molécules actives pour lutter contre cette parasitose. Les molécules issues des plantes pourraient constituer des alternatives prophylactiques et thérapeutiques très intéressantes dans la lutte contre cette maladie.

#### **III-1- Phytothérapie et aromathérapie : définitions et différences**

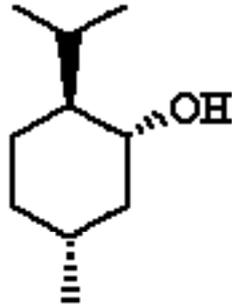
La phytothérapie et l'aromathérapie sont des médecines allopathiques, c'est-à-dire des traitements médicamenteux qui s'appuient sur la notion de « molécule active » et qui vont détruire les causes du mal ou supprimer l'expression de la maladie. Elles sont différentes des médecines alternatives (homéopathie) qui sont des méthodes thérapeutiques basées sur le « principe de similitude ». Selon ce principe, la détermination des symptômes provoqués chez le sujet sain par une substance quelconque (d'origine végétale, minérale ou animale) permettrait de soigner un sujet malade qui présente un ensemble de symptômes semblables.

La phytothérapie désigne l'utilisation à des fins thérapeutiques de plantes médicinales (Belaiche, 1979). Le « remède » renferme la totalité de la plante, ou au moins une extraction majoritaire des principes actifs, soit plus d'une centaine de molécules.

Les huiles essentielles, obtenues par distillation des plantes aromatiques (figure 19) sont exclues de cette définition. Elles constituent donc une pratique particulière que l'on nomme aromathérapie (Grosmond, 2001a).



limonene



menthol



camphor

**Figure 20- Exemples de terpènes.** Le limonène est extrait à partir du zeste d'orange, le menthol à partir de la menthe poivrée et le camphor à partir de l'arbre à camphre.

## **III-2- Les huiles essentielles**

### **III-2-1- Définition**

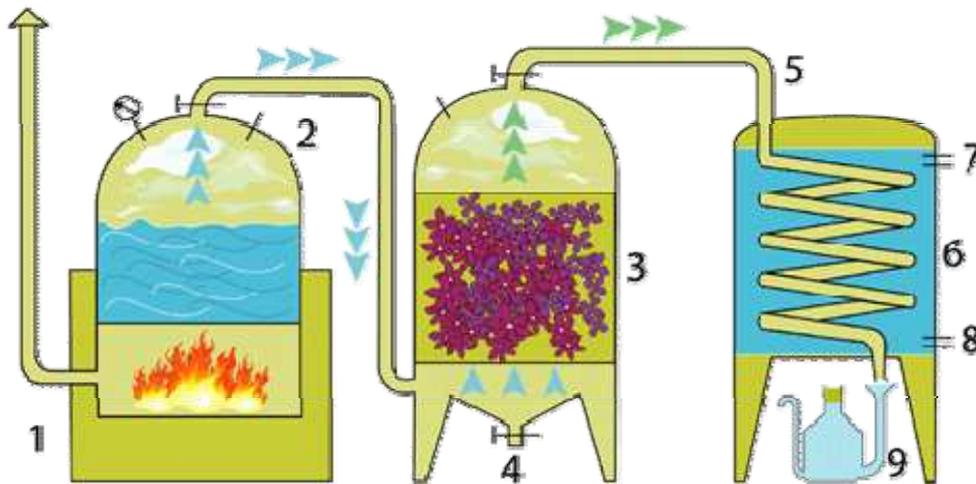
Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement complexe, qui renferment des principes volatiles contenus dans les végétaux et qui sont plus au moins modifiés au cours de la préparation (Grosmond, 2001b). Ces différents extraits ne sont pas forcément d'aspect huileux. Ce sont des mélanges de molécules variées, comprenant en particulier des terpènes (figure 20) (hydrates de carbone non aromatiques) et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones).

### **III-2-2- Localisation dans la plante et composition chimique**

Les huiles essentielles sont pratiquement toutes produites par des végétaux supérieurs. Certaines plantes possèdent des cellules sécrétrices isolées mais les essences sont principalement produites par trois catégories d'appareils sécréteurs : les poils glandulaires épidermiques, les poches et les canaux glandulaires schizogènes (Franchomme et Pénéol, 1990). Tous les organes végétaux peuvent stocker des huiles essentielles (les fleurs, les feuilles, les enveloppes des fruits (mandarine), les écorces (cannelle) et même les racines de certaines plantes). Cependant, le rôle de ces huiles dans la plante n'est pas très bien déterminé. Elles pourraient intervenir dans les interactions végétales, pour d'autres ce ne sont que des déchets du métabolisme.

Certaines huiles essentielles sont dites monomoléculaires car elles ne sont composées presque exclusivement que d'une seule molécule. Mais la grande majorité sont qualifiées de polymoléculaires car elles sont constituées de 3 ou 4 molécules majoritaires, d'un certain nombre de minoritaires et jusqu'à plusieurs centaines de constituants à l'état de traces (Franchomme et Pénéol, 1990).

Ces constituants appartiennent en quasi-totalité à deux groupes d'origine distincte : les terpénoïdes et les composés aromatiques. A ces substances s'ajoutent des composés issus de la transformation de molécules non volatiles (acides gras, terpènes) (Bruneton, 1999).



**Figure 21- Distillation des plantes à la vapeur d'eau.** Les parties de la plante à distiller sont placées dans une cuve traversée par de la vapeur d'eau. L'huile essentielle du végétal est emportée avec la vapeur d'eau et forme un liquide que l'on fait ensuite refroidir. L'huile essentielle étant de densité plus faible que l'eau, elle forme un film à la surface. Il est alors possible de la récupérer en la séparant de ce que l'on appelle l'hydrolat. (1) foyer, (2) chaudière, (3) vase à fleurs, (4) vidange de condensation, (5) col de cygne, (6) réfrigérant avec serpentín, (7) sortie d'eau chaude, (8) arrivée d'eau froide, (9) essencier où sont décantés hydrolat et huile essentielle.

Dans le groupe des terpénoïdes, de nombreuses fonctions chimiques sont retrouvées : carbures, alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers, phénols. Les composés aromatiques sont des dérivés du phénylpropane et sont présents en quantité beaucoup plus réduite que les terpénoïdes. Ce sont eux qui confèrent aux essences leurs caractères organoleptiques (Anton, 1979). Tous ces composés sont beaucoup plus concentrés dans les huiles essentielles que dans les plantes. Les huiles essentielles ont donc une activité pharmacologique, en général beaucoup plus importante que les plantes, mais peuvent aussi s'avérer toxiques (Duquenois, 1982).

### **III-2-3- Extraction des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont extraites des plantes par deux procédés différents :

- L'expression qui permet d'obtenir des essences d'agrumes en pressant à froid les zestes des plantes concernées. L'expression ou la pression à froid est réservée aux écorces des agrumes : le citron (*Citrus Limonum*), la mandarine (*Citrus reticulata*), l'orange douce (*Citrus Sinensis*), l'orange amère (*Citrus Aurantium*), le pamplemousse (*Citrus Paradisii*)... On emploie alors l'appellation essence.

- La distillation (figure 21) qui peut être réalisée dans un alambic classique. Les plantes sont immergées dans de l'eau et le mélange est porté à ébullition. On obtient dans les deux cas l'eau florale sur laquelle flotte un liquide constitué de molécules volatiles d'aspect huileux : l'huile essentielle (Zayat, 1999). Le rendement de ce procédé est très variable selon les plantes. Il faut par exemple quatre tonnes de pétales de rose pour obtenir 1 kilo de cette huile essentielle, une des plus chères.

### **III-3- Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles**

#### **III-3-1- Mode d'action des huiles essentielles**

Certaines molécules aromatiques sont très proches structuralement de composés endogènes et peuvent donc s'y substituer (Franchomme et Penoël, 1990). Par exemple, de par



sa structure, le sclaréol retrouvé dans l'huile essentielle de *Salvia sclarea* (la sauge sclérée) présente une activité oestrogénique. De même, de nombreuses molécules vont avoir une activité de neurotransmetteurs : un analogue d'un précurseur amphétaminique serait présent dans l'huile essentielle de noix de muscade. Enfin, certains composants peuvent stimuler une fonction physiologique : l'eucalyptol par exemple augmente la production des glandes sécrétrices de mucine (Franchomme et Penoël, 1990).

### **III-3-2- Champs d'action des huiles essentielles**

Les propriétés anti-infectieuses des huiles essentielles sont connues depuis la plus haute antiquité. Toutefois, ce n'est qu'en 1881 que les premières recherches furent entreprises, avec les travaux de Koch décrivant l'action bactéricide de l'essence de térébenthine sur les spores de *Bacillus anthracis*. Depuis, l'augmentation perpétuelle du nombre d'indications des huiles essentielles sans preuve réelle d'efficacité n'est pas sérieuse. Nous nous limiterons donc à quelques indications thérapeutiques strictes.

Les huiles essentielles sont connues pour avoir un pouvoir antiseptique puissant. Certaines d'entre elles, comme celles provenant de la sarriette *Satureia montana* ou du thym *Thymus vulgaris*, présentent une activité antibactérienne marquée à faible dose. Elles sont actives contre les champignons et les parasites et certaines ont parfois une activité antivirale (Franchomme et Penoël, 1990). Cependant ces propriétés sont remises en question car elles correspondent à des travaux très anciens.

De plus, il a été montré que les essences de basilic, de camomille, de cannelle présentaient des propriétés spasmolytiques et sédatives. Certaines huiles essentielles ont aussi une forte affinité pour le système nerveux autonome. Ainsi, l'essence de marjolaine est indiquée en cas d'hypertension du fait de ses propriétés sympatholytiques (Anton, 1979). Enfin certaines huiles essentielles peuvent avoir des propriétés irritantes (essence de térébenthine), expectorantes (essences d'eucalyptus et de pin) et diurétiques (essence de genièvre) (Anton, 1979).



### III-3-3- Toxicité

La dose létale 50 (DL50) étant généralement supérieure à 5g/kg, la toxicité aigüe des huiles essentielles par voie orale est le plus souvent faible. La toxicité chronique est mal connue (Bruneton, 1999). Les accidents de toxicité sont généralement dus aux surdosages, aux ingestions accidentelles, aux applications excessives ou à la qualité des huiles. Les effets indésirables sont souvent liés aux diverses propriétés des huiles essentielles.

### III-4- Activité *in vitro* sur *Histomonas meleagridis*

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de certaines huiles essentielles contre des parasites flagellés. C'est le cas pour l'essence de berbérine qui, à la concentration de 1mg/mL, est capable d'inhiber la croissance *in vitro* des protozoaires *Gardia lamblia* et *Entamoeba histolytica* (Kaneda et al., 1990).

De même la croissance de *Trichomonas vaginalis* est inhibée en présence d'isoeugénol (60µg/mL) et de thymol (25µg/ml) qui sont des composés purs issus d'huiles essentielles (Zemek et al., 1987).

Plusieurs études ont également été réalisées sur *H. meleagridis*. Les huiles essentielles obtenues à partir de feuilles de cannelle de Chine (0,5µl/mL), du péricarde de fruits de citronnier (1µl/mL) et de bulbes d'ail ((1µl/mL) ont une action « létale » sur *H. meleagridis* (Zenner et al., 2003). Récemment, une nouvelle étude a été réalisée sur différents isolats d'*H. meleagridis*, de *Tetratrichomonas gallinarum* et de *Blastocystis*. Différents composants naturels ont été testés (le carvacrol, l'huile de *Cassia*, une saponine *Quillaja saponaria*) et des différences de létalité ont été observées sur les différents isolats d'*H. meleagridis* (Grabensteiner et al., 2007).



---

# RESULTATS

---



S'inscrivant dans le cadre d'une convention CIFRE, mon travail de thèse a été divisé en deux grandes parties : (i) un projet de recherche fondamentale qui avait pour objectif d'optimiser les conditions de culture *in vitro* du parasite *H. meleagridis* et de mettre en évidence des protéines pouvant jouer un rôle dans l'adhésion, et (ii) une partie appliquée qui a consisté à contrôler des élevages de dindes et à évaluer l'activité anti-parasitaire de produits naturels sur la culture *in vitro* d'*H. meleagridis*.

Malgré l'importance économique du parasite flagellé *H. meleagridis*, très peu de données concernent sa biologie et sa physiologie. Quelques descriptions du parasite ont été réalisées en microscopie photonique et en microscopie électronique à transmission (Schuster, 1968). En ce qui concerne les données moléculaires, seule la séquence ARNr de la petite sous-unité ribosomale est actuellement connue (Gerbod et al., 2001). Mon travail s'est tout d'abord orienté sur la culture *in vitro* du parasite et sur des essais de mise en place de cultures axénique et monoxénique, ceci s'accompagnant d'études préliminaires visant à identifier les bactéries présentes dans la culture.

Mon étude a ensuite porté sur l'identification de gènes codant des enzymes du métabolisme énergétique qui pourraient être impliquées dans l'adhésion du parasite à la cellule-hôte. Les gènes codant trois enzymes hydrogénosomales ont ainsi été identifiés: la sous-unité  $\alpha$  de la succinyl coenzyme A synthétase ( $\alpha$ -SCS), une enzyme malique et une hydrogénase à fer. Enfin, dans le but de réaliser une étude fonctionnelle de ces protéines, nous avons initié des premiers essais de génétique fonctionnelle par la technique d'ARN interférence par « feeding ».

La partie appliquée de mon travail, réalisée pour l'entreprise AGORAGER 2, a porté tout d'abord sur le suivi d'élevages de dindes pour surveiller l'apparition éventuelle d'histomonose. Les dernières molécules actives contre *H. meleagridis* ayant été retirées du marché, l'entreprise m'a également confié la réalisation de tests anti-parasitaires pour déterminer l'activité de différentes formulations à base d'huiles essentielles.



# Chapitre I

**CULTURE *IN VITRO* ET CYTOLOGIE DU PARASITE *HISTOMONAS*  
*MELEAGRIDIS***



## **I- CULTURE *IN VITRO* ET CYTOLOGIE DU PARASITE *HISTOMONAS MELEAGRIDIS***

### **I-1- Culture d'*H. meleagridis***

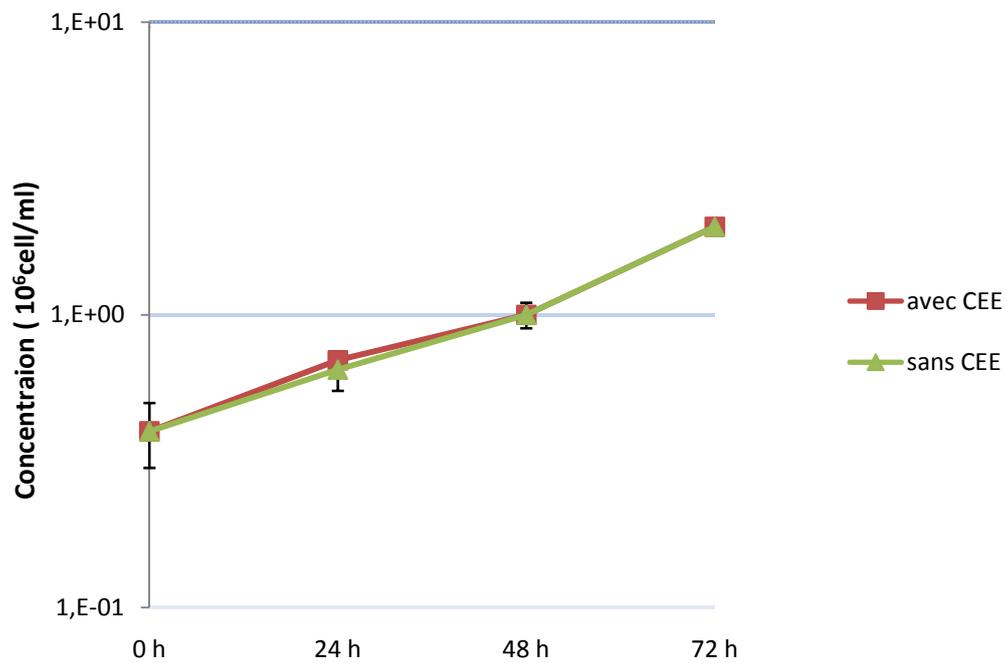
La souche d'*Histomonas meleagridis* (souche HmZL) actuellement cultivée au laboratoire, a été isolée à partir de caeca de dindes qui ont été infestées expérimentalement en utilisant comme vecteur les œufs du ver *Heterakis gallinarum*, lui-même parasite du tractus digestif des gallinacés. Cette souche nous a été fournie par le docteur Lionel Zenner de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. La culture est qualifiée d'agnotobiotique car il y a présence d'une flore bactérienne non déterminée provenant du caecum des dindes lors de la récupération des parasites.

### **Matériels et méthodes**

La culture d'*H. meleagridis* s'effectue traditionnellement à 39°C dans un milieu de culture qui a été mis en place par Stepkowski en 1895 et amélioré en 1970 par Dwyer. Ce milieu est le milieu 199 (GIBCO), additionné de 5 à 10% d'extrait embryonnaire de poulet (US Biological), 5% de sérum de cheval (GIBCO) et 5% d'amidon de riz. Le repiquage d'*H. meleagridis* s'effectue toutes les 72 heures par ajout de  $5.10^4$  cellules dans 3 mL de milieu frais.

### **Résultats**

Mon travail a consisté à optimiser les conditions de culture *in vitro* d'*H. meleagridis*. Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé des essais en modifiant les concentrations des différents composants du milieu. Nous avons ainsi observé une croissance parasitaire identique en absence ou en présence d'extrait embryonnaire de poulet (figure 1). Sur le graphique tracé selon une échelle logarithmique, la croissance est linéaire ce qui indique que



**Figure 1- Croissance d'*H. meleagridis*, selon une échelle logarithmique, en présence ou en absence d'extrait embryonnaire de poulet (CEE pour « chick embryo extract »).**

les parasites sont en phase de croissance exponentielle. Le temps de doublement moyen est de 24 h. Nous avons donc choisi d'éliminer l'extrait embryonnaire de poulet du milieu de culture pour la suite de nos expériences. Au contraire, l'amidon de riz s'est avéré essentiel pour la croissance du parasite. En effet, son élimination du milieu de culture et des essais de substitution par des composés proches tels que la dextrine inhibent la croissance des parasites.

Des tests de culture en jarre anaérobie montrent aussi que la croissance du parasite semble être inhibée en anaérobiose totale suggérant alors que le parasite et/ou les bactéries ont besoin d'une certaine quantité d'oxygène pour pouvoir se développer. Après ces essais d'optimisation, nous avons fait le choix de cultiver *H. meleagridis* dans 3 mL de milieu 199 supplémenté avec 5% de sérum de cheval et 5% d'amidon de riz, dans des tubes fermés de contenance 5 mL, à 39°C.

## **I-2- Description d'*H. meleagridis* en microscopies photonique et électronique à transmission**

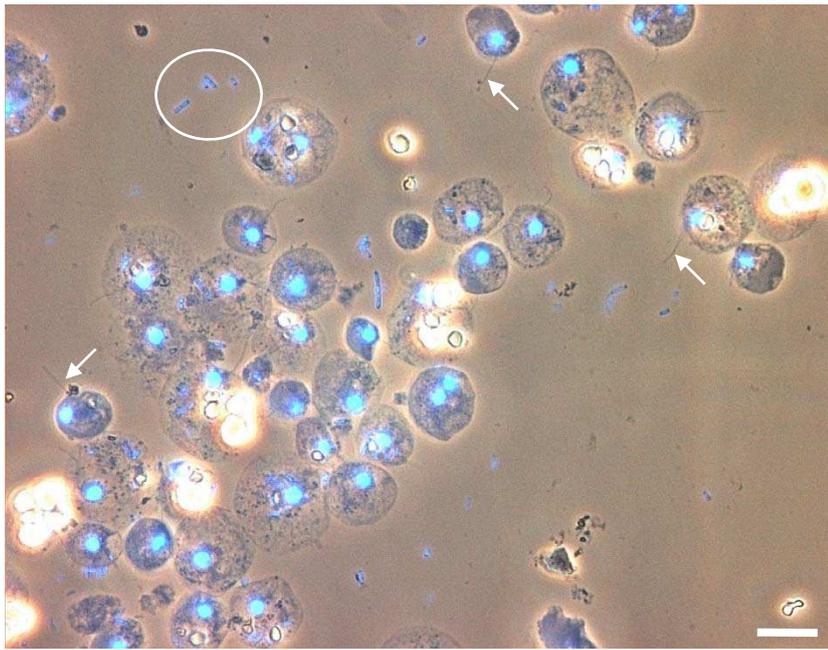
### **Matériels et méthodes**

#### **Production d'anticorps anti-*H. meleagridis***

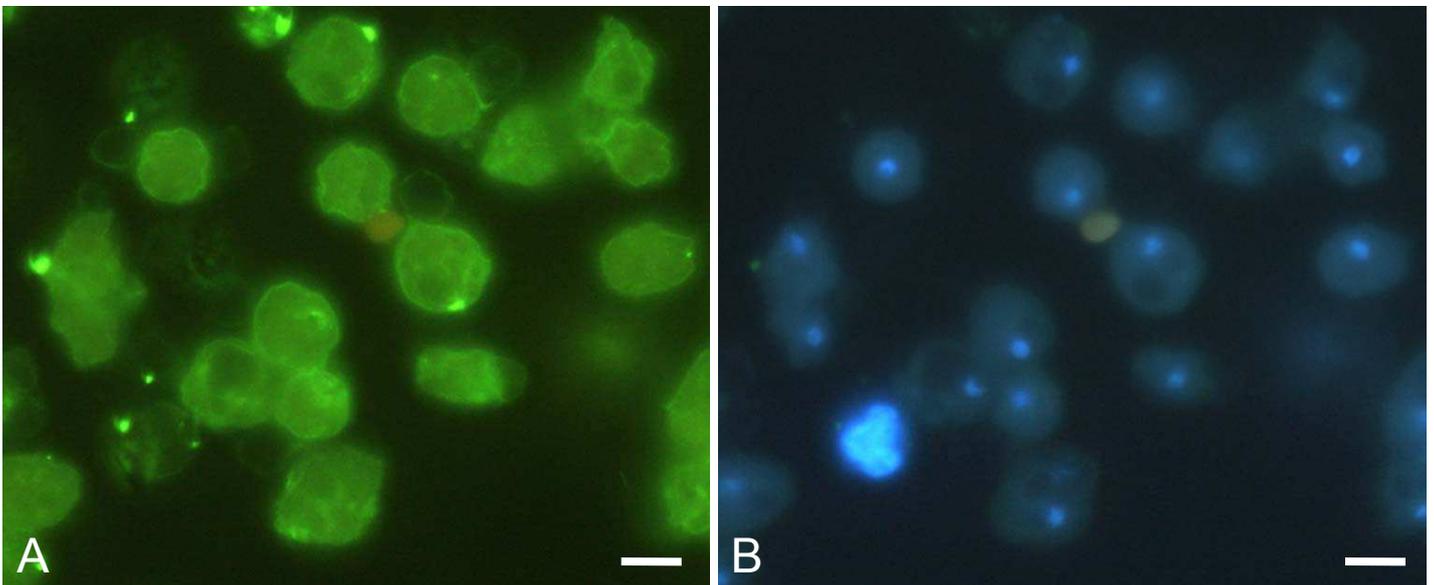
Un extrait parasitaire a été préparé à partir de  $4.10^7$  parasites. Après sonication des parasites dans un tampon PBS, l'extrait est homogénéisé avec de l'adjuvant de Freund complet (Sigma) et un quart de l'échantillon est injecté dans la cavité intra-péritonéale de souris CD1. De l'adjuvant de Freund incomplet est ensuite utilisé pour les injections réalisées 14, 21 et 30 jours après la première injection. Le sang de l'animal est prélevé une semaine après la dernière immunisation pour évaluer la réponse immunitaire.

#### **Immunofluorescence indirecte**

Les parasites sont fixés avec 4% de formaldéhyde et 0,25% de glutaraldéhyde pendant une heure à température ambiante et lavés dans du PBS. Des frottis sont réalisés sur des lames de verre traitées à la polylysine puis incubés pendant 20 min au PBS-NH<sub>4</sub>Cl 50 mM permettant d'éliminer l'autofluorescence des aldéhydes. Après une étape de saturation en PBS-lait écrémé 5% pendant une heure, le matériel biologique est incubé avec les anticorps



**Figure 2- Observation des parasites en culture en contraste de phase après un marquage des noyaux au DAPI.** Nous cultivons la forme flagellée du parasite (flèches). Il y a présence de bactéries dans la culture (cercle blanc). Echelle : 10  $\mu$ m.



**Figure 3- Réactivité du sérum « extrait total » testé au 1/100<sup>e</sup> en immunofluorescence sur des parasites fixés (anticorps secondaire Alexa 488 au 1/1000<sup>e</sup>) (A), et coloration DAPI (B).** Echelle: 10  $\mu$ m.

primaires dilués en PBS-Triton X-100 0,1% (1/100<sup>e</sup>) pendant une heure. Plusieurs lavages en PBS-Triton X-100 0,1% sont réalisés avant d'incuber les cellules une heure avec les anticorps secondaires (anti-IgG de souris) conjugués au fluorochrome Alexa 488 (dilué au 1/1000<sup>e</sup>, Molecular Probes). Après coloration des noyaux au DAPI, les préparations sont observées au microscope à épifluorescence LEICA DMR.

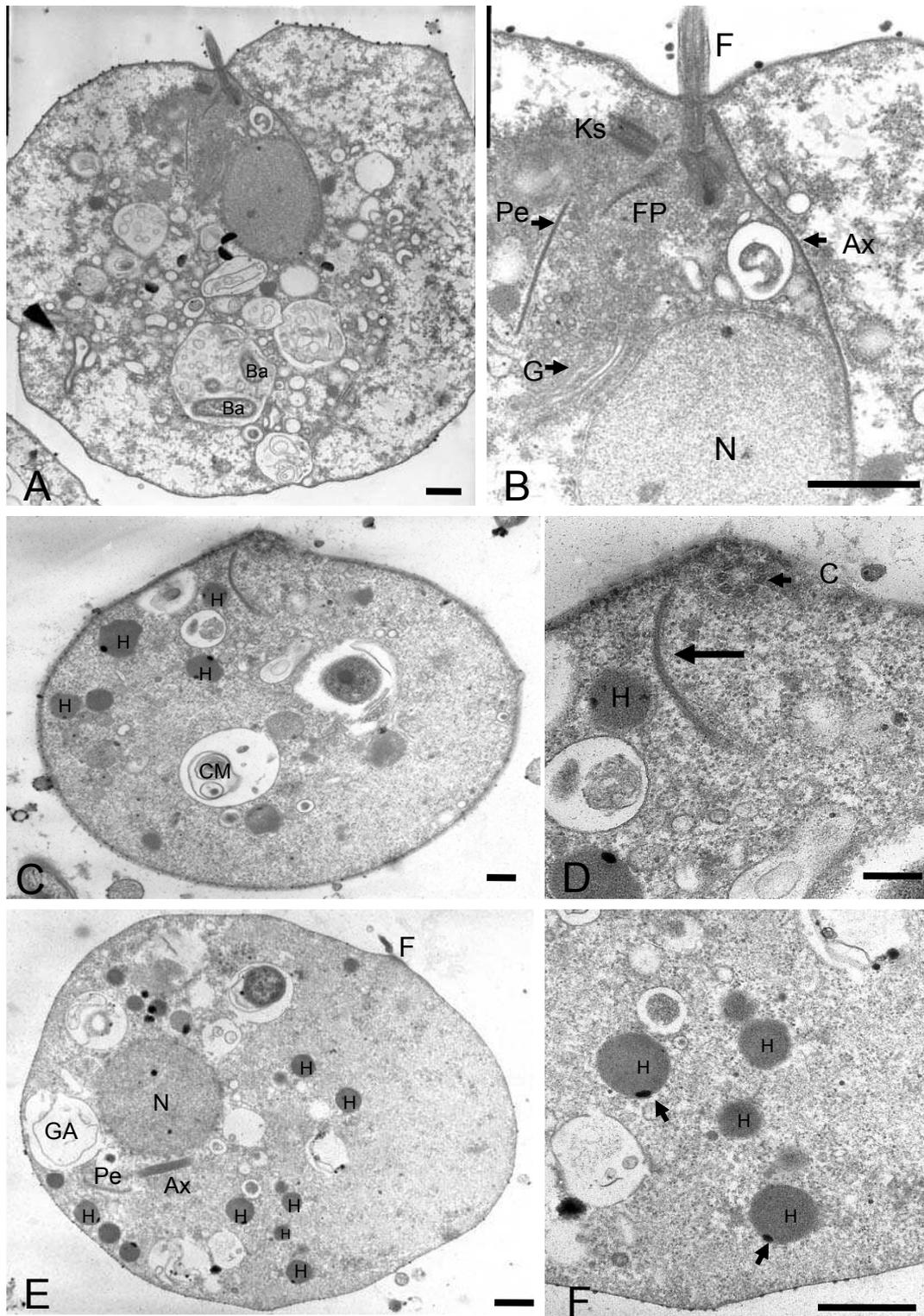
### **Microscopie électronique à transmission**

Les parasites sont lavés une fois en PBS, puis sont centrifugés à 240 g pendant 2 minutes. Le culot est fixé pendant 30 min en présence de 2% de glutaraldéhyde et 0,05% de rouge de ruthénium dans un tampon cacodylate (0,1M, pH 7,4) puis post-fixé pendant 1h avec de l'OsO<sub>4</sub> 1% dans le même tampon. Après plusieurs bains de déshydrations en augmentant progressivement la concentration en éthanol (30% à 100%) et une infiltration en oxyde de propylène, l'échantillon est inclus en résine Epikote (Agar Scientific). Des coupes ultra-fines de 90 nm sont obtenues avec un ultramicrotome UltracutS Leica puis contrastées à l'acétate d'uranyle aqueux et au citrate de plomb. Après séchage, les coupes sont observées au microscope électronique à transmission Jeol 1200X.

## **Résultats**

### **Observation en microscopie photonique**

Les parasites en culture *in vitro* se présentent sous une forme ovoïde avec une taille variant de 10 à 20 µm. En contraste de phase, nous observons la présence d'un flagelle assez court. La coloration au DAPI confirme la présence de nombreuses bactéries dans la culture (figure 2). Des frottis de parasites ont ensuite été incubés avec les anticorps obtenus contre l'extrait total parasitaire. Nous observons un marquage très intense de la surface des parasites (figure 3). Ces anticorps dirigés contre *H. meleagridis* pourraient être utiles en diagnostic pour repérer spécifiquement les parasites dans différents échantillons biologiques.



**Figure 4- Observations d'*H. meleagridis* en MET après culture *in vitro*.** Coupes longitudinales du parasite (A, B) permettant d'observer la présence de bactéries dans les vacuoles et des éléments du cytosquelette du parasite. Les coupes transversales (C, D) permettent d'observer le cinétosome. La flèche sur la figure D indique le complexe pelta-axostylaire. Les organites apparentés aux hydrogénosomes sont indiqués sur les coupes C et F. Les flèches sur la figure F indiquent la vésicule à la périphérie des hydrogénosomes. Ba, bactérie; F, Flagelle; C, cinétosome; Ax, Axostyle; Pe, Pelta; N, Noyau; G, Golgi; GA, grain d'Amidon; H, Hydrogénosome; CM, Corps multilamellaires; FP, Fibre parabasale. Echelle: 1µm.

### **Observation en microscopie électronique à transmission (MET)**

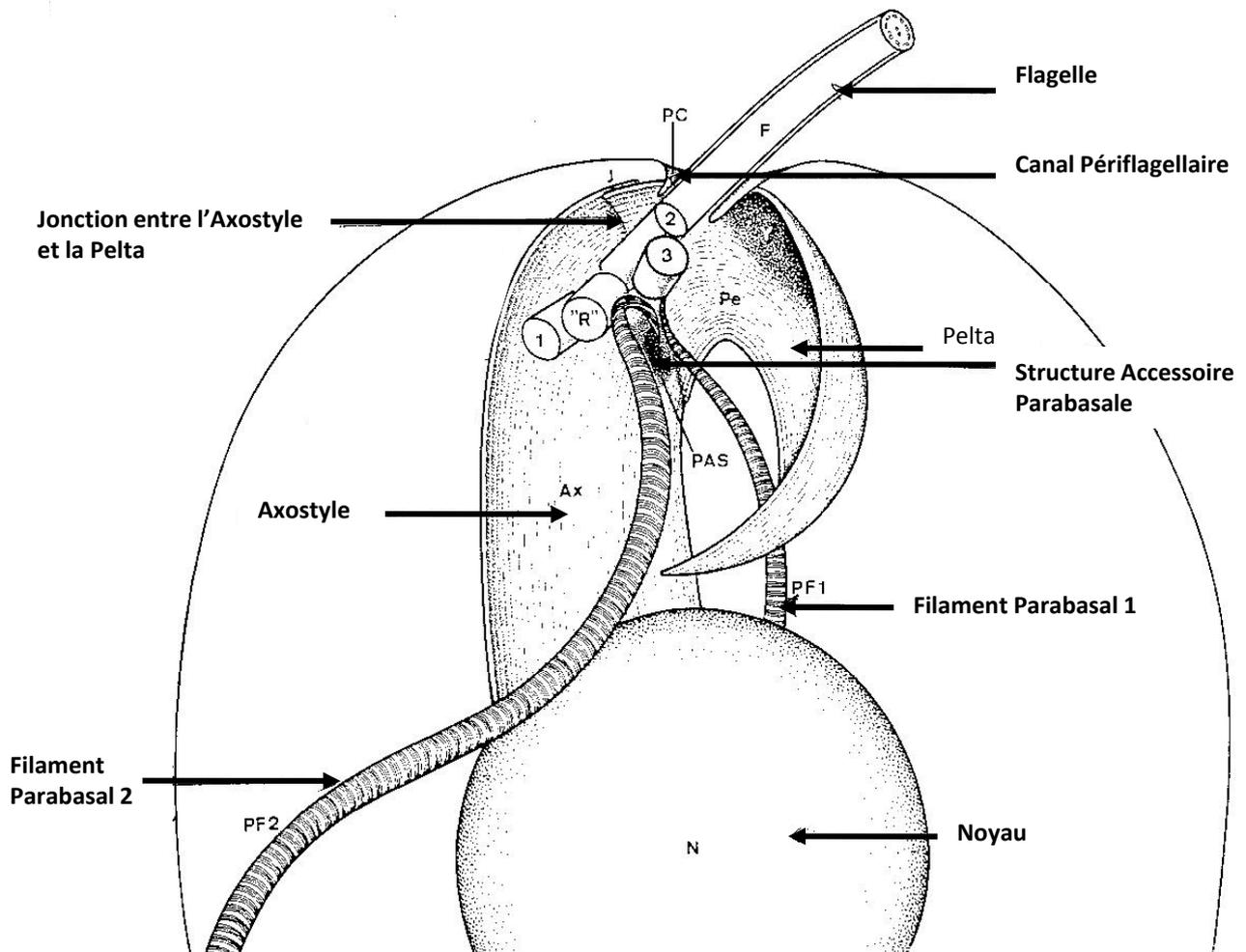
Les études concernant la description morphologique d'*H. meleagridis* sont très anciennes. La première, réalisée en 1968 par Schuster, décrit l'ultrastructure du parasite dans son hôte, le ver intestinal, *Heterakis gallinarum*. La deuxième étude, réalisée en 1972 par Rybicka, porte sur la description du cytosquelette sur une souche provenant d'un caecum de dinde. Ce travail avait permis l'affiliation d'*H. meleagridis* à la famille des trichomonadines.

Au cours de mon travail, j'ai pu réaliser des observations ultrastructurales de ce flagellé à partir de nos cultures *in vitro*.

Le parasite a une forme sphérique et présente un seul flagelle au pôle antérieur de la cellule. Le cytoplasme contient un noyau de forme ovoïde à sphérique de 1,5 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre. De nombreuses vacuoles de taille variable sont également présentes dans le cytoplasme (fig 4A). Certaines de ces vacuoles sont vides, d'autres sont des vacuoles digestives contenant des bactéries (fig 4A) ou des grains d'amidon (fig 4E). La dégradation des bactéries à l'intérieur de ces vacuoles digestives apparaît sous forme de corps multilamellaires d'environ 0,5 $\mu\text{m}$  de diamètre (fig 4C). L'ingestion des bactéries qui se réalise par phagocytose sera décrite plus précisément dans le chapitre II.

Certains éléments du cytosquelette des trichomonadines appartenant au système mastigonte (unité flagellaire) sont observés sur les différentes coupes (figure 5). La coupe longitudinale présentée sur la figure 4B montre le complexe pelta-axostyloïde, formé d'un réseau de microtubules, caractéristique des trichomonadines. Nous observons l'appareil parabasal qui est composé de l'appareil de Golgi et des fibres parabasales. Les saccules golgiens ainsi que les vésicules du réticulum endoplasmique sont bien distinctes le long du noyau (fig 4B). Les coupes transversales des figures 4C et 4D montrent que le cinétosome est composé des neuf unités microtubulaires associées au complexe pelta-axostyloïde. Sur la coupe longitudinale 4E, nous pouvons distinguer correctement l'axostyle de la pelta. Ils sont tous les deux composés de filaments de microtubules, cependant la pelta présente une forme légèrement plus arquée.

Les seuls organites facilement observables correspondent à des granules denses aux électrons, de forme sphérique et sont présents en très grand nombre dans la cellule (10 à 20 par cellule) (fig 4C et 4E). Ces organites avaient été précédemment décrits par Schuster en 1968 mais n'avaient pas été caractérisés à cette époque. Ils sont désormais considérés comme



**Figure 5- Représentation schématique du système mastigonte d'*H. meleagridis*.** *H. meleagridis* a en commun avec l'ordre des trichomonadines le complexe pelta-axostylaire microfibrillaire ainsi que l'appareil parabasal, constitué du corps parabasal (appareil de Golgi) et des fibres parabasales. Il a également 4 cinétosomes (1, 2, 3 et R), le nombre fondamental des trichomonadines (d'après Rybicka et al., 1972).

des organites apparentés aux hydrogénosomes. Au niveau de certains de ces organites, il y a présence d'une vésicule aplatie très dense aux électrons (fig 4F). Cette vésicule, observée chez les hydrogénosomes de *Trichomonas vaginalis* et de *Tritrichomonas fœtus*, jouerait un rôle dans l'accumulation de calcium dans la cellule.

Nos observations ultrastructurales ont permis de montrer qu' *H. meleagridis* est capable d'ingérer les bactéries présentes dans le milieu de culture. De plus, l'observation de l'appareil cytosquelettique confirme les descriptions de Rybicka en 1972. Nous nous attacherons à étudier plus précisément les organites apparentés aux hydrogénosomes dans le deuxième chapitre.

### **I-3- Essais de mise en place d'une culture axénique**

Afin d'éliminer la flore bactérienne présente dans la culture et de déterminer ainsi si elle joue un rôle dans la croissance d'*H. meleagridis*, nous avons rajouté différents types d'antibiotiques dans le milieu de culture. Dans le but de remplacer les bactéries éliminées par les antibiotiques, nous avons fait des essais de supplémentation du milieu de culture avec un lyophilisat bactérien. Des essais de culture du parasite en milieu solide ont également été réalisés.

### **Matériels et méthodes**

#### **Utilisation d'antibiotiques**

Les antibiotiques que nous avons utilisés sont : l'ampicilline (100 µg/mL), le chloramphénicol (0,34 mg/mL), la gentamicine (25 µg/mL) ou un mélange pénicilline (100 U/mL) / streptomycine (100 µg/mL). Un premier protocole a consisté à rajouter le ou les antibiotique(s) dans la culture lors de chaque repiquage. Le deuxième protocole a consisté, dans un premier temps, à séparer la majorité des bactéries des parasites par centrifugation à 240 g pendant 2 minutes. Les parasites, se retrouvant dans le culot, sont repris dans 3 mL de milieu frais auquel est rajoutée la solution d'antibiotiques à la concentration recommandée.

Traitements Antibiotiques pendant 72h d'une culture d' <i>H. meleagridis</i>	Effet sur les bactéries	Effet sur les parasites
pénicilline (100 U/mL)/ streptomycine (100 µg/mL)	aucun	aucun
ampicilline (100 µg/mL)	aucun	aucun
chloramphénicol (0,34 mg/mL)	aucun	aucun
pénicilline (100 U/mL)/ streptomycine (100 µg/mL) , ampicilline (100 µg/mL)	aucun	aucun
chloramphénicol (0,34 mg/mL) , ampicilline (100 µg/mL)	aucun	aucun
gentamicine (25 µg/mL)	absence de bactéries	inhibition de la croissance

**Tableau 1- Traitements antibiotiques réalisés pendant 72h sur des cultures d'*H. meleagridis*.** Seule la gentamicine a un effet sur les bactéries. En absence de bactéries, la croissance des parasites semble être inhibée.

### **Essais de supplémentation avec un lyophilisat bactérien**

Les parasites sont séparés des bactéries par centrifugation différentielle à 240 g pendant 2 minutes. Le surnageant, contenant les bactéries, est centrifugé à 4000 g. Le culot bactérien est repris dans 1 mL de PBS. Les bactéries sont lysées par sonication et sont ensuite lyophilisées. Nous ajoutons ce lyophilisat bactérien simultanément avec la gentamicine (25 µg/mL) dans 3 mL d'une culture de parasites.

### **Isolement d'*H. meleagridis* sur milieu solide**

Le protocole consiste à mélanger volume à volume du milieu de culture d'*H. meleagridis* (avec ou sans amidon de riz) avec de l'agar à 0,72%. Un inoculum d' *H. meleagridis* ( $5 \cdot 10^5$  cellules) est ensuite rajouté. Puis le mélange est coulé sur boîte de Petri et incubé en jarre anaérobie à 39°C.

### **Résultats**

Les premières solutions d'antibiotiques que nous avons utilisées sont l'ampicilline (100 µg/mL), le chloramphénicol (0,34 mg/mL) et le mélange pénicilline (100 U/mL) / streptomycine (100 µg/mL). Au bout de 72h de culture, pour les deux types de protocoles testés, aucune différence de croissance n'est observée. Les parasites se multiplient aussi bien en présence et en absence d'antibiotiques. De plus, l'observation de ces cultures indique que les antibiotiques n'ont eu aucun effet sur la croissance des bactéries. Nous avons ensuite ajouté certains de ces antibiotiques simultanément dans le milieu de culture : pénicilline (100 U/mL) /streptomycine (100 µg/mL) + ampicilline (100 µg/mL), pénicilline (100 U/mL) /streptomycine (100 µg/mL) + chloramphénicol (0,34 mg/mL). Au bout de 72h de culture, il y a toujours présence de nombreuses bactéries dans le milieu (tableau 1).

Par contre, l'utilisation de la gentamicine (25 µg/mL) entraîne une élimination des bactéries mais en même temps la croissance des parasites est totalement inhibée.

Parmi les antibiotiques testés, seule la gentamicine est donc capable d'éliminer les bactéries présentes dans le milieu de culture. En absence de bactéries, le parasite ne se développe plus suggérant que certaines bactéries sont nécessaires pour sa croissance *in vitro*. Sachant que la gentamicine n'est pas active contre les bactéries anaérobies, nous pouvons



supposer qu'il y a présence de bactéries aérobies dans la culture et que celles-ci semblent nécessaires au développement du parasite ainsi qu'au développement de certaines bactéries.

Ensuite, nous avons voulu tester si un lyophilisat réalisé à partir des bactéries présentes dans le milieu de culture était suffisant pour restaurer la croissance du parasite sur des cultures traitées à la gentamicine. Le lyophilisat bactérien est ajouté dans le milieu de culture simultanément à la gentamicine (25µg/mL). Au bout de 72h, nous n'observons malheureusement pas de développement parasitaire. Les bactéries doivent donc relarguer dans le milieu de culture des métabolites qui vont être utiles à la croissance du parasite.

Une autre méthode a été utilisée pour essayer d'éliminer les bactéries présentes dans la culture d'*H. meleagridis*. Pour certains protistes, la mise en place de culture axénique a été réalisée à partir de culture en milieu solide. C'est le cas du parasite intestinal humain, *Blastocystis hominis*, qui a été séparé des bactéries présentes dans le milieu après isolement de colonies parasitaires sur boîte de Petri (Tan et al., 2000). Nous avons utilisé le même protocole pour *H. meleagridis*. Les boîtes de Petri sont incubées soit en jarre anaérobie, soit directement dans l'étuve à 39°C. Au bout d'une semaine, nous observons l'apparition de colonies bactériennes. Après observation au microscope photonique, aucune colonie ne semble correspondre à *H. meleagridis*, suggérant alors que le parasite n'est pas capable de se développer en milieu solide dans les conditions réalisées.

#### **I-4- Premières identifications des bactéries associées à notre souche en culture**

La présence de bactéries semblant être essentielle à la croissance d'*H. meleagridis*, nous avons entrepris d'identifier les bactéries présentes dans le milieu de culture.

#### **Matériels et méthodes**

##### **Extraction de l'ADN**

Afin de caractériser les espèces bactériennes présentes dans le milieu de culture *in vitro*, nous avons extrait l'ADN bactérien. Les bactéries sont tout d'abord séparées des parasites par centrifugation à 240 g pendant 2 min. Puis les bactéries sont mises en solution dans un tampon TE contenant du lysosyme à une concentration finale de 250 µg/ml. Après



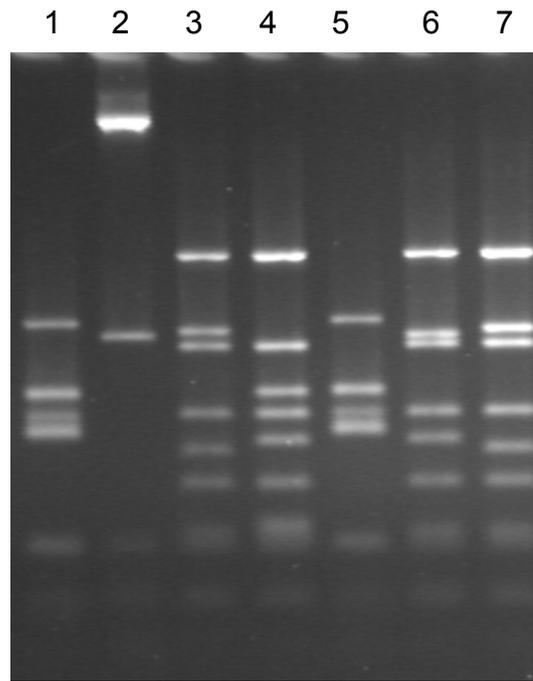
incubation 30 min à 37°C, une solution contenant du sodium-dodecyl-sulfate (SDS) 10% et de la Protéinase K (100 µg/ml) est ajoutée et le volume réactionnel est incubé 1 heure à 37°C. L'échantillon est ensuite incubé 10 min à 65°C dans une solution de NaCl à 5 M et de CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)/NaCl 1%. L'ADN est extrait par un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1). Après centrifugation durant 30 min à 4°C à 20 000 g, la phase aqueuse contenant l'ADN est conservée et à nouveau purifiée par l'addition de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1). Après centrifugation pendant 20 min à 4°C à 20 000 g, l'ADN de la phase aqueuse est mélangé à de l'isopropanol (0,6 volume) et le mélange est incubé 1h à -20°C. L'ADN est ensuite précipité par centrifugation (30 min, 4°C, à 20 000 g) puis le culot est lavé à l'éthanol 70% (centrifugation 10 min à 4°C à 20 000 g) avant d'être séché sous vide puis remis en solution dans de l'eau stérile et conservé à -20°C.

### **Amplification de l'ADNr 16S par PCR**

Les amplifications PCR sont réalisées dans le volume réactionnel suivant : 200 µM de chaque dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.5 unités de *Taq* DNA polymérase (Eurobio), 10 pmol de chaque amorce et 50 ng d'ADN génomique pour un volume final de 50 µl. Les amorces universelles 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991) sont utilisées pour l'amplification par PCR de la quasi-totalité du gène codant pour l'ARNr 16S des eubactéries (1400 pb). La réaction d'amplification est réalisée avec un thermocycleur (MJ Research PTC 200 thermal cycler) selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 5 min à 95°C ; 30 cycles comprenant une phase de dénaturation (30s min à 95°C), une phase d'hybridation (30s à 55°C) et une phase d'élongation (1min à 72°C) ; une élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits d'amplification sont analysés sur gels d'agarose 1%, visualisés sous UV après traitement au bromure d'éthidium (0,4µg/mL), découpés et purifiés sur colonne (Qiakit gel extraction QIAGEN).

### **Construction d'une librairie de clones**

Les produits PCR ont ensuite été clonés dans le vecteur Topo 2.1 (Invitrogen). Les clones positifs sont alors sélectionnés en utilisant des amorces s'hybridant en amont et en aval du site de clonage (M13 forward et M13 reverse). Les produits d'amplification présentant la



**Figure 6- Exemples de profils RFLP obtenus après digestion par l'enzyme *HaeIII* et migration sur gel d'agarose à 2,5%. Il y a 5 OTUs sur ce gel les profils 3 et 7 ainsi que les profils 1 et 5 étant identiques.**

taille attendue (1400 pb) subissent alors une digestion enzymatique par *HaeIII*, pendant 2h à 37°C. Les produits de digestion résultant du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP pour « restriction fragment length polymorphism ») sont alors séparés par électrophorèse (3h – 60mV) sur un gel d'agarose Nusieve 3 : 1 (Tebu) à 2,5%. Les clones qui présentent le même profil RFLP sont alors regroupés et considérés comme membres de la même unité taxonomique opérationnelle (OTU). Un clone de chaque OTU est sélectionné pour le séquençage. Les plasmides sont alors extraits et purifiés par le kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les réactions de séquençage sont par la suite réalisées par la société MWG (<http://www.mwg-biotech.com>).

### **Résultats**

Les différents clones obtenus montrent une variabilité de leur profil de restriction après digestion par l'enzyme *HaeIII*, confirmant ainsi la présence de plusieurs types bactériens (figure 6). Après analyse des différents profils de restriction, nous avons sélectionné 12 unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) différentes. Les séquences obtenues ont été analysées grâce au logiciel BlastN du serveur NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

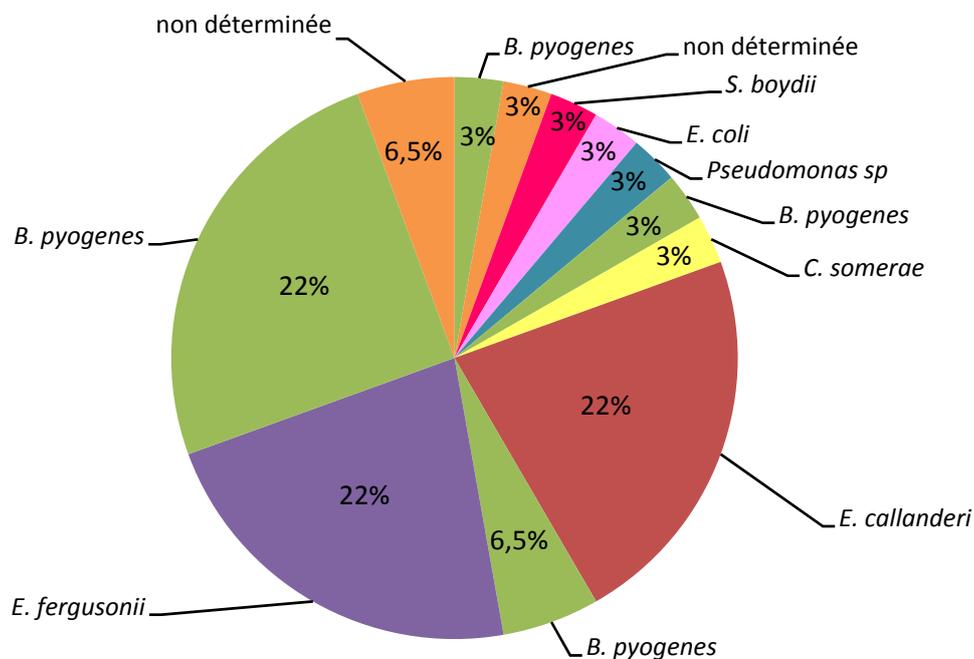
Plusieurs bactéries ont été identifiées après confrontation avec les bases de données (tableau 2). Ces bactéries appartiennent à des genres différents et ont des métabolismes différents. Trois OTUS sont associées à la famille des entérobactéries. Cette famille est composée de bacilles GRAM négatif, à métabolisme anaérobie facultatif. La première bactérie affiliée est la bactérie *Escherichia fergusonii*, bactérie très proche d'*Escherichia coli*. Le deuxième type bactérien est *Shigella boydii*, bactérie résidant dans le tractus gastro-intestinal des animaux, pouvant provoquer des dysenteries. La troisième séquence est affiliée à une souche d'*Escherichia coli*.

Une autre OTU est proche des bactéries appartenant à la famille des Pseudomonadaceae, bacilles GRAM négatifs, à métabolisme aérobie.

Quatre OTUs sont associées à la famille des Bacteroidaceae qui sont des bacilles GRAM négatif à métabolisme anaérobie retrouvés au niveau du tractus intestinal. La bactérie

OTUs	bactéries les plus proches identifiées		Métabolisme bactérien
	familles	espèces	
3 OTUs	Enterobacteriaceae	<i>Shigella boydii</i>	anaérobie falcutatif
		<i>Escherichia fergusonii</i>	
		<i>Escherichia coli</i>	
1 OTUs	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp</i>	aérobie
4 OTUs	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides pyogenes</i>	anaérobie
1 OTU		<i>Cetobacterium somerae</i>	aéro-tolérant
1 OTU		<i>Eubacterium callanderi</i>	anaérobie
2 OTUs	pas de correspondance dans les bases des données		

**Tableau 2- Analyse des 12 unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) par le logiciel BlastN du serveur NCBI. 10 OTUs sont affiliées à des bactéries par contre 2 OTUs n'ont pas de correspondance dans les bases de données.**



**Figure 7- Proportion de chaque OTU dans la culture par rapport au nombre total de clones obtenus. Les OTUs les plus représentées sont celles affiliées à *E. fergusonii*, à *E. callanderi* et à *B. pyogenes*.**

la plus proche identifiée pour ces 4 OTUs est la même et correspond à l'espèce *Bacteroides pyogenes*.

Une OTU est affiliée au genre *Cetobacterium*, bacilles GRAM négatif, anaérobies mais pouvant tolérer des pourcentages très faibles d'oxygène (2 à 6 %), et une autre OTU correspond à la bactérie *Eubacterium Callanderi*, bacille GRAM positif à métabolisme anaérobie, habituellement présente dans les flores intestinales.

Enfin, les deux derniers OTUs ne sont associées à aucune des séquences identifiées dans les bases de données.

Les OTUs les plus représentées dans la culture, par rapport au nombre total de clones, sont celles qui sont affiliées à *Bacteroides pyogenes*, *Eubacterium callanderi* et *Escherichia fergusonii* (figure 7).

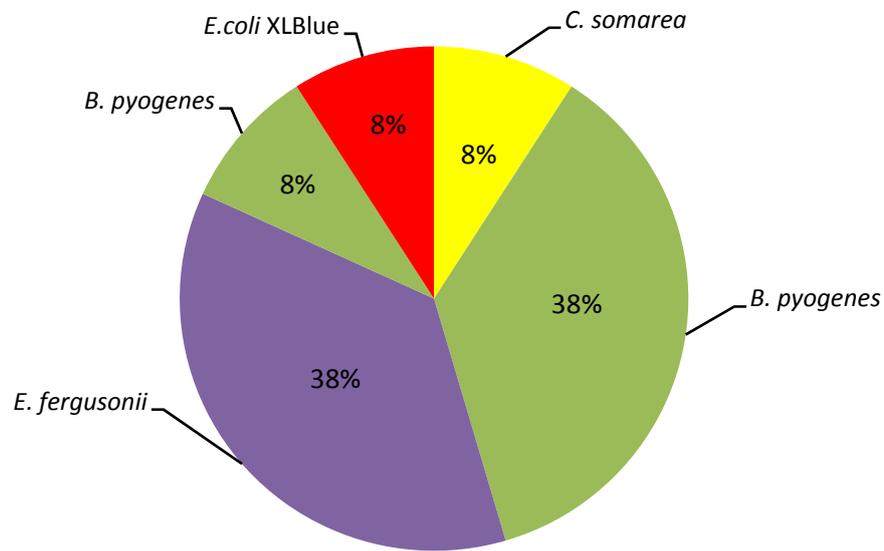
De plus, parmi les bactéries identifiées, il est intéressant de noter que certaines sont sensibles à la gentamicine. C'est le cas des bactéries aérobies du genre *Pseudomonas* ainsi que les entérobactéries telles qu'*E. coli*. Par contre, les bactéries anaérobies présentes dans cette culture telles que *B. pyogenes* sont normalement insensibles à la gentamicine. Or nous avons remarqué que le traitement à la gentamicine entraîne l'élimination de toutes les bactéries présentes dans le milieu de culture. Les relations entre les bactéries et le parasite dans la culture *in vitro* semblent donc très complexes.

### **I-5- Essais de mise en place d'une culture monoxénique**

Nos précédents résultats suggèrent que les bactéries sont essentielles pour le développement parasitaire. Dans le but de simplifier et de contrôler la culture, nous avons voulu mettre en place une culture de type monoxénique.

#### **Matériels et méthodes**

L'expérience a consisté à réaliser plusieurs sous passages de manière à diluer la flore bactérienne et en ajoutant à chaque repiquage une souche d'*Escherichia coli* XL1blue résistance à l'ampicilline. De manière à sélectionner cette souche bactérienne, nous avons rajouté à chaque passage cet antibiotique dans le milieu. Les parasites sont lavés trois fois en



**Figure 8- Proportion des 5 OTUS par rapport au nombre total de clones obtenus dans la culture enrichie en XL1blue . Les OTUs les plus représentées sont celles affiliées à *E. fergusonii* et à *B. pyogenes*.**

PBS et centrifugés à 240 g pendant 2 minutes. Un culot de  $2.10^6$  parasites est ensuite repris dans 3 mL de milieu frais auquel sont rajoutées  $4.10^6$  bactéries XL1Blue ainsi que l'ampicilline à la concentration 0,1 mg/mL.

### **Résultats**

Après 5 passages, nous n'avons pas observé de changements dans la croissance du parasite. L'observation en microscopie photonique des bactéries après coloration par la technique de Gram nous a permis de démontrer la présence majoritairement de bactéries Gram négatif.

La technique de clonage séquençage précédemment décrite a été utilisée sur la culture enrichie en *E. coli* XL1blue. L'analyse des profils de restriction obtenus avec l'enzyme *HaeIII* montre que nous avons réussi à éliminer certaines bactéries présentes dans la culture cependant plusieurs types sont encore présents. En effet, 5 OTUs différentes ont été identifiées dont une correspond aux bactéries *E. coli* XL1blue. Deux OTUs correspondent à *B. pyogenes*, une à *E. fergusonii* et une à *C. somerae*. Par contre, nous ne retrouvons pas les profils correspondants au genre *Pseudomonas*, à la bactérie *E. coli*, à *Shigella boydii* ainsi qu'à la bactérie *Eubacterium Callanderi*. Les OTUs les plus représentées par rapport au nombre total de clones sont celles affiliées à *B. pyogenes* et *E. fergusonii* alors que la souche XL1Blue rajoutée est loin d'être majoritaire dans la culture (figure 8).

### **I-6- Conclusions**

Nos essais de culture axénique montrent que les bactéries présentes dans la culture *in vitro* d'*H. meleagridis* doivent jouer un rôle important pour la croissance du parasite. La sensibilité des bactéries à la gentamicine suggère qu'il y a dans la flore bactérienne certaines bactéries de type aérobie. Ceci est confirmé par les premiers essais d'identification de ces bactéries. En effet, parmi les nombreuses espèces bactériennes présentes nous avons pu mettre en évidence des bactéries de type anaérobie stricte telles que *Bacteroides pyogenes* mais aussi de type aérobie comme le genre *Pseudomonas*.



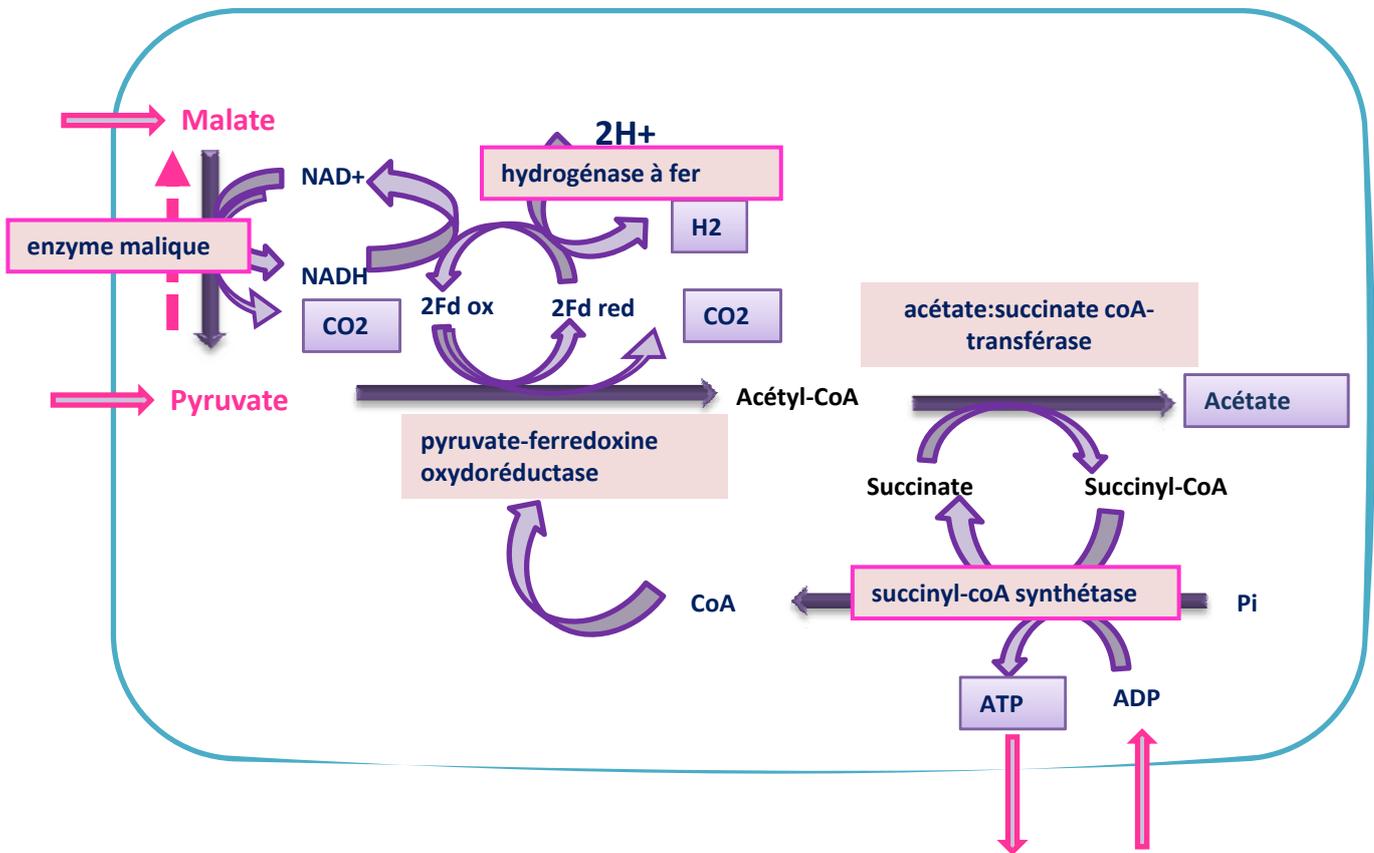
De plus, nous n'avons pas réussi à mettre en place une culture de type monoxénique en utilisant une souche d'*E. coli*. Ces résultats suggèrent donc que la culture *in vitro* est en réalité un écosystème complexe et qu'il doit exister une interdépendance entre de nombreux acteurs présents dans cette culture.

Ayant pu identifier certaines bactéries dans le milieu de culture, il serait désormais intéressant d'identifier si le parasite est capable d'ingérer certaines de ces bactéries et de réaliser des essais d'élimination d'un type bactérien particulier. Ceci pourrait permettre notamment de limiter le nombre d'espèces bactériennes dans le milieu et de sélectionner uniquement les bactéries nécessaires à la croissance d'*H. meleagridis*.



# Chapitre II

## **IDENTIFICATION D'ENZYMES HYDROGENOSOMALES CHEZ *H.* *MELEAGRIDIS* ET ROLE POTENTIEL DANS L'ADHESION**



**Figure 1- Métabolisme énergétique dans l'hydrogénosome de *T. vaginalis*.** Les trois enzymes que nous avons identifiées chez *H. meleagridis* sont l'enzyme malique, la succinyl-coenzyme A synthétase et l'hydrogénase à fer.

## **II- IDENTIFICATION D'ENZYMES HYDROGENOSOMALES CHEZ *H. MELEAGRIDIS* ET ROLE POTENTIEL DANS L'ADHESION**

Les connaissances sur le métabolisme de *H. meleagridis* sont très limitées. Les seules informations disponibles concernent la très forte apparentée phylogénétique de ce parasite avec des organismes à métabolisme anaérobie appartenant au groupe des trichomonadines. Comme *T. vaginalis*, *H. meleagridis* est caractérisé par la présence d'organites ressemblant aux hydrogénosomes (décrits en 1968 par Schuster) ainsi que par sa sensibilité au métronidazole, molécule qui entraîne la synthèse de radicaux toxiques dans les hydrogénosomes (Hrdy et al., 2005).

L'objectif de l'étude était tout d'abord de mettre en évidence des protéines qui pourraient intervenir dans les processus d'adhésion du parasite. Il a été montré chez *T. vaginalis* que certaines enzymes du métabolisme énergétique jouaient le rôle d'adhésines. Nous avons donc fait le choix d'identifier les gènes codant trois enzymes de ce métabolisme anaérobie. Des amplifications PCR ont été réalisées grâce à des amorces désignées dans des régions conservées d'enzymes hydrogénosomales chez *T. vaginalis*. Cette stratégie nous a permis d'amplifier les séquences de trois gènes : le premier code pour une enzyme malique, permettant la décarboxylation du malate en pyruvate, le second code pour la sous-unité  $\alpha$  de la succinyl coenzyme A synthétase ( $\alpha$ -SCS), enzyme impliquée dans la production d'ATP et le troisième gène code pour une hydrogénase à fer, enzyme clé des hydrogénosomes qui produit l'hydrogène moléculaire (figure 1).

Nous avons ainsi pu montrer que ces trois protéines étaient localisées dans des organites à double membrane, denses aux électrons, assimilés à des hydrogénosomes. La localisation de l' $\alpha$ -SCS à la surface de la cellule suggère également un rôle potentiel de cette protéine dans l'adhésion du parasite à la cellule-hôte.



**First molecular characterization of hydrogenosomes in the protozoan  
parasite *Histomonas meleagridis***

Muriel Mazet<sup>a</sup>, Marie Diogon<sup>a</sup>, John F. Alderete<sup>b</sup>, Christian P. Vivarès<sup>a</sup>,

Frédéric Delbac<sup>a,\*</sup>

*International Journal for Parasitology, sous presse*



**First molecular characterization of hydrogenosomes in the protozoan  
parasite *Histomonas meleagridis***

**Muriel Mazet<sup>a</sup>, Marie Diogon<sup>a</sup>, John F. Alderete<sup>b</sup>, Christian P. Vivarès<sup>a</sup>, Frédéric  
Delbac<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup>*Equipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, LBP, UMR CNRS 6023, Université Blaise  
Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France*

<sup>b</sup>*Department of Microbiology, MC7758, UTHSCSA, 77003 Floyd Curl Dr. San Antonio, TX  
78229-3900, USA*

\*Corresponding author.

Address: Equipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, LBP, UMR CNRS 6023, Université  
Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France, Tel.: +33-4-73-40-78-  
68; fax: +33-4-73-40-76-70.

*E-mail address:* [frederic.delbac@univ-bpclermont.fr](mailto:frederic.delbac@univ-bpclermont.fr) (F. Delbac)

**Abstract**

*Histomonas meleagridis* is a trichomonad species that undergoes a flagellate-to-amoeba transformation during tissue invasion and causes a serious disease in gallinaceous birds (blackhead disease or histomoniasis). Living in the avian cecum, the flagellated form can be grown in vitro in the presence of an ill-defined bacterial flora. Its cytoplasm harbours numerous spherical bodies which structurally resemble hydrogenosomes. To test whether these organelles may be involved in anaerobic metabolism, we undertook the identification of *H. meleagridis* genes encoding some potentially conserved hydrogenosomal enzymes. The strategy was based on several PCR amplification steps using primers designed from available sequences of the phylogenetically-related human parasite *Trichomonas vaginalis*. We first obtained a C-terminal sequence of an iron-hydrogenase homologue (Hm\_HYD) with typical active site signatures (H-cluster domain). Immunoelectron microscopy with anti-Hm\_HYD polyclonal antibodies showed specific gold labeling of electron-dense organelles, thus confirming their hydrogenosomal nature. The whole genes encoding a malic enzyme (Hm\_ME) and the  $\alpha$ -subunit of a succinyl coenzyme A synthetase (Hm\_ $\alpha$ -SCS) were then identified. Short N-terminal presequences for hydrogenosomal targeting were predicted in



both proteins. Anti-Hm\_ME and anti-Hm\_α-SCS antisera provided immunofluorescence staining patterns of *H. meleagridis* cytoplasmic granules similar to those observed with anti-Hm\_HYD antiserum or mAb F5.2 known to react with *T. vaginalis* hydrogenosomes. Hm\_ME, Hm\_α-SCS and Hm\_HYD were also detected as reactive bands on immunoblots of proteins from purified hydrogenosomes. Interestingly, anti-Hm\_α-SCS staining of the cell surface in non-permeabilized parasites suggests a supplementary role for SCS in cytoadherence, as previously demonstrated in *T. vaginalis*.

*Keywords:* *Histomonas meleagridis*; Hydrogenosome; Iron-hydrogenase; Malic enzyme; α-succinyl coenzyme A synthetase; Cell adhesion

## 1. Introduction

Histomoniasis, also known as “blackhead” disease, is a serious parasitic infection due to the microaerophilic flagellated protozoan *Histomonas meleagridis* that causes significant damage to the ceca and liver in gallinaceous birds (turkeys, chickens, quail, etc.). Untreated enterohepatitis may cause an especially high rate of mortality in farm flock turkeys, entailing heavy economic losses to the poultry industry (McDougald, 2003). Some heterocyclic compounds, including nifursol and dimetridazole, were successfully used as feed additives for preventive treatment or as curative drugs (McDougald, 2005). However, due to potential health risks to human consumers, these drugs were withdrawn from the market in Europe, leading to a recrudescence of histomoniasis. The life cycle of *H. meleagridis* commonly involves an intermediate host, the cecal worm *Heterakis gallinarum*, which transmits the parasite from bird to bird within its eggs (Graybill and Smith, 1920; Tyzzer, 1924). Histomoniasis in turkeys has also been shown to occur in the absence of cecal worms, suggesting possible direct, lateral transmission (Hu and McDougald, 2003). Two different forms of *H. meleagridis* can be observed in infected hosts, (i) a flagellated form with one anterior flagellum, residing in the cecal lumen and (ii) an amoeboid form invading the intestinal mucosa and liver (Bishop, 1938; Lund et al., 1967). No cyst has so far been identified. In vitro cultures were obtained in the presence of an undefined bacterial flora taken from the turkey cecum (Lund, 1969).

Electron microscopy studies of *H. meleagridis* have revealed morphological similarities with trichomonads, notably the presence of many mastigont structures with four kinetosomes



(Rybicka et al., 1972). In the taxonomic system of Cavalier-Smith (1998), *H. meleagridis* is placed in the phylum Parabasala, class Trichomonadea, family Monocercomonadidae. Comparative analysis of small subunit rRNAs suggests a close phylogenetic relationship with *Dientamoeba fragilis* (Gerbod et al., 2001), an atypical intestinal trichomonad that lacks flagella throughout its life cycle. Thus, *Histomonas* and *Dientamoeba* may be representative of a reductive evolution marked by more or less extensive losses of trichomonad cytoskeletal structures.

Typical trichomonads harbour hydrogenosomes instead of mitochondria, these organelles being the sites of a fermentative oxidation of pyruvate that yields acetate, carbon dioxide and hydrogen with concomitant production of ATP, as discovered in the cattle parasite *Tritrichomonas foetus* (Lindmark and Müller, 1973) and subsequently in the human parasite *Trichomonas vaginalis* (Lindmark et al., 1975). The effective treatment of human trichomoniasis is based on the use of 5-nitroimidazole drugs such as metronidazole, that are activated to cytotoxic anion radicals through their reduction in *T. vaginalis* hydrogenosomes (Hrdy et al., 2005). Similar to *Trichomonas*, *H. meleagridis* is sensitive to 5-nitroimidazoles (McGuire et al., 1964; McDougald and Jinghui, 2004). Membrane-bounded dense bodies have been observed in the cytoplasm of the avian parasite (Schuster, 1968) but the molecular characteristics of the presumed hydrogenosomes have yet to be explored. It should be stressed that some hydrogenosomal enzymes of *T. vaginalis* may have an alternate location related to an additional function. More precisely, these enzymes can be targeted to the cell surface in order to mediate the adherence of an amoeboid form of the parasite to vaginal epithelial cells (Alderete et al., 2001; Garcia et al. 2003; Moreno-Brito et al., 2005). A search for hydrogenosomal enzymes in *H. meleagridis* was therefore of interest in gaining a better understanding of its anaerobic metabolism and putative adhesins.

Here, we have determined the sequences of three *H. meleagridis* genes encoding homologues of the following proteins: (i) an iron-only hydrogenase (Fe-hydrogenase), the key enzyme for molecular hydrogen production in hydrogenosomes (Horner et al., 2000), (ii) the alpha-subunit of a succinyl-coenzyme A synthetase ( $\alpha$ -SCS) (Jenkins et al., 1991; Alderete et al., 2001), and (iii) a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)-dependent hydrogenosomal malic enzyme (ME) (Drmotá et al., 1996). Immunolocalisation experiments using antibodies raised against corresponding recombinant polypeptides provide strong



evidence for the hydrogenosomal nature of *H. meleagridis* cytoplasmic bodies and indicate that  $\alpha$ -SCS may be also transferred to parasite cell surface.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasite culture and nucleic acid preparation

The non-axenic *H. meleagridis* strain HmZL, isolated from a chicken orally infested by *Heterakis gallinarum* eggs, was kindly provided by Dr L. Zenner (Ecole Nationale Vétérinaire, Lyon, France). Parasites were grown using small culture tubes (4 mL) maintained in a vertical position, each tube containing 3 mL of medium 199 (Gibco) supplemented with 5% horse serum (Gibco) and 5% rice starch (Sigma) at 39°C (Dwyer et al., 1970). Cells were collected by centrifugation at 250 g for 2 min, washed four times in PBS to remove bacteria and then stored at -20°C. Genomic DNA and total RNA were prepared using the ELU-Quick DNA purification Kit (Schleicher & Schuell) and the TRI Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Inc), respectively.

### 2.2. PCR amplifications

Primers used for the amplification of the *H. meleagridis* [Fe]-hydrogenase,  $\alpha$ -SCS and ME gene fragments were first designed from *T. vaginalis* (Tv) genes. In subsequent steps of the protocol, other primers were specific to *H. meleagridis* (Hm) sequences.

Primers Tv1 (5'-ccatgcacagccaagaagga-3') and Tv2 (5'-gcagccacctgggcaggccat-3') allowed the amplification of a 460 bp-fragment of the [Fe]-hydrogenase gene. Identification of the 3' end was realized from reverse transcribed mRNAs. Reverse transcription was performed with the adaptor oligo-dT primer (5'-gactcactatagggcatgct<sub>17</sub>-3') using 15 U of the AMV reverse transcriptase (Pharmacia). PCR reaction was then performed using the adaptor primer (5'-gactcactatagggcatgc-3') in combination with Hm1 (5'-acaaggatccaaaggttgc-3'). After denaturing the 1:2 dilution of cDNA at 94°C for 3 min, 35 cycles were run as follows: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 50°C for 45 s and elongation at 72°C for 1 min, with a final extension of 10 min at 72°C.

For the  $\alpha$ -scs gene, primers Tv3 (5'-cttatcggtccaaactgccag-3') and Tv4 (5'-agctgtgcccttgccgccag-3') amplified a fragment of ~ 400 bp. The lacking 5' end was identified



using primers Tv5 (5'-atgctctctcttcttc-3') and Hm3 (5'-gttgaataattccatc-3'). Amplification of the 3' end was performed from reverse transcribed mRNAs using the adaptor primer in combination with Hm2 (5'-ggaaaaatcggattgttcc-3'). One whole  $\alpha$ -scs gene was finally amplified from genomic DNA using primers Hm4 (5'-cattgccatctgaagacc-3') and Hm5 (5'-ttagatcggcccaactt-3').

An ~ 800 bp-fragment of the ME gene was obtained with primers Tv6 (5'-gtattctcggctcggcgatc-3') and Tv7 (5'-ttgggttgggttggaaagtg-3'). Identification of the 5' end was performed using primers Tv8 (5'-atgctcacatcttcagtc-3') and Hm7 (5'-accaactgggataccaag-3'). The 3' end was identified after reverse transcription with the adaptor primer in combination with Hm6 (5'-ttgcgcaccacgtatcagg-3'). A complete gene was then amplified from genomic DNA using primers Tv8 (5'-atgctcacatcttcagtc-3') and Hm8 (5'-ttagtaaactgttcatattc-3').

PCR amplifications were performed in a 50  $\mu$ l reaction using a Perkin-Elmer DNA thermal cycler 2400 apparatus. After denaturing DNA at 94°C for 3 min, 35 cycles were run with 20 s of denaturation at 94°C, 30-45 s of annealing at 48-55°C and 1 min of extension at 72°C, followed by a last extension step for 10 min at 72°C. All PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel and purified with a Qiaquick gel extraction kit (Qiagen). They were then cloned in a pGem-T easy vector (Promega) and sequenced.

### 2.3. Sequence analyses

Molecular masses and isoelectric points were calculated using ExPASy Proteomics tools (<http://www.expasy.org/tools/>). Amino acid sequence alignment was performed with ClustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). The search for conserved protein domains was undertaken with Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>).

### 2.4. Expression of recombinant *H. meleagridis* proteins in *Escherichia coli*

As a prerequisite to heterologous expression, some parts of the three studied *H. meleagridis* genes were PCR-amplified with the insertion of one *Bam*HI and one *Eco*RI restriction site in 5' and 3' of the amplified fragment, respectively. Corresponding protein regions and primers were as follows: (i) a C-terminal part of Fe-hydrogenase, primers *hyd-D* (5'-cgggatccatcgaagaccacaattctc-3') and *hyd-R* (5'-cggaattcgacatctgcaaccttggatc-3'), (ii)  $\alpha$ -



SCS region 129-273, primers  $\alpha$ -scs-D (5'-cgggatcccttattgtccaaactgc-3') and  $\alpha$ -scs-R (5'-cggaattcagcagtagaccctttccacc-3'), and (iii) ME region 165-243, primers *me*-D (5'-cgggatcccgattctcgggtctcggt-3') and *me*-R (5'-cggaattcgattgtgggtggaaag-3'). Amplifications were performed in a 50  $\mu$ l reaction according to standard conditions (Eurobio). PCR-products were digested with both *Bam*HI and *Eco*RI enzymes and cloned into a prokaryotic expression vector pGEX-4T1 (Pharmacia). This vector has previously been modified to include an 8-His tag at the C-terminus of the expressed protein, which is useful to purify the recombinant protein by affinity chromatography on Ni-NTA columns (Qiagen). Resulting recombinant plasmids pGEX-His-Hyd, pGEX-His- $\alpha$ SCS and pGEX-His-ME were introduced into *E. coli* BL21<sup>+</sup> strain. After induction with 2 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h, bacterial proteins were solubilized in 2.5% SDS, 100 mM dithiothreitol (DTT). Recombinant proteins were also purified on an Ni-NTA column according to the recommendations of the manufacturer (Qiagen). Protein samples were then analyzed on 10% polyacrylamide gels.

### 2.5. Antibody production

Polyclonal antibodies to *E. coli*-expressed recombinant proteins were produced in SWISS mice from protein bands separated by SDS-PAGE. The animal house (agreement C63014.19) and the experimental staff (agreement 63-146) had been approved by the French veterinary services, and experiences were conducted according to ethical rules. Protein bands were excised from Coomassie blue-stained gels and crushed in PBS with a Potter tissue homogenizer. Mice were then injected i.p. with samples homogenized with FCA for the first injection and Freund's incomplete adjuvant for the next injections (at days 14, 21 and 28). Sera were collected 1 week after the last injection and stored at -20°C.

### 2.6. SDS-PAGE and Western blotting

*Histomonas meleagridis* proteins were solubilized with 1% Nonidet P-40 in PBS in the presence of 0.2 mM cysteine proteinase inhibitor N-(*trans*-epoxysuccinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide (E-64) (Sigma). Protein samples were then analyzed by 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were stained with Coomassie blue or transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore). For immunological detection,



membranes were saturated in PBS-5% skimmed milk and incubated for 3 h with an appropriate dilution of mouse antibodies (1:100-1:1,000). After washing, membranes were reacted with horseradish phosphatase alcaline-conjugated goat anti-mouse IgG (1:10,000 dilution, Promega) and revealed by NBT-BCIP (Promega).

### *2.7. Indirect immunofluorescence assays*

Parasites were fixed with 100% methanol for 30 min at room temperature. In some experiments, fixation was done with 4% formaldehyde and 0.25% glutaraldehyde for 1 h at room temperature then washed in PBS-50 mM NH<sub>4</sub>Cl. Fixed cells were washed once in PBS, resuspended in PBS and placed on polylysine-treated cover glasses. Slides were saturated with PBS-5% skimmed milk then incubated for further 1 h with the different antisera diluted in PBS-0.1% Triton X-100. After washing, slides were stained for 1 h with a 1:1,000 dilution of Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes). Preparations were examined with a DMR Leica epifluorescence microscope.

### *2.8. Transmission electron microscopy (TEM)*

For TEM observations of *H. meleagridis* cells, parasite pellets were fixed for 30 min with 2% glutaraldehyde and 0.05% ruthenium red in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), and then post-fixed for 1 h with 1% OsO<sub>4</sub> in the same buffer. After dehydration through a graded ethanol series and infiltration in propylene oxide, cells were embedded in Epikote resin (Agar Scientific). Ultrathin sections were obtained with an UltracutS Leica ultramicrotome, double stained with uranyl acetate and lead citrate, and then examined under a JEOL 1200X transmission electron microscope.

For immunogold labelling, parasites were fixed with 4% formaldehyde-0.25% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 for 30 min. Cells were washed in PBS, dehydrated and embedded in Unicryl resin (British BioCell International). Ultrathin sections blocked for 1 h with 1% BSA in PBS were incubated for 3 h with a 1:50 dilution of anti-Hm\_HYD mouse antisera then for 1 h with a 1:100 dilution of goat anti-mouse IgG conjugated with 10 nm colloidal gold particles (Sigma). Preparations were stained with 4% uranyl acetate, prior to examination.

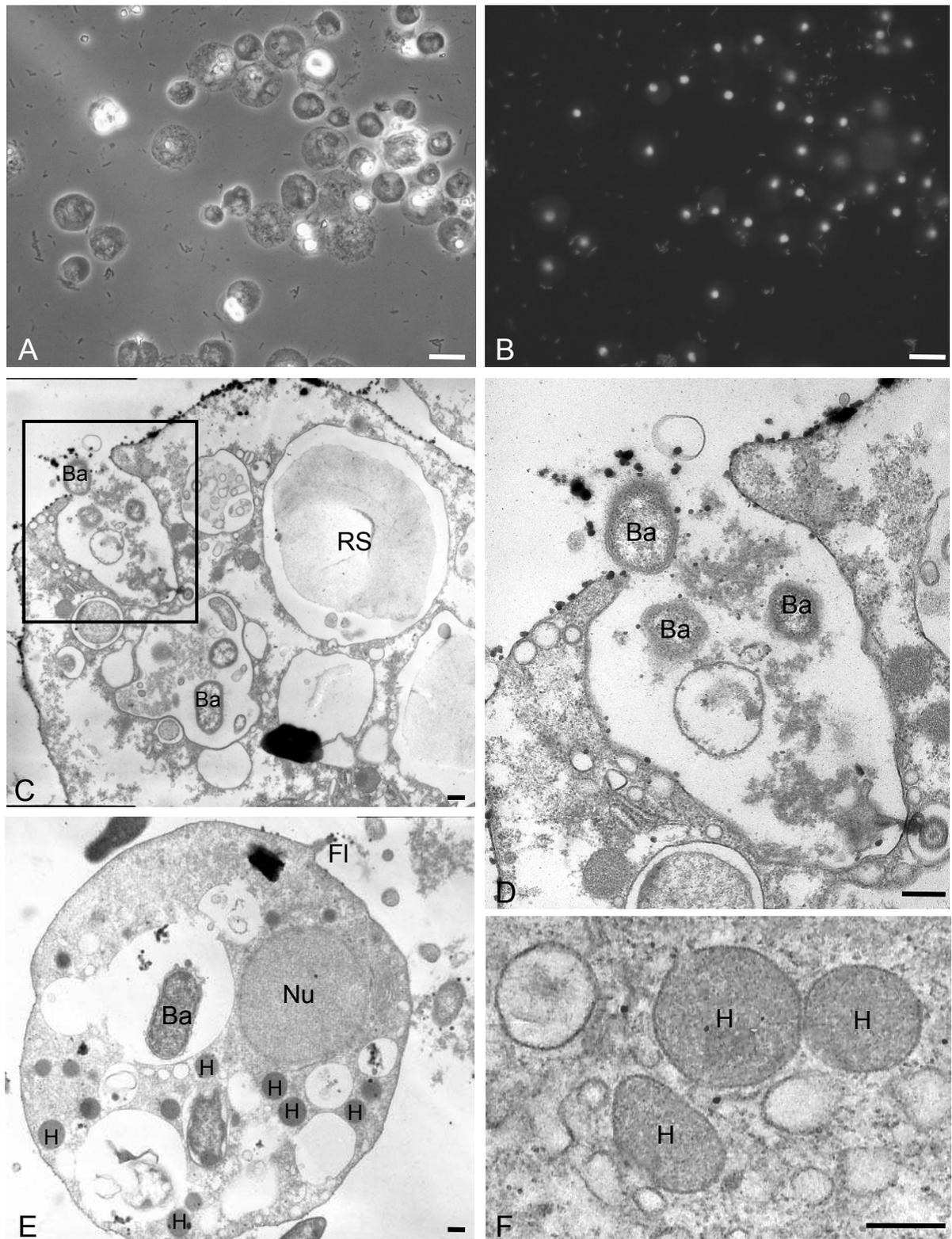


Fig. 1. Light and electron micrographs of *in vitro* cultivated *Histomonas meleagridis*. As viewed in phase contrast (A) or after DAPI staining (B), the cell population is represented by spheroid protozoan cells (their flagella are out of the plane of focus) and rod-shaped bacteria. Large refractile inclusions correspond to ingested starch granules. C: Ultrathin cross-section through *H. meleagridis* cytoplasm, showing several food vacuoles that contain rice starch (RS) and bacteria (Ba). D: Higher magnification of a peripheral area (boxed in C) characterized by an early step of phagocytosis. E, F: Micrographs illustrating the presence of electron-dense hydrogenosome-like organelles (H) scattered between digestive vacuoles of various sizes. Fl: flagellum, Nu: nucleus, RS: rice starch. Bars, 10  $\mu$ m for A-B and 500 nm for C-F.

### 2.9. Preparation of a hydrogenosome-enriched fraction

*Histomonas meleagridis* cells were harvested by centrifugation (250 g, 2 min), washed three times in PBS and once in an isotonic medium (225 mM sucrose, 20 mM KCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2). The washed parasites were resuspended in isotonic medium and disrupted by numerous strokes in a Potter tissue homogenizer for 5 min. The homogenate was centrifuged at 500 g for 10 min to remove nuclei and large cell debris. A crude hydrogenosome fraction was further pelleted at 14,000 g for 20 min and examined by TEM. Proteins of this cell fraction were solubilized in Laemmli buffer containing 100 mM DTT and 2.5% SDS, separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Mouse antisera were then applied as described above.

## 3. Results

### 3.1. Some observations on xenically cultured *Histomonas meleagridis*

*Histomonas meleagridis* was cultured in medium 199 supplemented with horse serum and rice starch, the last ingredient being essential for in vitro development of the parasite. In contrast to the original procedure of Dwyer (1970), chicken embryo extract was not added because we failed to detect any significant stimulating effect by this component. Light microscopy observations showed the predominance of roundish flagellated forms, about 15-20 µm in diameter (Fig. 1A). The *H. meleagridis* generation time was estimated to be ~ 6 h. As shown in Fig. 1, the cultures also contain bacteria that should mainly originate from the turkey ceca. Some preliminary studies to identify these bacteria have been undertaken. Sequencing data from PCR-amplified 16S rDNA supported the preponderance of the anaerobic species *Bacteroides pyogenes*. Our attempts to fully remove the bacterial population with the help of different antibiotics (ampicilline, penicilline, streptomycine, gentamicine) were unsuccessful. TEM examination of such xenic cultures clearly indicate that *H. meleagridis* cells can ingest some bacteria as well as rice starch granules via phagocytosis (Fig. 1C, D), but whether such bacteria are absolutely required for parasite nutrition remains an open question. It seems likely that the microaerophilic culture conditions are converted into nearly anaerobic ones, as a result of the profuse growth of bacteria depleting the oxygen from the medium.



In addition to large food vacuoles, the *H. meleagridis* cytoplasm exhibits numerous spherical bodies, 300-600 nm in diameter, characterized by an electron-dense matrix (Fig. 1E, F) and resembling the hydrogenosomes of *T. vaginalis* and *T. foetus*. Thus, it may be that, in common with *T. vaginalis* and *T. foetus*, *H. meleagridis* has a compartmentalization of some similar enzymes involved in anaerobic metabolism. Given the phylogenetic affinities between *Histomonas* and *Trichomonas* genera, a first step in our PCR amplification strategy for putative genes encoding hydrogenosomal enzymes in the avian parasite was based on the use of primers designed from available *T. vaginalis* sequences.

### 3.2. Evidence for *Histomonas meleagridis* iron-hydrogenase

Fe-hydrogenase is specific to the hydrogenosomal metabolism. Trying to identify such an enzyme in *H. meleagridis* was therefore important to ascertain whether its hydrogenosomes really have the capacity to associate protons and electrons for producing molecular hydrogen. The alignment between four *T. vaginalis* Fe-hydrogenases allowed the design of primers in two conserved regions of the presumed hydrogen-activating site (PCTAKKD and MACPGGC, see Figs. 2 and 3). These primers (Tv1 and Tv2) resulted in the amplification of a 460-bp fragment from *H. meleagridis* genomic DNA. The lacking 3' region of the gene was then amplified by RT-PCR of *H. meleagridis* mRNAs. After reverse transcription with an oligo-dT primer, the PCR reaction was performed using the primer corresponding to the adaptator sequence linked to oligo-dT and the primer Hm1 designed from the 460-bp DNA sequence (Fig. 2A). A 3' untranslated region (3' UTR) of only 18 nucleotides long was revealed. Unfortunately, we did not succeed in identifying the 5' end part of the gene. The deduced partial protein sequence (Hm\_HYD) represents the last 223 amino acids of a complete enzyme and has 62% identity with a 51-kDa Fe-hydrogenase of *T. vaginalis* (Fig. 3). As expected, the C-terminal region harbors conserved motives specific to the H-cluster domain involved in catalysis and three of the four cysteine residues required for its association with a complex metal cofactor.

A part of the obtained *H. meleagridis* sequence (see Fig. 3) was cloned in the pGEX-4T1-His vector for expression of a recombinant polypeptide in *E. coli*. After IPTG induction, SDS-PAGE analysis of the bacterial lysate revealed a highly expressed fusion protein with the expected size (not shown). This protein was purified on Ni-NTA columns and then used for

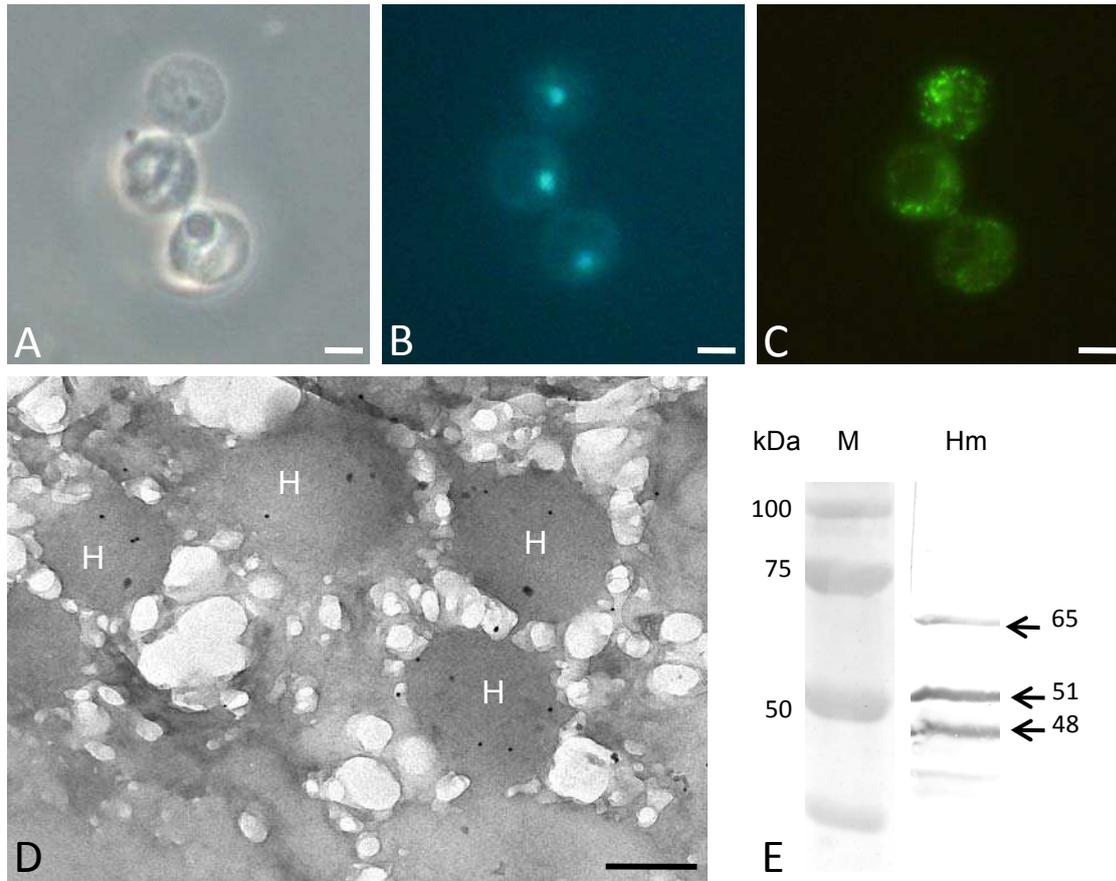


Fig. 4. Immunodetection of *H. meleagridis* [Fe]-hydrogenase using anti-Hm\_HYD antisera. Methanol fixed parasites were observed in phase contrast microscopy (A), after DAPI staining of nuclei (B) and after labeling with anti-Hm\_HYD (1:100 dilution) in IFA (C). Some cytoplasmic granules are reactive to the antibodies. Electron immunogold labeling (D) shows that these granules correspond to hydrogenosomes (H). Bars, 10 $\mu$ m in A-C and 200 nm in D. E: Western blotting of *H. meleagridis* proteins solubilized with 1% Nonidet P40 (Hm), using anti-Hm\_HYD at the 1:500 dilution. Three major reactive bands should represent potential [Fe]-hydrogenases with different sizes. Molecular mass standards (M) are in kDa.

mouse immunization. In indirect immunofluorescence assay (IFA) experiments, the anti-Hm\_HYD antisera obtained provided strong fluorescence signals associated with small bodies inside *H. meleagridis* cells (Fig. 4C). Immunoelectron microscopy clearly showed specific gold labeling of spheroid cytoplasmic organelles (Fig. 4D), which reinforces the idea that such organelles are hydrogenosomes. Three major bands were detected at 65, 51 and 48 kDa on Western blots (Fig. 4E). Thus, several [Fe]-hydrogenases, including an orthologue of the 51-kDa [Fe]-hydrogenase from *T. vaginalis*, are possibly expressed in *H. meleagridis*.

### 3.3. Amplification of *H. meleagridis* whole gene sequences coding for $\alpha$ -SCS and ME

Eukaryotic SCSs are multimeric enzymes located in mitochondria and hydrogenosomes. The substrate-level phosphorylation reaction catalyzed by hydrogenosomal SCSs produces ATP rather than GTP. The two kinds of organelles are also known to contain NAD(P)-dependent MEs catalysing the decarboxylation of malate to pyruvate. In *T. vaginalis*,  $\alpha$ -SCS and ME both appear as moonlighting proteins, able to switch between a metabolic function and a role in parasite adherence when associated with either the hydrogenosome or the cell surface, respectively (Alderete et al., 2001). We obtained the sequences of two *H. meleagridis* genes encoding the aforementioned enzymes, through different PCR amplification steps (Fig. 2).

For  $\alpha$ -SCS, *T. vaginalis*-specific primers (Tv3 and Tv4) were determined in two conserved amino acid regions (LIGPNCP and SGGKGTA), deduced from the alignment of various  $\alpha$ -SCSs. Corresponding PCR amplification provided a *H. meleagridis* gene region of ~ 400 bp. The 3' end of coding region was then identified by RT-PCR using an oligo-dT primer and its sequencing showed a 3' UTR only 14 nucleotides in length (Fig. 2B). The 5' end region was then determined using the primer Tv5 which was designed at the translation initiation codon of the *T. vaginalis*  $\alpha$ -scs gene (Fig. 2B). However, the PCR product size was larger than expected (~ 600 bp instead of ~ 400 bp). Sequencing of this amplicon showed a complete N-terminal coding region preceded by ~ 200 nucleotides upstream of the ATG, which indicates that the hybridization with the primer Tv5 occurred upstream of the start codon.

Amino acid sequence alignment between various protozoan and mammalian MEs of mitochondrial or hydrogenosomal origin was helpful to determine primers in the two



conserved regions RILGLGD and LSNPTVK (Fig. 2C). As for *hyd* and *α-scs*, two *T. vaginalis*-specific primers (Tv6 and Tv7) were used instead of some degenerate primers deduced from these peptides. An ~ 800-bp fragment was amplified and the lacking 3' end region was further obtained by RT-PCR using an oligo-dT primer. The 3' UTR was also highly reduced (37 nucleotides). The 5' region was subsequently amplified using the primer Tv8 designed at the start codon of the *T. vaginalis me* gene.

For both enzymes, the whole coding regions were finally amplified from *H. meleagridis* genomic DNA. One primer was designed either 183 bp upstream of the start codon of *α-scs* (Hm4) or at the start codon of *me* (Tv8). The other primer was determined at the stop codon (Hm5 and Hm8 for *α-scs* and *me*, respectively). Sequencing of PCR products confirmed the assembly of previous partial sequences and the size of each open reading frame (ORF): 927 bp for *α-scs* and 1,707 bp for *me* (Fig. 2). Similar to their *T. vaginalis* counterparts, the two *H. meleagridis* genes are intronless.

#### 3.4. Amino acid sequence analysis of Hm\_α-SCS and Hm\_ME

*Hm\_α-scs* ORF encodes a protein of 308 amino acids in length with a theoretical molecular weight of 32,243 Da and a predicted pI of 9.44. Unsurprisingly, this protein has the highest identity (81%) with the *T. vaginalis* homologue, justifying the amino acid sequence alignment of the two sequences shown in Fig. 5A. The Hm\_α-SCS protein also has significant identity (52%) with α-SCS from *Neocallimastix patriciarum*, an anaerobic fungus that contains hydrogenosomes. Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) analysis reveals the conservation of some typical signatures for α-SCS including the presence of CoA and ligase-CoA domains. The three zones which may contribute to the nucleotide-binding domain and the region surrounding the active site histidine are also present (Fig. 5A). MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>), iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>) and PSORTII (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) programs failed to predict a presequence for targeting of protein to mitochondria or mitochondria-like organelles. However, it is clear that Hm\_□-SCS possesses a very short N-terminal extension (8 amino acids) that is highly similar to those found in *T. vaginalis* hydrogenosomal proteins (Lahti et al., 1994; Alderete et al., 1995). In both species, this peptide starts with Met-Leu-Ala/Ser/Thr and has an arginine at position -2 to the putative cleavage site.

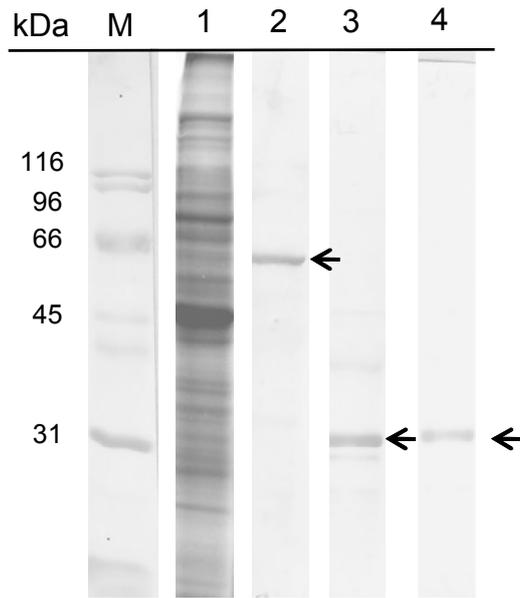


Fig. 6. Immunodetection of malic enzyme and  $\alpha$ -SCS in *H. meleagridis* proteins solubilized with 1% Nonidet P40. Lane 1: Coomassie blue-stained profile after SDS-PAGE (10%). Lane 2: Western blot showing the reactivity of anti-Hm\_ME antiserum (1:500 dilution) with a 65-kDa protein band. Lanes 3, 4: A 33-kDa protein band is recognized by anti-Hm\_ $\alpha$ -SCS antiserum (1:500 dilution, lane 3) and mAb F5.2 (1:100 dilution, lane 4). Molecular mass standards (M) are in kDa.

*Hm\_me* ORF codes for a protein of 568 amino acids in length, with a predicted molecular mass of 64,012 Da and pI of 8.25. The highest identity (77%) is found with subunit A of the hydrogenosomal *me* from *T. vaginalis* (Fig. 5B). The Hm\_ME sequence exhibits conserved residues involved in catalytic activity of malic enzymes. This is the case for the lysine residue in position 183, shown to be the key residue for catalysis (Kuo et al., 2000). Residues involved in metal-ion binding, corresponding to Glu255, Asp256 and Asp279 (Drmota et al., 1996) are also conserved (Fig. 5B). A short N-terminal extension (12 amino acids) resembling *T. vaginalis* hydrogenosomal presequences, is also present in Hm\_ME and thus appears as a putative targeting signal.

### 3.5. $\alpha$ -SCS and ME are also localized into *H. meleagridis* hydrogenosomes

Recombinant polypeptides of Hm\_ $\alpha$ -SCS and Hm\_ME were expressed in *E. coli*, affinity purified and injected into mice. The constructs corresponded to regions 129-273 for Hm\_ $\alpha$ -SCS and 165-423 for Hm\_ME (see Fig. 5). In Western blot assays with protein extracts from *H. meleagridis* cells, anti-Hm\_ME antibodies specifically recognized a band close to 65 kDa and Hm\_ $\alpha$ -SCS antibodies reacted with a 33-kDa band (Fig. 6, lanes 2 and 3). These apparent molecular weights are in agreement with the values deduced from amino acid sequences. Western blots were also realized using the mAb F5.2 directed against the epitope SEEDAAEW of *T. vaginalis*  $\alpha$ -SCS, the same epitope being present in the Hm\_ $\alpha$ -SCS sequence (see alignment Fig. 5). As expected, mAb F5.2 cross-reacts with the 33-kDa band that was stained with the mouse antisera raised against recombinant Hm\_ $\alpha$ -SCS (Fig. 6, lane 4).

IFAs were then performed to determine the localization of Hm\_ME and Hm\_ $\alpha$ -SCS proteins in *H. meleagridis* cells. The mouse antisera strongly reacted with numerous cytoplasmic granules in permeabilized parasites (Fig. 7A, E). The hydrogenosomal nature of these elements was confirmed by the observation of a similar staining pattern with mAb F5.2, known to recognize *T. vaginalis* hydrogenosomes (Fig. 7C). Given that in *T. vaginalis*,  $\alpha$ -SCS and ME may play a supplementary function as AP33 and AP65 adhesins, respectively, we also evaluated the potential of both proteins to be localized at the cell surface of *H. meleagridis*. When using non-permeabilized parasites (aldehyde fixation) for IFA, the anti-

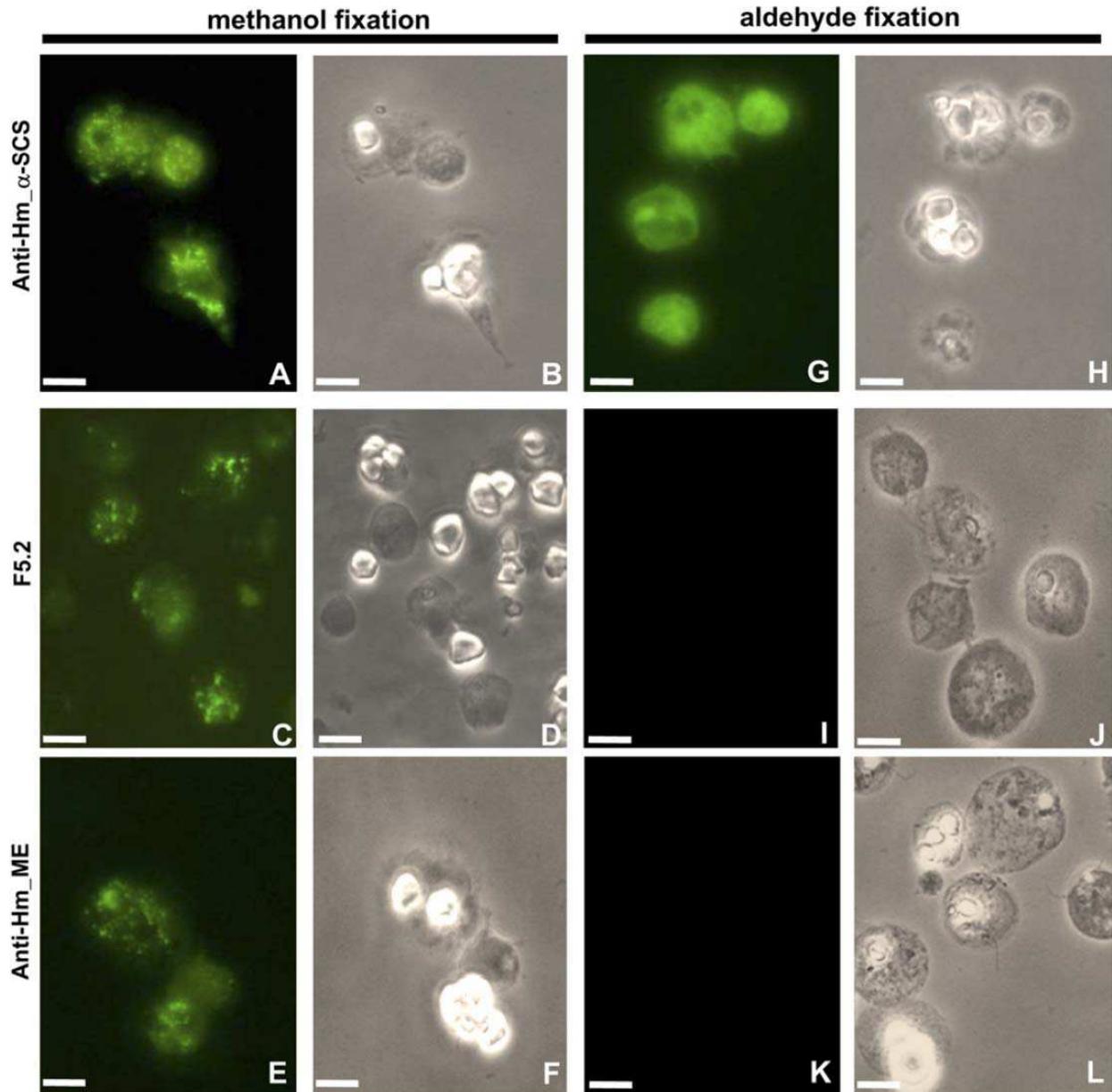


Fig. 7. Immunofluorescence assays with mouse antisera (anti-Hm $_{\alpha}$ -SCS, anti-Hm $_{ME}$ ) and mAb F5.2 applied to either permeabilized *H. meleagridis* cells after methanol fixation (A, C and E) or non-permeabilized *H. meleagridis* cells fixed with aldehydes (G, I and K). Fluorescent signals provided by anti-Hm $_{\alpha}$ -SCS are detected intracellularly in permeabilized parasites (A) and on the cell surface of non-permeabilized parasites (G). The mAb F5.2 specific of *T. vaginalis* hydrogenosomal  $\alpha$ -SCS reacts with cytoplasmic granules of *H. meleagridis* (C), not with its cell surface (I). This mAb has been previously shown to only stain the hydrogenosomes in *T. vaginalis* (Alderete, personal data). The anti-Hm $_{ME}$  antiserum also stains *H. meleagridis* granules (E) and offers no signal with non-permeabilized cells (K). Brightfield photomicrographs of the same fields accompany the fluorescence pictures (B, D, F, H, J, L). Anti-Hm $_{ME}$  and Anti-Hm $_{\alpha}$ -SCS antisera were used at a 1:100 dilution. Secondary antibody was Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000 dilution). Bars, 15  $\mu$ m.

Hm $_{\alpha}$ -SCS antiserum stained the cell surface (Fig. 7G), suggesting a dual localization for  $\alpha$ -SCS. In contrast, no fluorescence signal was detected with anti-Hm $_{ME}$  antisera (Fig. 7K).

A hydrogenosome-enriched fraction was prepared by differential centrifugation of *H. meleagridis* cell homogenate according to the protocol described for *T. vaginalis* (Drmota et al., 1996). TEM observations confirmed the preponderance of membrane-bound ovoid structures viewed as hydrogenosomes (Fig. 8A). A partial extraction of electron-dense matrix contents occurred during organelle isolation and allowed a better visualization of the two limiting membranes (Fig. 8B). Hm $_{\alpha}$ -SCS and Hm $_{ME}$  proteins were present in the considered subcellular fraction, as shown after SDS-PAGE and Western blotting with corresponding antisera or with mAb F5.2 (Fig. 8C).

#### 4. Discussion

Mitochondrion-related remnant organelles have been reported in several unicellular eukaryotes that live in microaerophilic or anaerobic environments and are distributed among diverse lineages. All these organelles are unable to perform oxidative phosphorylation and are currently assigned to two main categories: (i) the hydrogenosomes, found in trichomonads, anaerobic chytridiomycete fungi and several taxa of anaerobic ciliates, and (ii) the mitosomes, revealed in diplomonads, entamoebids, pelobionts and microsporidia (reviews: Müller, 1993; Dyall and Johnson, 2000; Williams and Keeling, 2003; van der Giezen and Tovar, 2005; Hackstein and Yarleth, 2006; Embley and Martin, 2006). Hydrogenosomes can generate ATP via some substrate-level phosphorylations and excrete molecular hydrogen, which is not the case with mitosomes. However, the hydrogenosome-mitosome subdivision may be an oversimplification. Multiple adaptations to anaerobic environments may justify some functional diversity of mitochondria-related organelles, as exemplified by the unusual case of *Cryptosporidium parvum* (Putignani et al., 2004; Henriquez et al., 2005).

Most advances in the knowledge of trichomonad hydrogenosomes were derived from studies in *T. vaginalis*. In addition to their central role in terminal reactions of carbohydrate metabolism and ATP production, the hydrogenosomes of this human pathogen are involved in iron-sulfur cluster biosynthesis (Sutak et al., 2004) and serine-glycine interconversion (Mukherjee et al., 2006), two metabolic pathways shared with mitochondria. Moreover, bioinformatics analysis of the recently determined *T. vaginalis* genome sequence suggests

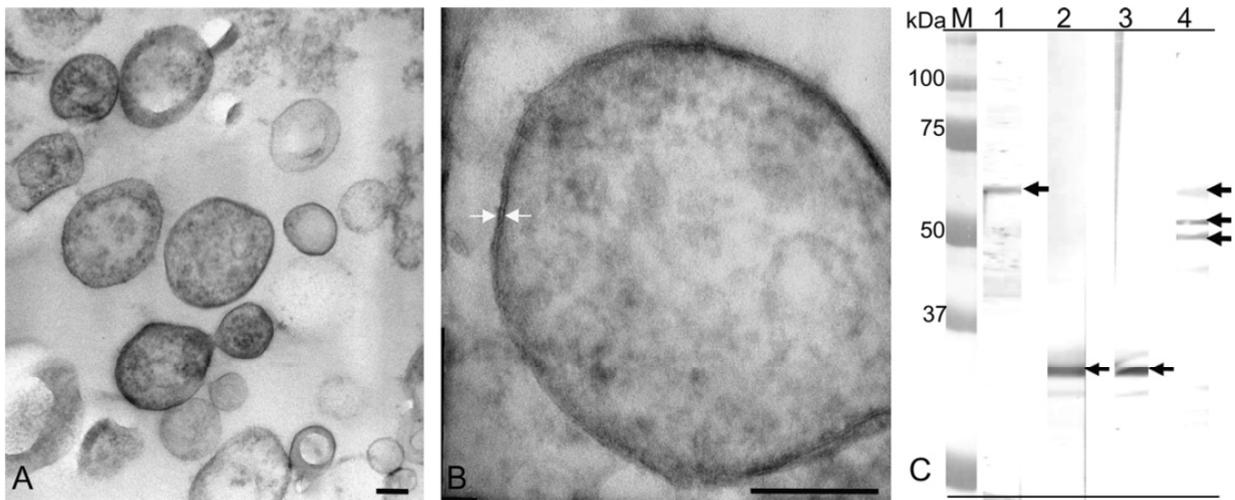


Fig. 8. Analysis of a subcellular fraction enriched in *H. meleagridis* hydrogenosomes. (A-B) TEM appearance of the isolated organelles. A high magnification reveals that the hydrogenosome is bounded by two closely adjacent membranes (B, arrows). Bars, 100 nm. (C) Immunodetection of Hm\_ME and Hm\_α-SCS. After solubilization in the presence of 2.5% SDS and 100 mM DTT, proteins of the hydrogenosome-enriched fraction were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred onto PVDF membranes. Protein bands that are stained with anti-Hm\_ME (lane 1), anti-Hm\_α-SCS (lane 2), mAb F5.2 (lane 3) and anti-Hm\_HYD (lane 4) are indicated by arrows. Molecular mass standards (M) are in kDa.

new functions for the hydrogenosome (Carlton et al., 2007). Although harbouring only one flagellum, *H. meleagridis* is also viewed as a trichomonad. In contrast with *T. vaginalis*, there has been little investigation of this bird parasite at the molecular level, as indicated by the availability of only 18S and 5.8S rRNA gene sequences in databases. Therefore, we believe the present study represents the first contribution to the identification of *Histomonas* protein-coding genes required for hydrogenosomal carbon metabolism. *Histomonas meleagridis* electron-dense bodies correspond to true hydrogenosomes. This is supported by the following data: (i) successful PCR-amplification of *H. meleagridis* gene fragments based on the use of primers specifically derived from *T. vaginalis* genes encoding three hydrogenosomal enzymes, (ii) strong sequence conservation of the C-terminal domain obtained for a [Fe]-hydrogenase, (iii) prediction of short N-terminal leader sequences (8-12 amino acids) in the other two enzymes considered (Hm\_α-SCS and Hm\_ME), as known for *Trichomonas* hydrogenosomal proteins (Häusler et al., 1997), (iv) IFA and ultracytochemical evidence for the localization of Hm\_HYD within *H. meleagridis* cytoplasmic granules, and (v) localization of Hm\_α-SCS and Hm\_ME in the same granules, as documented by IFA and Western blotting after organelle isolation.

Hydrogenases are a vast ensemble of prokaryotic and eukaryotic enzymes that catalyze the reversible oxidation of molecular hydrogen and are distributed into three major classes: [Fe]-hydrogenases, [Ni-Fe]-hydrogenases and metal-free hydrogenases (Vignais et al., 2001). In *T. vaginalis*, two closely related [Fe]-hydrogenases (TvhydA and TvhydB with respective sizes of 51.5 and 50 kDa) were initially identified and shown to be localized in hydrogenosomes (Bui and Johnson, 1996). Anti-TvhydA polyclonal antibodies reacted with both proteins co-migrating as a single 50-kDa band in blots of whole cell extracts and purified hydrogenosomes. A *T. vaginalis* gene encoding a potential 64-kDa [Fe]-hydrogenase characterized by a longer N-terminal domain (clostridial-type), was reported by other authors (Horner et al., 2000). The targeting of this protein to hydrogenosomes is supported by the prediction of an N-terminal peptide similar to known hydrogenosomal-type presequences. It should also be noted that the draft genome sequence of *T. vaginalis* indicates the presence of different genes encoding four [Fe]-hydrogenase families (Carlton et al., 2007). There is no doubt that the partial hydrogenase sequence obtained in *H. meleagridis* is representative of a C-terminal region specific to [Fe]-hydrogenases. This sequence matches a large segment of



the [Fe]-hydrogenase active site (H-cluster domain). Conserved cysteine residues should serve as ligands for a [Fe-Fe] center linked to a [4Fe-4S] cluster (Vignais et al., 2001). The N-terminal region of Hm\_HYD is expected to contain accessory domains for the binding of additional [4Fe-4S] clusters. As anti-Hm\_HYD antisera are strongly reactive with protein bands at 48, 51 and 65 kDa, it may be hypothesized that *H. meleagridis* [Fe]-hydrogenases exist as “short” and “long” forms similar to those of *T. vaginalis*.

Among eukaryotic organisms, both ME and SCS may be compartmentalized in ATP-producing organelles such as mitochondria and hydrogenosomes. These enzymes are frequently encoded by multigene families, as is the case in *T. vaginalis* (Alderete et al., 1995; Engbring and Alderete, 1998). Sequencing of PCR amplification products from *H. meleagridis* DNA indicated the presence of multiple clones with minor variations for both enzymes (not shown). Although multicopy genes made our strategy highly time-consuming, we succeeded in the identification of two complete *H. meleagridis* gene sequences.

With regard to MEs, it is noteworthy that *T. vaginalis* displays two distinct forms assigned to different families: (i) a cytosolic enzyme that is a dimer of 42-kDa subunits with a strict specificity for NADP<sup>+</sup>, as in prokaryotes, and (ii) a larger hydrogenosomal enzyme existing as a tetramer of four 60-kDa subunits that preferentially uses NAD<sup>+</sup> to NADP<sup>+</sup> and is closely related to MEs found in mitochondria and plastids as well as in the cytosol of eukaryotes (Dolezal et al., 2004). The Hm\_ME sequence corresponds to a large-subunit size (65 kDa) and is highly similar to the *T. vaginalis* hydrogenosomal ME subunit A. The protein appears to be strictly localized in *H. meleagridis* hydrogenosomes, as expected from the presence of a potential targeting signal and the lack of a signature residue (Lys 362 ) for NADP<sup>+</sup> specificity (Kuo et al., 2000; Dolezal et al., 2004). Thus, it seems likely that Hm\_ME preferentially mediates the oxidative decarboxylation of malate to provide pyruvate as a substrate for a putative pyruvate:ferredoxin oxidoreductase inside the hydrogenosome.

The tricarboxylic acid cycle in aerobic mitochondria comprises one substrate-level phosphorylation step catalyzed by SCS, a multimeric enzyme composed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. A similar step has been conserved in trichomonad hydrogenosomes. In *T. vaginalis*, the conversion of succinyl-CoA to succinate and coenzyme A with ATP formation is mediated by a tetrameric  $\alpha_2\beta_2$  enzyme and is typically coupled with the reaction catalyzed by an acetylCoA transferase (Lahti et al., 1992; 1994). Hm\_ $\alpha$ -SCS shares the highest sequence



identity with the *T. vaginalis* homologue and contains a candidate presequence for targeting the protein to hydrogenosomes. Such localization was proven through IFA observations on whole parasites and Western blot detection in the hydrogenosome-enriched fraction. That SCS may be located on the surface of *H. meleagridis* cells was not unexpected, due to similar data about some *T. vaginalis* proteins involved in cytoadherence. The sequences of three *T. vaginalis* adhesins, named AP65, AP51 and AP33, corresponded to hydrogenosomal ME, beta and alpha SCS subunits, respectively (Arroyo et al., 1992; Alderete et al., 1995, 1998; O'Brien et al., 1996; Addis et al., 1997; Engbring and Alderete, 1998). Such adhesins may be released into the extracellular environment (Addis et al., 1997). Their expression on the *Trichomonas* cell surface was thoroughly demonstrated to be stimulated under high-iron growth conditions or upon contact with vaginal epithelial cells (Garcia et al., 2003). In the same study, two-dimensional electrophoresis data confirmed the correspondence between adhesins from surface-labelled parasites and proteins from purified hydrogenosomes. It is therefore possible that SCS may play a role in the adherence of *H. meleagridis*.

In further investigations on *Histomonas* hydrogenosomal proteins, we expected to obtain whole sequences of [Fe]-hydrogenases with the help of 5' RACE PCR experiments. Within the context of *Histomonas* cell differentiation and host-parasite interactions, anti-Hm\_ME and anti-Hm\_SCS antibodies may be useful for comparative immunolocalisation studies on flagellate and amoeboid stages, as an initial approach to the evaluation of developmentally regulated changes in the amount of putative adhesins.

### **Acknowledgments**

M. M. was supported by a grant from the Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT) and by AGORAGER2 S.A.R.L. We are grateful to Lionel Zenner (UMR INRA/DGER 958, Ecole Nationale Vétérinaire, Lyon, France) for kindly providing the *H. meleagridis* strain (HmZL). We particularly thank G. Méténier for his assistance in the drafting of this manuscript and A. Guedon for technical assistance.



## References

- Addis, M.F., Rappelli, P., Cappuccinelli, P., Fiori, P.L., 1997. Extracellular release by *Trichomonas vaginalis* of a NADP<sup>+</sup> dependent malic enzyme involved in pathogenicity. *Microb. Pathog.* 23, 55-61.
- Alderete, J.F., O'Brien, J.L., Arroyo, R., Engbring, J.A., Musatovova, O., Lopez, O., Lauriano, C., Nguyen, J., 1995. Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 17, 69-83.
- Alderete, J.F., Engbring, J., Lauriano, C.M., O'Brien, J.L., 1998. Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microb. Pathog.* 24, 1-16.
- Alderete, J.F., Millsap, K.W., Lehker, M.W., Benchimol, M., 2001. Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell. Microbiol.* 3, 359-370.
- Arroyo, R., Engbring, J., Alderete, J.F., 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol.* 6, 853-62.
- Bishop, A., 1938. *Histomonas meleagridis* in domestic fowls (*Gallus gallus*). Cultivation and experimental infection. *Parasitology* 30, 181-194.
- Bui, E.T., Johnson, P.J., 1996. Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 305-10.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C.J., Dacks, J.B., Foster, P.G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., Westrop, G.D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P.L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F.D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M.T., Hayes, R.D., Mukherjee, M., Okumura, C.Y., Schneider, R., Smith, A.J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B.J., Perteza, M., Feldblyum, T.V., Utterback, T.R., Shu, C.L., Osoegawa, K., De Jong, P.J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S.B., Logsdon, J.M. Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C.C., Dunne, R.L., Upcroft, J.A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S.L., Tang, P., Chiu, C.H., Lee, Y.S., Embley, T.M., Coombs, G.H., Mottram, J.C., Tachezy, J.,



- Fraser-Liggett, C.M., Johnson, P.J., 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 12, 207-212.
- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 73, 203-66.
- Dolezal, P., Vanacova, S., Tachezy, J., Hrdý, I., 2004. Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. *Gene* 31, 81-92.
- Drmotá, T., Proost, P., Van Ranst, M., Weyda, F., Kulda, J., Tachezy, J., 1996. Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 221-234.
- Dwyer, D.M., 1970. An improved method for cultivating *Histomonas meleagridis*. *J. Parasitol.* 56, 191-192.
- Dyall, S.D., Johnson, P.J., 2000. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 404-11.
- Embley, T.M., Martin, W., 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440, 623-630.
- Engbring, J.A., Alderete, J.F., 1998. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology* 144, 3011-3018.
- Garcia, A.F., Chang, T.H., Benchimol, M., Klumpp, D.J., Lehker, M.W., Alderete, J.F., 2003. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol.* 47, 207-224.
- Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Noel, C., Zenner, L., Wintjens, R., Delgado-Viscogliosi, P., Holder, M.E., Sogin, M.L., Viscogliosi, E., 2001. Phylogenetic position of the trichomonad parasite of turkeys, *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequence. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 498-504.
- Graybill, H.W., Smith, T., 1920. Production of fatal blackhead in turkeys by feeding embryonated eggs of *Heterakis papillosa*. *J. Exp. Med.* 31, 647-655.
- Hackstein, J.H., Yarlett, N., 2006. Hydrogenosomes and symbiosis. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 41, 117-42.
- Häusler, T., Stierhof, Y.D., Blattner, J., Clayton, C., 1997. Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-



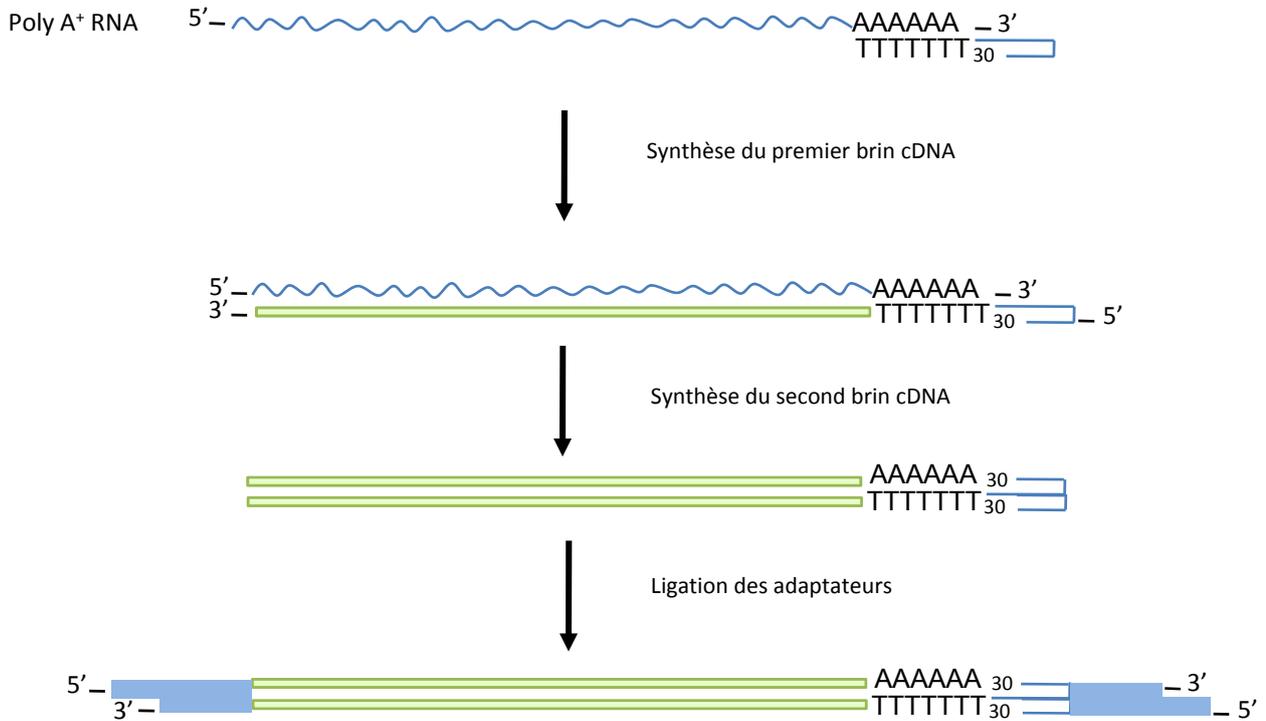
- branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. Eur. J. Cell. Biol. 73, 240-251.
- Henriquez, F.L., Richards, T.A., Roberts, F., McLeod, R., Roberts, C.W., 2005. The unusual mitochondrial compartment of *Cryptosporidium parvum*. Trends Parasitol. 21, 68-74.
- Horner, D.S., Foster, P.G., Embley, T.M., 2000. Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. Mol. Biol. Evol. 17, 1695-1709.
- Hrdý, I., Cammack, R., Stopka, P., Kulda, J., Tachezy, J., 2005. Alternative pathway of metronidazole activation in *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 5033-5036.
- Hu, J., McDougald, L.R., 2003. Direct lateral transmission of *Histomonas meleagridis* in turkeys. Avian Dis. 47, 489-492.
- Jenkins, T.M., Gorrell T.E., Müller M., Weitzman P.D., 1991. Hydrogenosomal succinate thiokinase in *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 892-896.
- Kuo, C.C., Tsai, L.C., Chin, T.Y., Chang, G.G., Chou, W.Y., 2000. Lysine residues 162 and 340 are involved in the catalysis and coenzyme binding of NADP(+)-dependent malic enzyme from pigeon. Biochem. Biophys. Res. Commun. 270, 821-825.
- Lahti, C.J., d'Oliveira, C.E., Johnson, P.J., 1992. Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. J. Bacteriol. 174, 6822-30.
- Lahti, C.J., Bradley, P.J., Johnson, P.J., 1994. Molecular characterization of the  $\alpha$ -subunit *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. Mol. Biochem. Parasitol. 66, 309-318.
- Lindmark, D.G., Müller, M., 1973. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. J. Biol. Chem. 248, 7724-7728.
- Lindmark, D.G., Müller, M., Shio, H., 1975. Hydrogenosome in *Trichomonas vaginalis*. J. Parasitol. 63, 552-554.
- Lund, E.E., Augustine, P.C., Chute, A.M., 1967. *Histomonas meleagridis* after one thousand *in vitro* passages. J. Protozool. 14, 349-351.
- Lund, E.E., 1969. Histomoniasis. Adv. vet. Sci. comp. Med. 13, 355-390.



- McDougald, L.R., 2003. Other protozoan diseases of the intestinal tract-histomoniasis (blackhead). In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, L.R., McDougald L.R., Swayne, D.E., (Eds.), Diseases of Poultry. Iowa State University press, Ames, IA, pp.1001-1006.
- McDougald, L.R., Jinghui, H., 2004. The efficacy of some drugs with known antiprotozoal activity against *Histomonas meleagridis* in chickens. Vet. Parasitol. 121, 233-238.
- McDougald, L.R., 2005. Blackhead Disease (Histomoniasis) in Poultry: A Critical review. Avian Dis. 49, 462-476.
- McGuire, W.C., Moeller, M.W., Morehouse, N.F., 1964. The effect of dimetridazole on the growth and prevention of histomoniasis in poultry. Poult. Sci. 43, 864-871.
- Moreno-Brito, V., Yanez-Gomez, C., Meza-Cervantez, P., Avila-Gonzalez, L., Rodriguez, M.A., Ortega-Lopez, J., Gonzalez-Robles, A., Arroyo, R., 2005. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. Cell. Microbiol. 7, 245-258.
- Mukherjee, M., Brown, M.T., McArthur, A.G., Johnson, P.J., 2006. Proteins of the glycine decarboxylase complex in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. Eukaryot. Cell 5, 2062-71.
- Müller, M., 1993. The hydrogenosome. J. Gen. Microbiol. 139, 2879-2889.
- O'Brien, J.L., Lauriano, C.M., Alderete, J.F., 1996. Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*. Microb. Pathog. 20, 335-49.
- Putignani, L., Tait, A., Smith, H.V., Horner, D., Tovar, J., Tetley, L., Wastling, J.M., 2004. Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. Parasitology 129, 1-18.
- Rybicka, K., Honigberg, B.M., Holt, S.C., 1972. Fine structure of the mastigont system in culture forms of *Histomonas meleagridis* (Smith). Protistologica 1, 107-120.
- Schuster, F.L., 1968. Ultrastructure of *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, a parasitic amebo-flagellate. J. Parasitol. 54, 725-737.
- Sutak, R., Dolezal, P., Fiumera, H.L., Hrdy, I., Dancis, A., Delgadillo-Correa, M., Johnson, P.J., Muller, M., Tachezy, J., 2004. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the



- hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 28, 10368-10373.
- Tyzzer, E.E., 1924. The chicken has a carrier of *Histomonas meleagridis* (Blackhead): the protozoon in its flagellated state. J. Med. Res. 44, 676-678.
- van der Giezen, M., Tovar, J., 2005. Degenerate mitochondria. EMBO Rep. 6, 525-30.
- Vignais, P.M., Billoud, B., Meyer, J., 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. FEMS Microbiol. Rev. 25, 455-501.
- Williams, B.A., Keeling, P.J., 2003. Cryptic organelles in parasitic protists and fungi. Adv. Parasitol. 54, 9-68.



**Figure 9 – Principe de la synthèse des ADNc doubles brins.** Après extraction des ARN totaux, le premier brin cDNA est synthétisé en utilisant une amorce oligo-dT, puis le deuxième brin est synthétisé selon la méthode de Gubler et Hoffmann (1983). Des adaptateurs (en bleu) sont ajoutés par ligation avec la T4 DNA ligase à chaque extrémité de la séquence (Marathon cDNA Amplification Kit - Clontech Laboratories).

## **Caractérisation par RACE-PCR de la partie 5' du gène codant pour une hydrogénase à fer chez *H. meleagridis***

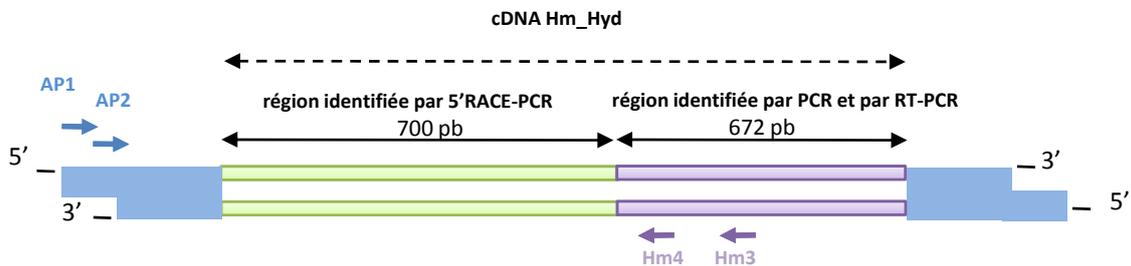
Le travail publié dans la revue « International Journal for Parasitology » nous avait permis d'identifier deux gènes complets chez *H. meleagridis* codant une enzyme malique et l' $\alpha$ -SCS mais uniquement une séquence partielle d'un gène codant pour la partie C-terminale d'une hydrogénase à fer. Cette partie correspond aux 223 derniers acides aminés de la protéine et possède 62% d'identité avec une hydrogénase à fer de 51 kDa de *T. vaginalis*.

Afin de déterminer la partie 5' du gène, nous avons choisi une technique de 5'-RACE PCR. Nous avons ainsi pu amplifier 700 pb en amont de la région précédemment identifiée.

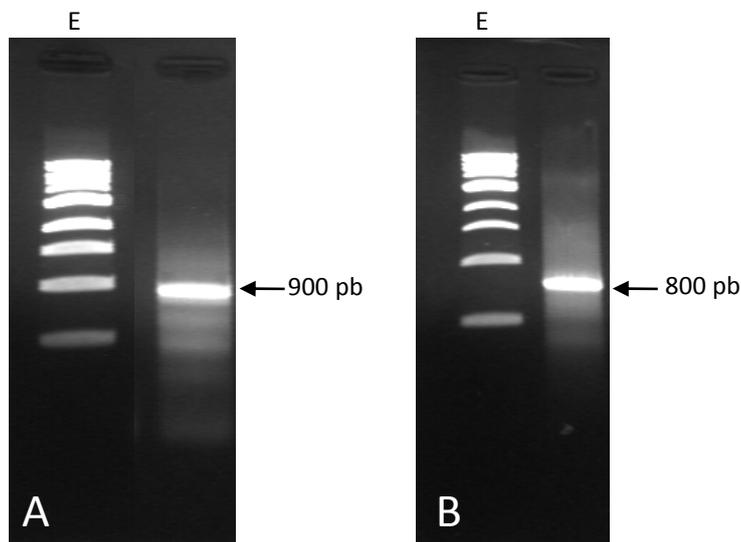
### **Matériels et méthodes**

#### **Extraction des ARNs, synthèse des ADNc double brin et ligation des adaptateurs (figure 9)**

Les ARN totaux sont extraits avec du TRI Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Inc) à partir de  $2.10^7$  parasites prélevés après 72h de culture. La synthèse des ADNc double brins est réalisée à l'aide du kit Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories) selon les recommandations du fournisseur. 2  $\mu$ g d'ARN totaux, mis en présence d'une amorce oligo-dT, à une concentration finale de 1 $\mu$ M, sont incubés 2 min à 70°C puis 5 min dans la glace. La réaction de transcription inverse est effectuée à 42°C pendant une heure après addition de 15U de Reverse transcriptase AMV (Clontech Laboratories) et de dNTP (2 mM). La synthèse du second brin cDNA est ensuite réalisée selon la méthode de Gubler et Hoffmann en présence d'un cocktail enzymatique (Clontech Laboratories) contenant de la RNase H, la DNA polymérase d'*E. coli* et la DNA ligase d'*E. coli*. 10  $\mu$ L de la réaction de synthèse du premier brin sont utilisés pour cette synthèse. Le mélange réactionnel est incubé à 16°C pendant 1 h30 min. Des adaptateurs sont rajoutés de chaque côté de l'ADNc double brin nouvellement synthétisé grâce à une T4 DNA ligase (400U) à 16°C pendant une nuit.



**Figure 10- Identification de la partie 5' du gène *Hm\_Hyd* par 5'RACE-PCR.** La région identifiée par PCR et par RT-PCR de 672 pb est représentée en violet, la région identifiée par 5'RACE-PCR de 700 pb est représentée en vert. Les amorces Hm3 (5'-ACCAGAGCCACAGAAAATAGCACCG-5') et Hm4 (5'- AGTCGGTTTCCTTGAAGCCTTTGGT-3') sont choisies sur la région codante du gène *Hm\_Hyd* déjà identifiée. Les amorces AP1 (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3') et AP2 (5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3') (Adaptator Primer 1 et 2) sont situées sur l'adaptateur. La première PCR est réalisée avec les amorces AP1 et Hm3 puis une nested-PCR est effectuée sur le premier produit d'amplification avec les amorces AP2 et Hm4.



**Figure 11 – Profils électrophorétiques obtenus après migration sur gel d'agarose 1% de la PCR réalisée avec les amorces AP1 et Hm3 (A) et de la nested-PCR réalisée avec les amorces AP2 et Hm4 (B).** (E: échelle, 1Kb DNA ladder, Promega).

## 5' RACE-PCR

Les réactions PCR sont réalisées en utilisant 5 µL de l'ADNc double brin dilué au 1/250<sup>e</sup>, l'amorce anti-sens spécifique de la séquence d'*H. meleagridis* Hm3 (5'-ACCAGAGCCACAGAAAATAGCACCG-3') et l'amorce AP1 (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3') spécifique de l'adaptateur (figure 10). Une nested PCR est ensuite effectuée à partir de 1µL du premier produit d'amplification dilué au 1/10<sup>e</sup> en utilisant l'amorce Hm4 (5'-AGTCGGTTTCCTTGAAGCCTTTGGT-3') et l'amorce AP2 (5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3') (figure 10). Les deux réactions d'amplification sont réalisées selon les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pendant 3 min, 30 cycles comportant une étape de dénaturation à 94°C pendant 30s, une hybridation à 52°C pour la première PCR, 54°C pour la deuxième, pendant 30s et une étape d'élongation à 72°C pendant une minute. Après une élongation finale de 10 min, les produits d'amplification sont analysés sur gels d'agarose 1%, visualisés sous UV après coloration au bromure d'éthidium (0,4µg/mL), découpés et purifiés sur colonne (Qiakit gel extraction QIAGEN). Les produits PCR sont ensuite clonés dans le vecteur pGemT-Easy (Promega) puis séquencés.

## Résultats

La première PCR réalisée avec une amorce de l'adaptateur (AP1) et une amorce spécifique de la séquence d'*H. meleagridis* (Hm3) a permis d'amplifier un fragment d'environ 900 pb. Une nested-PCR a été ensuite réalisée sur ce premier produit d'amplification, avec les amorces AP2 et Hm4, et a permis d'amplifier un fragment de 800 pb (figure 11). Après séquençage et assemblage des séquences, nous avons ainsi obtenu 700 pb supplémentaires en amont de la séquence du gène de l'hydrogénase à fer précédemment identifiée (figure 10).

La séquence protéique de l'hydrogénase à fer identifiée possède 58% d'identité avec la séquence protéique de l'hydrogénase à fer de *T. vaginalis* de 51 kDa (figure 12). La partie N-terminale de la protéine contient les régions conservées du cluster F ([4Fe-4S]-ferrédoxine-like cluster) retrouvés chez toutes les hydrogénase à fer de *T. vaginalis*. Ce cluster est composé de motifs riches en cystéine (CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>C). Ces cystéines interviendraient dans la liaison avec les protéines fer-soufre. La partie C-terminale de la protéine contient le domaine intervenant dans l'activité catalytique de l'enzyme, le cluster H (Hydrogène), possédant les 5



cystéines conservées chez *T. vaginalis* et qui interviennent dans la liaison aux cofacteurs fer-soufre. En plus de ces résidus cystéines conservés, la protéine possède des méthionines en position 232 et 390 qui sont retrouvées chez toutes les hydrogénases à fer et qui seraient responsables de la liaison de l'enzyme avec le fer (Adams, 1990). Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir la séquence codante entière du gène probablement en raison d'ARNm tronqués. Au vu des résultats obtenus en Western-blot présentés dans la publication et au vu de l'alignement de la séquence protéique avec l'hydrogénase à fer de 51 kDa de *T. vaginalis*, il semblerait qu'il ne manque que quelques acides aminés correspondant à la préséquence de la protéine.



# Chapitre III

**PREMIERE APPROCHE DE GENETIQUE FONCTIONNELLE CHEZ  
*HISTOMONAS MELEAGRIDIS* PAR LA TECHNIQUE DE L'ARN INTERFERENCE**

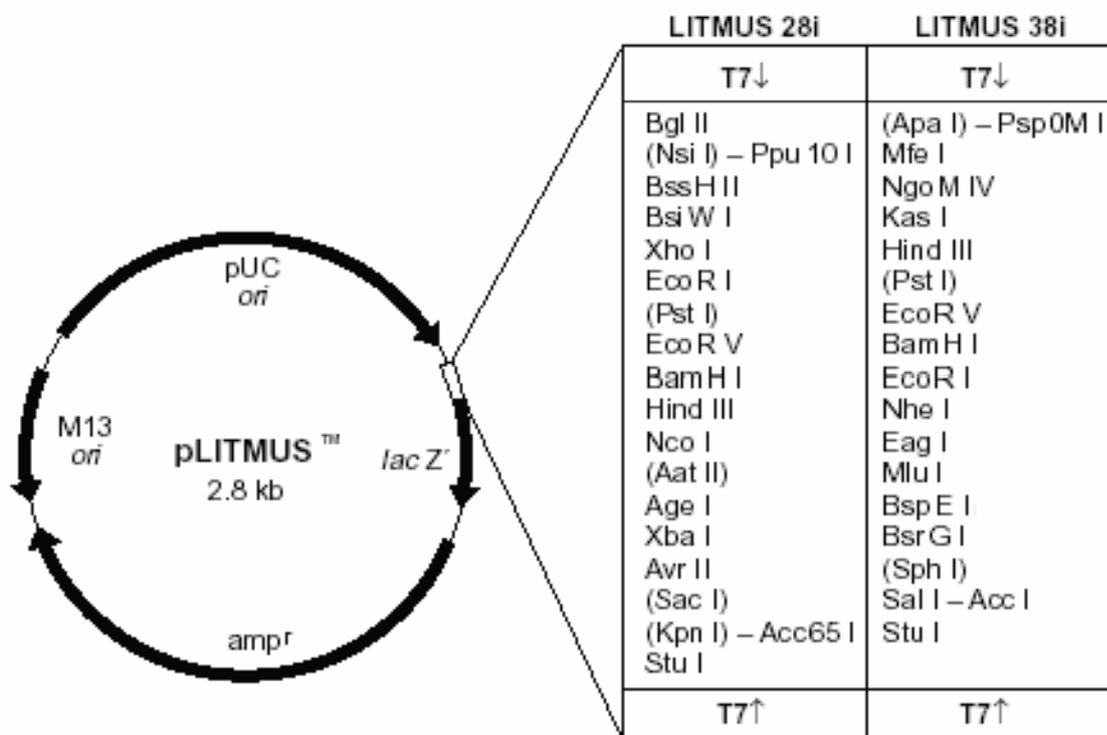


### III- PREMIERE APPROCHE DE GENETIQUE FONCTIONNELLE CHEZ *HISTOMONAS MELEAGRIDIS* PAR LA TECHNIQUE DE L'ARN INTERFERENCE

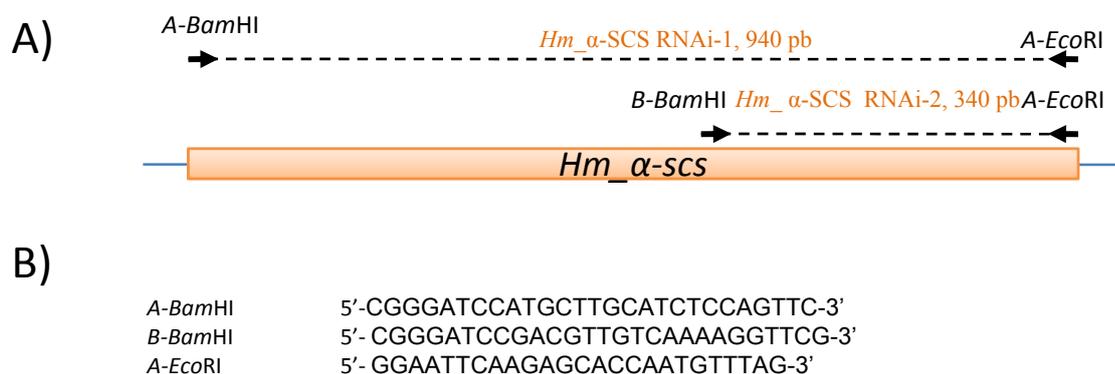
Le phénomène d'interférence ARN (RNAi), découvert chez le nématode *Caenorhabditis elegans* désigne l'inhibition post-transcriptionnelle de gènes induite par de l'ARN double brin (Fire et al, 1998). A l'origine, il constitue un mécanisme de défense contre les ARN double brin d'origine hétérologue ou virale et permet également de contrôler l'abondance des transcrits de transposons. Il est désormais un outil d'une grande valeur pour analyser la fonction de gènes dans de nombreux organismes eucaryotes. En effet, cet outil, va permettre de sous-réguler l'expression d'un gène (knock-down), par l'utilisation d'un ARN double brin qui va diriger la dégradation spécifique des transcrits cellulaires homologues. L'avantage de cette approche knock-down est qu'elle permet de passer outre un phénotype létal car une inhibition de 100% est rarement atteinte (Ullu et al., 2004).

Dans le but d'étudier la fonction précise des trois enzymes hydrogénosomales identifiées, nous avons donc entrepris de mettre en place une technique d'ARN interférence chez *H. meleagridis*.

Ayant observé que le parasite était capable d'ingérer des bactéries, nous avons choisi la méthode du « feeding » qui consiste à faire ingérer par l'organisme une souche bactérienne d'*E. coli* exprimant des ARN double brin capables d'inhiber l'expression d'un gène spécifique. Cette méthode a été mise en place chez le ver *C. elegans* (Timmons et Fire, 1998 ; Kamath et al., 2001) ainsi que chez un autre organisme, le protozoaire cilié du genre *Paramecium* (Galvani et Sperling, 2002).



**Figure 1- Carte du vecteur Litmus 28i** (d'après les informations de Biolabs, <http://www.neb.com/nebecomm>). Ce vecteur est utilisé pour la synthèse des ARN double brin. Il possède une origine de répliation pUC, une origine de répliation M13, un marqueur de sélection à l'ampicilline et des promoteurs T7 de part et d'autre du site de clonage.



**Figure 2- Représentation schématique des 2 régions du gène Hm\_α-scs amplifiés par PCR et clonés dans le vecteur Litmus (A) et séquences des amorces utilisées (B).**

## Matériels et méthodes

### **Construction des vecteurs**

Deux vecteurs ont été construits à partir du plasmide Litmus 28i (figure 1). Ce vecteur contient deux promoteurs T7 de part et d'autre du site multiple de clonage qui permettront la synthèse de l'ARN double brin.

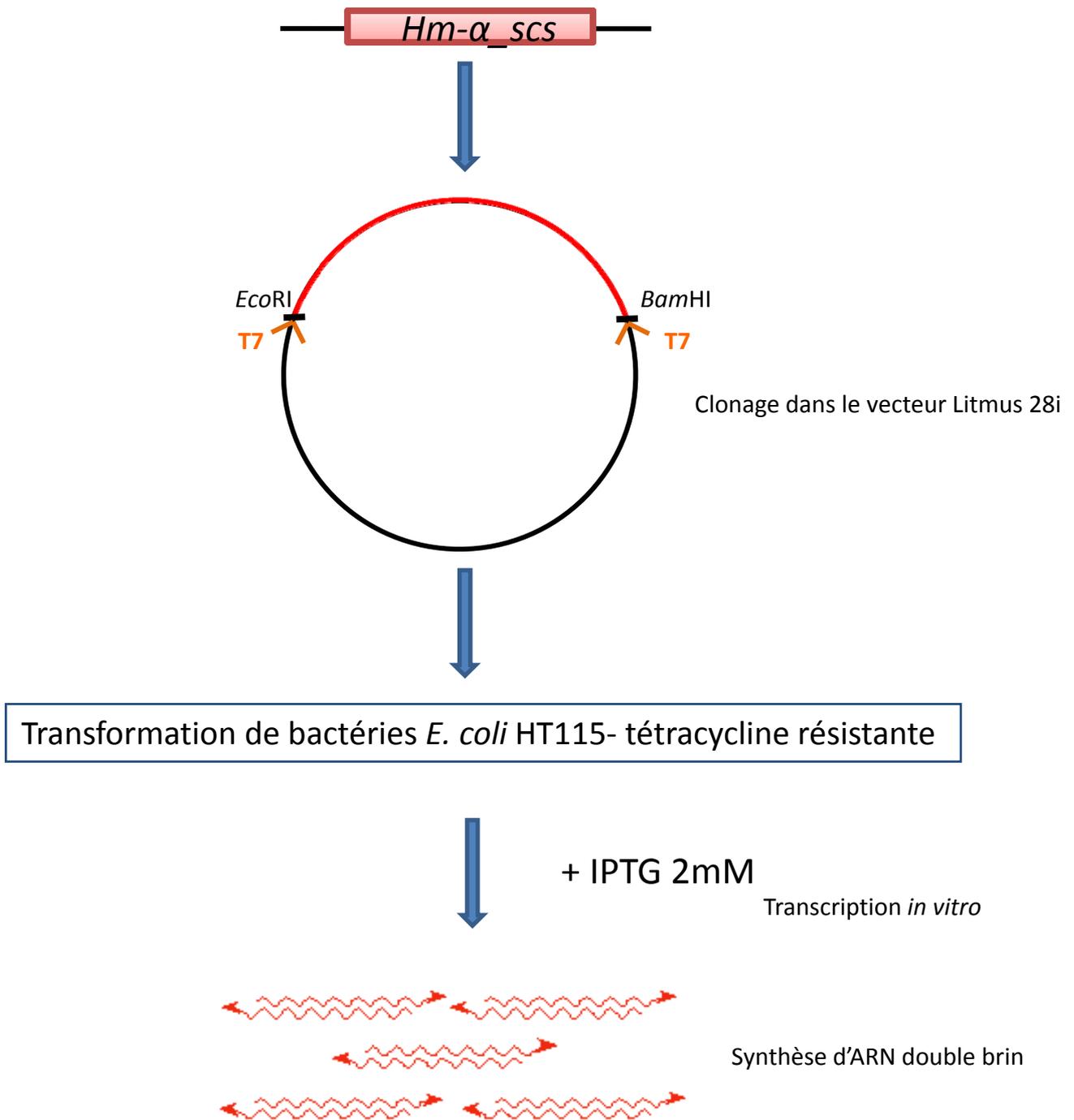
Nous avons réalisé deux constructions pour le gène codant la protéine Hm $\alpha$ -SCS. La première construction correspond à la séquence codante entière du gène *Hm $\alpha$ -scs* et la deuxième construction correspond à la partie codant la région C-terminal de la protéine. Ces deux régions ont tout d'abord été amplifiées par PCR (figure 2) à l'aide d'amorces contenant les sites de restriction *EcoRI* ou *BamHI* à leur extrémité. Les deux amplifiats ont ensuite été clonés dans le vecteur PGemT-easy Vector System I (Promega), puis les clones recombinants ont été séquencés avec le kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman-Coulter) à l'aide du séquenceur CEQ<sup>TM</sup> 2000 Beckman.

Après digestion par les enzymes *EcoRI* et *BamHI*, chaque produit PCR (Litmus-*Hm*\_RNAi-1 et Litmus-*Hm*\_RNAi-2) a été cloné dans le vecteur Litmus 28i préalablement digéré par les deux mêmes enzymes.

### **ARNi par feeding**

La synthèse des ARN double brin est réalisée chez la souche *E. coli* HT115 sur milieu sélectif approprié (LB-ampicilline 100  $\mu$ g/mL- tétracycline 12,5  $\mu$ g/mL) (figure 3). La souche *E. coli* HT115 est une souche généralement utilisée pour des stratégies d'ARNi par « feeding » chez le ver *C. elegans* et chez la paramécie car elle possède une T7 polymérase inductible à l'IPTG mais aussi une délétion dans le gène codant pour la RNase III ce qui va limiter la dégradation des ARN nouvellement synthétisés.

Lorsque la DO<sub>600nm</sub> atteint 0,4, la synthèse des ARN double brin est induite par ajout d'IPTG 2mM. Trois heures après induction, les bactéries sont centrifugées et resuspendues dans du PBS. Elles sont ensuite ajoutées dans le milieu de culture contenant des parasites à 48h et 72h après repiquage. D'autres essais consistent à réaliser une induction continue de la synthèse des ARN double brin par ajout d'IPTG 2mM dans le milieu contenant les parasites et les bactéries.



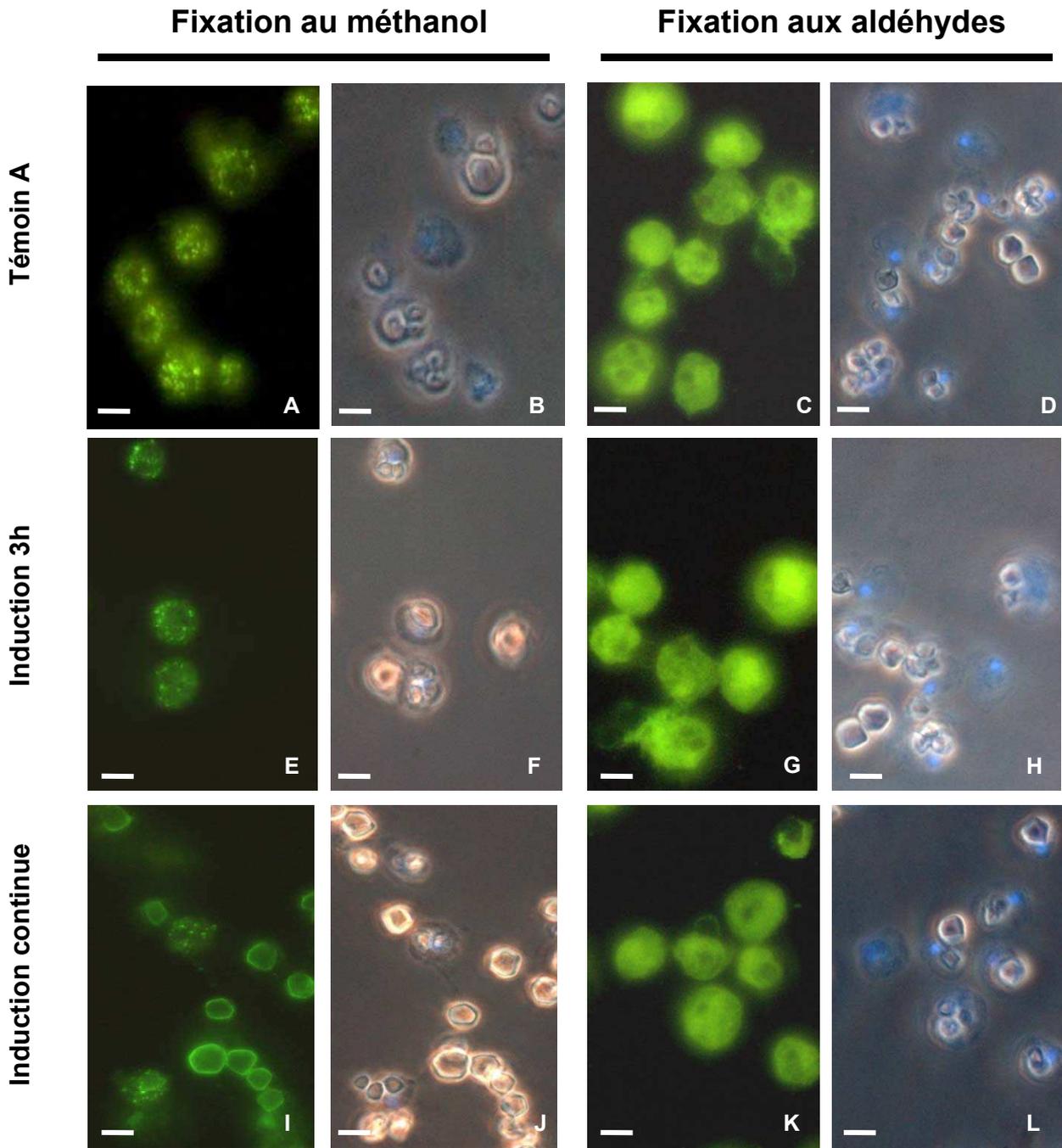
**Figure 3- Protocole de l'ARN interférence.** Clonage du gène entier ou une partie de gène *Hm-α\_scs* dans le vecteur Litmus 28i. Transformation des bactéries *E. coli* HT115, induction par l'IPTG et synthèse des ARN double brin.

24h, 48h et 72h après l'ajout des bactéries dans le milieu de culture, les parasites sont fixés soit par une solution de formaldéhyde 4% - glutaraldéhyde 0,1%, soit au méthanol. Des expériences d'immunofluorescence et de Western blot sont ensuite réalisées en utilisant les anticorps anti-Hm $\alpha$ -SCS décrits dans le chapitre II. De plus, des extractions d'ARN ont été effectuées et des RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène codant pour la protéine Hm $\alpha$ -SCS ont été réalisées.

### Résultats

Pour les deux constructions réalisées (Hm $\alpha$ -SCS RNAi-1 et Hm $\alpha$ -SCS RNAi-2), nous avons testé les deux conditions d'induction : induction des bactéries pendant trois heures avant leur mise en présence avec les parasites ou induction continue à l'IPTG 2mM après avoir rajouté les bactéries dans le milieu de culture. Nous avons également réalisé deux témoins, un témoin A qui consiste à mettre en présence des parasites et des bactéries contenant le vecteur Litmus « vide » en présence d'IPTG et un témoin B dans les conditions de culture classique du parasite sans ajout de la souche HT115. Après numération des parasites dans les tubes témoins sur cellule de Thoma, nous en concluons que la croissance parasitaire est identique aussi bien dans le tube témoin A que dans le tube témoin B. Nous en déduisons que les bactéries rajoutées dans le milieu de culture ne modifient donc pas la croissance parasitaire, de même l'IPTG à 2mM ne semble pas toxique pour le parasite. En ce qui concerne les deux constructions (Hm $\alpha$ -SCS RNAi-1 et Hm $\alpha$ -SCS RNAi-2), nous n'avons pas observé de différence de croissance des parasites. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats : soit Hm $\alpha$ -SCS n'est pas une protéine essentielle pour le parasite, soit l'ARN interférence n'a pas fonctionné.

Pour déterminer s'il y a eu une inhibition post-transcriptionnelle de la protéine Hm $\alpha$ -SCS, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence à l'aide des anticorps anti-Hm $\alpha$ -SCS. Nous présentons ici les résultats obtenus pour la construction Hm $\alpha$ -SCS RNAi-1 (figure 4). Pour les deux conditions d'induction, la protéine Hm $\alpha$ -SCS est localisée dans les hydrogénosomes sur des parasites perméabilisés et à la surface des parasites non perméabilisés. Les mêmes résultats sont obtenus pour la construction Hm $\alpha$ -SCS RNAi-2. La synthèse de la protéine Hm $\alpha$ -SCS ne semble donc pas inhibée.



**Figure 4- Observation en immunofluorescence après marquage des parasites qui ont été mis en contact avec des bactéries exprimant les ARN double brin (construction Hm\_α-SCS RNAi-1).** Les parasites, perméabilisés après fixation au méthanol ou non perméabilisés après fixation aux aldéhydes, sont incubés avec les anticorps (1/100<sup>e</sup>) dirigés contre la protéine Hm\_α-SCS. Lorsque l'induction des bactéries est de 3h, la protéine Hm\_α-SCS est localisée dans les hydrogénomosomes sur des frottis perméabilisés et à la surface du parasite sur des frottis non perméabilisés (E et G). Sous des conditions d'induction continue, nous obtenons le même marquage (I et J). Les photos A et C correspondent au témoin A (mise en présence des parasites avec des bactéries contenant le vecteur Litmus « vide » en présence d'IPTG). (contraste de phase et coloration DAPI: B, D, F, H, J et L), (Echelle: 10 μm).

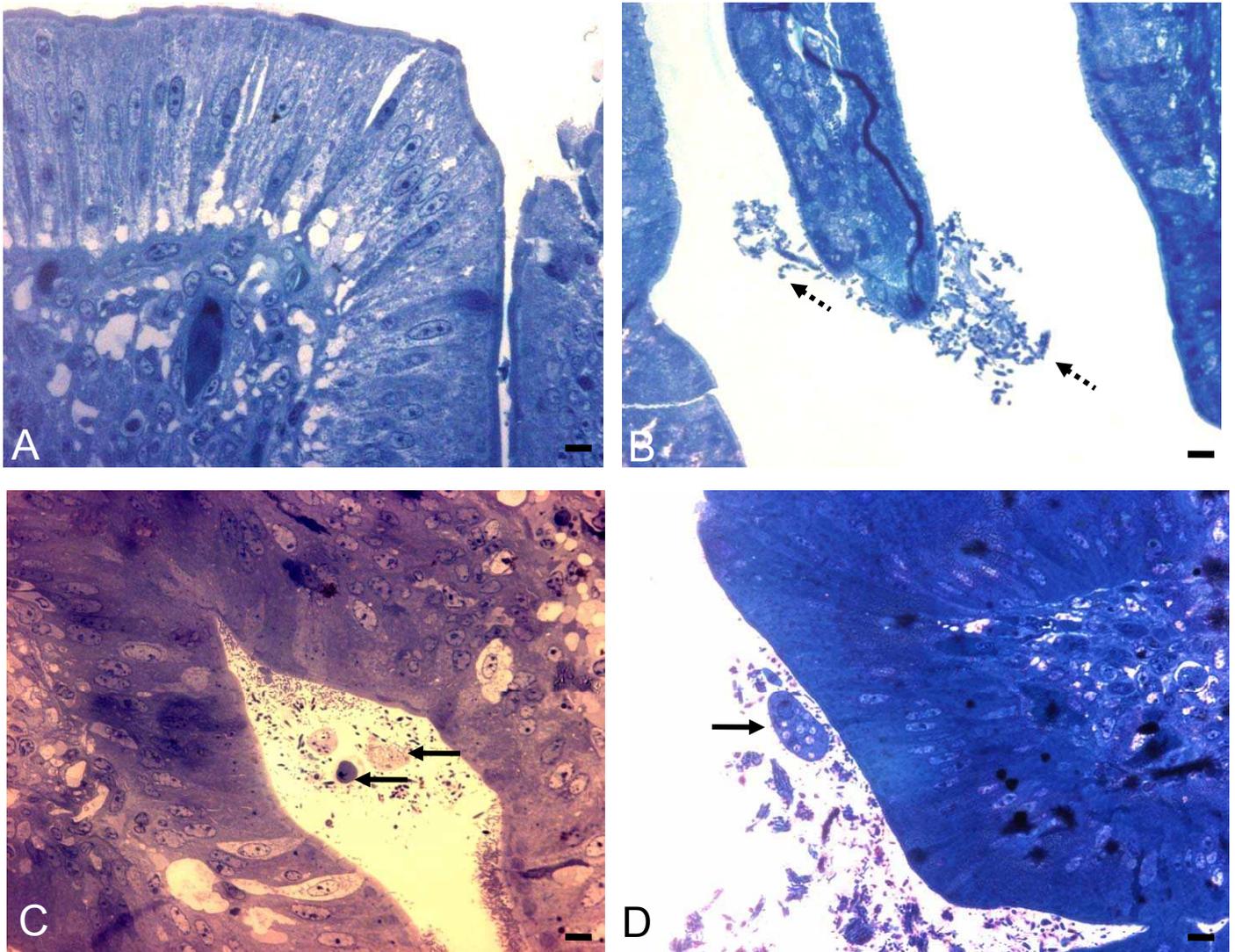
Pour vérifier l'inefficacité de l'ARNi, nous avons extrait les ARNm des différents essais puis nous avons réalisé des expériences de RT-PCR. Les transcrits correspondant à Hm $\alpha$ -SCS sont toujours présents (résultats non montrés).

Cependant, les analyses réalisées ne permettent pas de déterminer s'il n'y a pas une inhibition partielle de l'expression de la protéine comme c'est parfois le cas lors d'expériences d'ARNi. Il est donc envisagé de réaliser de la RT-PCR quantitative qui pourrait permettre de voir s'il y a une diminution de la quantité de transcrits du gène codant la protéine Hm $\alpha$ -SCS.



# Chapitre IV

**SUIVI DE DIFFERENTS ELEVAGES DE DINDES ET MISE EN PLACE  
DE TESTS ANTI-PARASITAIRES *IN VITRO***



**Figure 1- Coupes semi-fines de caecum de dindes infestées par *H. meleagridis*.** Les observations du caecum non infesté montre un épithélium normal (A) avec la présence de quelques bactéries qui peuvent adhérer aux villosités (flèches en pointillés) (B). Sur des coupes de caecum infesté, le parasite est présent dans le caecum (C) et semble adhérer à la muqueuse caecale, en présence de bactéries (D). Les flèches indiquent le parasite.

## **IV- SUIVI DE DIFFERENTS ELEVAGES DE DINDES ET MISE EN PLACE DE TESTS ANTI-PARASITAIRES *IN VITRO***

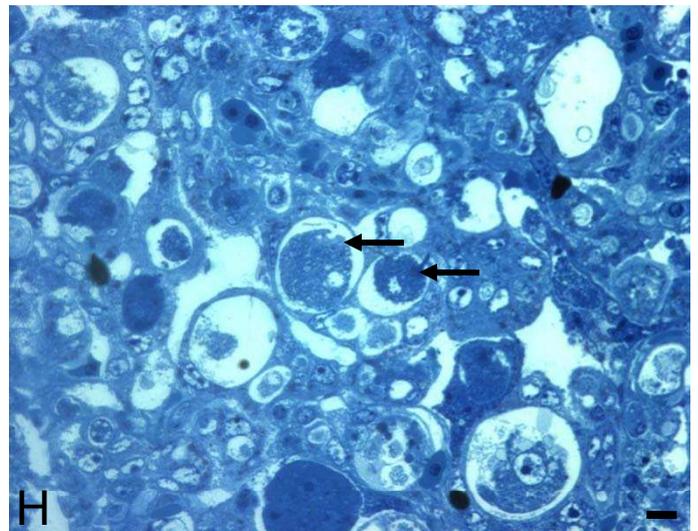
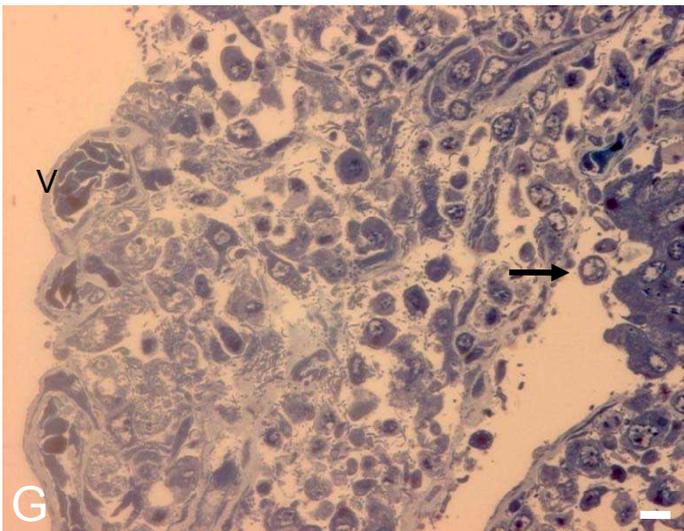
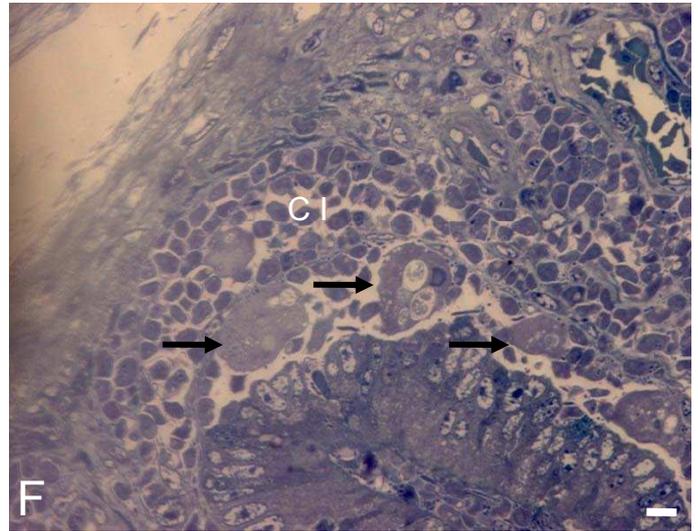
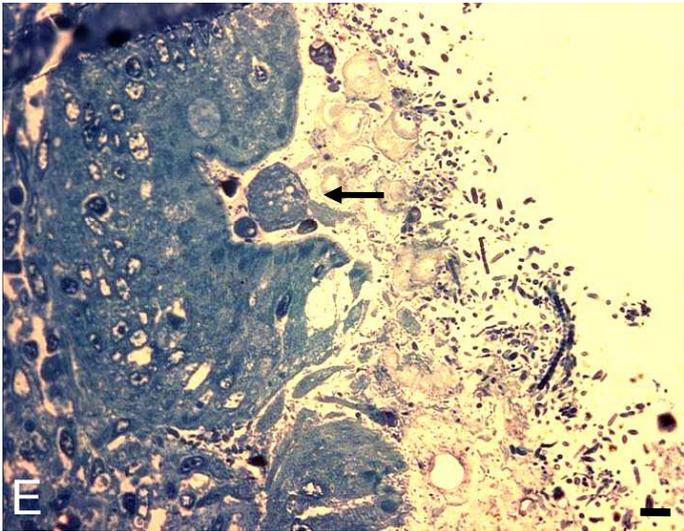
Cette partie est consacrée au travail réalisé dans le cadre de la convention CIFRE avec la société privée AGORAGER 2. Nous avons, dans un premier temps, réalisé un suivi de différents élevages de dindes pour surveiller l'apparition éventuelle d'histomonose. De nombreuses observations de caeca et de foie d'oiseaux potentiellement infestés par *H. meleagridis* ont ainsi été réalisées. Dans un deuxième temps, l'activité anti-parasitaire de différentes formulations à base d'huiles essentielles a été évaluée en culture *in vitro*.

### **IV-1- Observation des parasites dans des tissus infestés**

La société AGORAGER 2 est en relation avec des éleveurs français de volailles. Dans le but de contrôler l'apparition d'histomonose, un suivi de différents élevages a été réalisé. Cette étude a consisté à prélever les tissus habituellement infestés par *H. meleagridis* (caecum et foie) et à observer la présence ou non du parasite. Le nom et le lieu de ces élevages resteront confidentiels. Pendant six mois, chaque semaine, nous avons donc récupéré des caeca et des foies de dindes présentant des signes cliniques d'infestations caractéristiques d'une histomonose : indolence, diarrhée jaune soufre. Ces différentes observations nous ont permis de proposer une chronologie de l'infestation.

### **Matériels et méthodes**

Les échantillons de caecum et de foie de dindes sont fixés directement après autopsie des animaux, dans une solution contenant 4% de formaldéhyde et 0,25% de glutaraldéhyde. Après réception des échantillons fixés, les lésions sont observées à la loupe binoculaire puis les échantillons sont coupés en morceaux de 0,5 cm. Après déshydratation en éthanol et infiltration en oxyde de propylène, les échantillons sont inclus en résine Epikote (Agar Scientific). Des coupes semi-fines (0,65 µm) sont obtenues avec un ultramicrotome UltracutS Leica. Les coupes sont ensuite colorées au bleu Azur 0,2% et observées au microscope photonique.



**Figure 1 suite** - Le parasite envahit le caecum en détruisant l'épithélium (E), puis se retrouve au niveau des glandes sécrétrices (F). L'infestation aboutit à une destruction totale des tissus (G). Le clichet H montre le parasite au niveau du foie. Echelle:10 $\mu$ m (C, G); 15 $\mu$ m (A, B, D, E, F, H). CI, Cellules Immunitaires; V, Vaisseaux. Les flèches indiquent le parasite.

## **Résultats**

### **Observation des organes entiers**

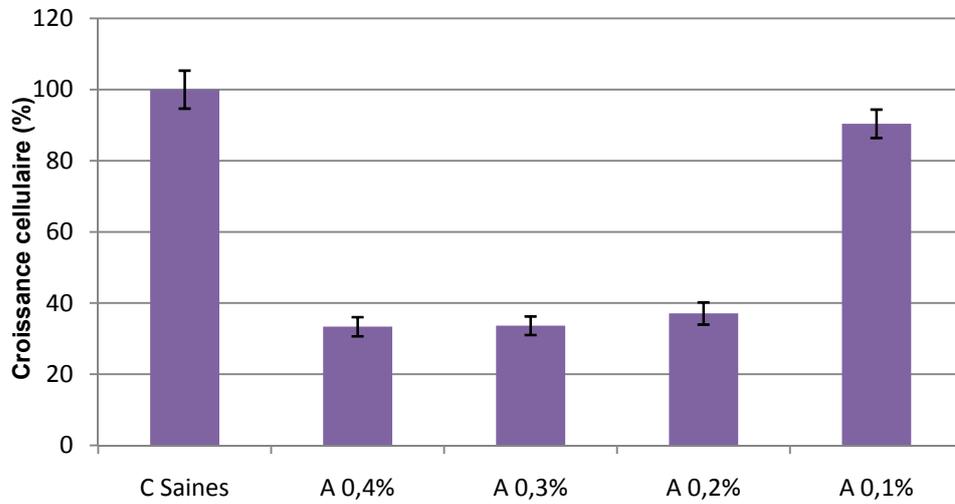
L'observation des caeca, à la loupe binoculaire, montre la présence d'une paroi très épaisse caractérisée par une calcification importante. La muqueuse est souvent hémorragique et parfois complètement nécrosée. A l'intérieur, le contenu caecal est modifié avec la présence d'un liquide jaunâtre qu'on appelle un bouchon caséux. Le foie est nécrosé avec des lésions en forme de cocardes concaves de couleur claire. La plaque limitante hépatocytaire, qui englobe les lobules hépatiques, est très épaisse et blanchâtre.

### **Observation des coupes semi-fines de caecum et de foie**

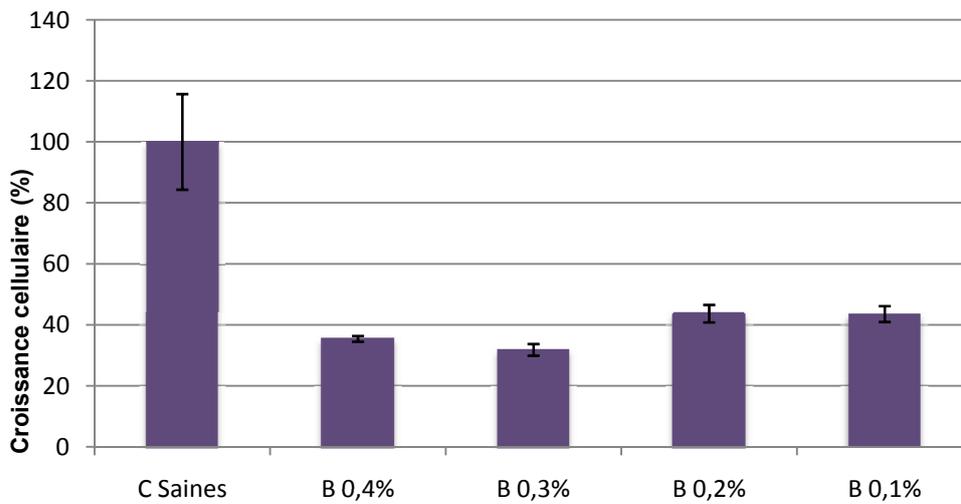
Après coloration des coupes au bleu Azur, les préparations sont observées au microscope photonique. L'observation de caecum non infesté montre la présence de bactéries dans la lumière caecale, ces bactéries faisant probablement partie de la flore commensale habituelle (Figure 1A et 1B). Sur les coupes de caecum infesté, le parasite est retrouvé dans la cavité caecale des oiseaux (figure 1C). A cette étape, la muqueuse de l'épithélium est normale. Puis, nous observons également le parasite qui semble adhérer à la paroi de l'épithélium caecal toujours en présence de bactéries (figure 1D). Comme le montre la figure 1E, la pénétration du parasite dans le tissu caecal s'accompagne d'une dégradation de l'épithélium et d'une augmentation du nombre de bactéries. En effet, l'infestation parasitaire doit probablement déstabiliser la flore normale bactérienne. Les parasites sont ensuite retrouvés au fond de la muqueuse du caecum, à proximité des glandes sécrétrices. A ce niveau, les parasites sont entourés par une grande quantité de cellules immunitaires (figure 1F). Ceci est le signe d'une forte réaction inflammatoire qui a pour conséquence de limiter l'évolution de l'infestation. La figure 1G montre une nécrose des tissus du caecum avec une désorganisation tissulaire relativement importante.

Il a été montré que le passage du parasite du caecum dans le foie s'effectue par les vaisseaux sanguins. Nos observations ne nous ont cependant pas permis de mettre en évidence des parasites dans les vaisseaux sanguins. Au niveau du foie, le parasite a une localisation intercellulaire (figure 1H) et entraîne une nécrose tissulaire.

### formulation A



### formulation B



**Figure 2- Tests de cytotoxicité par dosage des protéines à la sulforhodamine B des formulations A et B sur des cellules HFF en cultures. (C saines: cellules saines). Les formulations sont testées aux concentration 0,1%, 0,2%, 0,3% et 0,4%. Seule la formulation A à 0,1% n'est pas cytotoxique.**

#### **IV-2- Activité des huiles essentielles *in vitro* sur *Histomonas meleagridis***

En parallèle des observations, une partie du travail a porté sur la mise en place de tests anti-parasitaires. Un protocole a ainsi été mis au point pour tester l'efficacité histomonicide *in vitro* de différentes formulations à base d'huiles essentielles. Avant la réalisation des tests anti-parasitaires, la cytotoxicité de chaque formulation a été évaluée sur des lignées cellulaires.

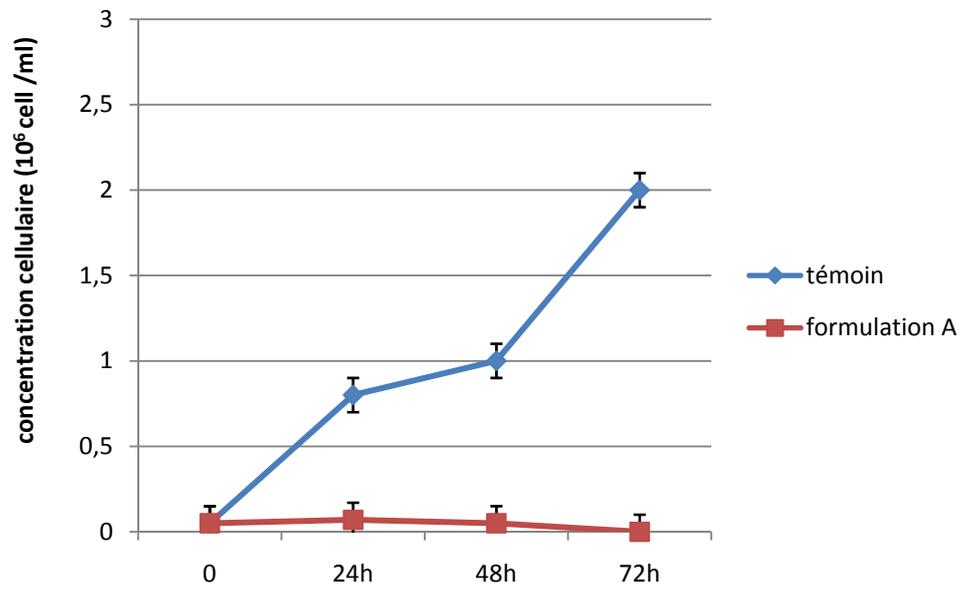
##### **Matériels et méthodes**

#### **Tests de cytotoxicité : dosage des protéines à la sulforhodamine B**

Ne disposant pas de lignées cellulaires de volailles, les tests de toxicité ont été réalisés sur des cellules de fibroblastes humains HFF (Human Foreskin fibroblast) en culture. Les cellules HFF sont cultivées en milieu MEM (Minimum Essential Medium, life technologies) supplémenté en sérum de veau fœtal 5%, L-glutamine 2mM, et divers antibiotiques (ampicilline 100 µg/mL, streptomycine 100 µg/mL, pénicilline 100 U/mL ou gentamicine 25 µg/mL) dans une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> 5% et à 37°C. Les tests sont réalisés dans des plaques 96 puits. Après 24 heures de culture, les cellules sont incubées dans 200 µL de milieu de culture contenant la formulation aux différentes concentrations à tester. Après incubation pendant 24 ou 48 heures, nous ajoutons 200 µL de milieu de culture puis 50 µL de TCA 50% pour précipiter les protéines. Après incubation pendant 5 minutes à température ambiante puis 2 heures à 4°C, le surnageant est éliminé, les cellules sont lavées cinq fois à l'eau courante et la plaque est séchée. 100 µL de sulforhodamine B à 0,4% (Sigma) sont ajoutés et, après 5 min d'incubation, la plaque est lavée à l'acide acétique 1%. Nous laissons sécher 5 minutes, plaque retournée sur support papier. Les protéines sont solubilisées à l'aide d'une solution de Tris-Base 10 mM pendant 5 minutes. La DO est lue à 550 nm à l'aide du lecteur de microplaque (*Biorad model 550*).

#### **Tests anti-parasitaires**

Les formulations sont ajoutées aux concentrations non cytotoxiques dans 3 mL de milieu de culture. Puis, le milieu estensemencé avec  $5.10^4$  parasites. Les parasites sont



**Figure 3- Activité de la formulation A sur la croissance parasitaire.** Les parasites sont comptés à 24h, 48h et 72h.

observés au microscope photonique après 24, 48 et 72 h de culture et sont comptés à l'aide d'une cellule de Thoma.

### Résultats

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés en triplicat pour une quarantaine de formulations. Chaque formulation est testée aux concentrations 0,1%, 0,2%, 0,3% et 0,4%, selon les recommandations de la société. Seules les formulations non cytotoxiques sont ensuite utilisées pour évaluer leur activité anti-parasitaire.

Les résultats étant confidentiels, nous présentons ici un exemple pour deux formulations appelées A et B. La cytotoxicité des formulations A et B est évaluée par dosage des protéines à la sulforhodamine B. Les résultats montrent que la formulation A est cytotoxique aux concentrations 0,2%, 0,3% et 0,4% (figure 2). En effet, il y a une inhibition de la croissance cellulaire d'environ 70%. Cette formulation n'est cependant pas cytotoxique à la concentration 0,1%. Par contre, la formulation B montre une cytotoxicité importante pour les quatre concentrations testées.

La formulation A, à la concentration 0,1%, a donc été retenue pour déterminer son activité anti-parasitaire sur *H. meleagridis* (figure 3). Jusqu'à 48 h, nous observons la présence de parasites dans la culture mais leur nombre reste stable indiquant une inhibition de leur croissance. Par contre, à partir de 72h, il n'y a plus de parasite dans le milieu. La formulation A à 0,1% semble donc avoir une activité histomonocidique.

D'autres formulations ont donné des résultats très encourageants.

Mon travail a donc permis d'identifier différentes formulations à bases d'huiles essentielles ayant une activité contre *H. meleagridis*. Certaines ont été directement testées sur des élevages où nous avons observé la présence du parasite. Par la suite, il sera nécessaire de déterminer l'activité de ces formulations *in vivo* sur des dindes infestées expérimentalement.



---

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---



## **I- LA CULTURE NON AXENIQUE D'*HISTOMONAS MELEAGRIDIS***

La présence de nombreuses bactéries dans la culture *in vitro* d'*H. meleagridis* est une très grande contrainte, notamment pour initier des études visant à mieux comprendre la biologie et la physiologie de ce parasite d'importance économique. Ainsi, si peu de travaux ont été jusqu'alors réalisés sur *H. meleagridis*, c'est en partie en raison de la présence de cette flore bactérienne. C'est pourquoi une partie de ma thèse avait pour objectif de mettre au point des conditions de culture axénique. Cependant, les résultats que nous avons obtenus indiquent que la présence de bactéries semble essentielle à la croissance du parasite *in vitro*.

### **I-1- Les conditions de culture d'*H. meleagridis***

Plusieurs études rapportent que l'infestation des oiseaux par *H. meleagridis* est souvent associée à des infections bactériennes. Si la relation entre *H. meleagridis* et les bactéries retrouvées dans le caecum n'est pas très claire, il semble que les bactéries jouent un rôle dans la virulence du parasite (Kemp, 1974). En effet, il a été observé que la virulence du parasite est en général plus importante en présence de certaines bactéries telles que *Escherichia coli* ou *Clostridium perfringens* (Bradley et al., 1964) et que, chez des volailles axéniques, *H. meleagridis* semble avirulent (Franker et al., 1964).

Les essais de mise en place de la culture *in vitro* d'*H. meleagridis* suggèrent aussi l'existence d'une relation étroite entre les bactéries et le parasite. Il a été montré qu'il était possible de cultiver le parasite sans bactérie, en utilisant soit des bactéries inactivées provenant de caeca de volailles, soit des extraits de foie provenant d'hamsters femelles (Lesser, 1961 ; 1964). Cependant, ces résultats préliminaires n'ont pas été reproduits malgré différents essais réalisés par plusieurs équipes (McDougald, 2005 ; McDougald, communication orale lors du symposium international « Protozoal Infections in Poultry », 2007). De plus, une étude récente sur la mise en place d'une culture monoclonale d'*H. meleagridis* par des expériences de micromanipulation n'a pas permis d'éliminer les bactéries présentes dans la culture (Hess et al., 2006).

Organismes	culture xénique (milieu)	culture monoxénique (milieu)	culture axénique (milieu)
<i>Entamoeba histolytica</i>	✓ (LE, Robinson's, TYSGM-9)	✓ (TYI-S-33, YI-S, LYI-S-2)	✓ (TYI-S-33, YI-S)
<i>Giardia intestinalis</i>	X	X	✓ (TYI-S-33, YI-S)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	X	X	✓ (TYI-S-33, YI-S)
<i>Dientamoeba fragilis</i>	✓ (LE, Robinson's)	X	X
<i>Blastocystis hominis</i>	✓ (LE, Robinson's, TYSGM-9)	X	✓ (LE, IMDM)
<i>Balantidium coli</i>	✓ (LE, Robinson's)	✓ (LE, Robinson's)	X

**Tableau 1- Conditions de culture *in vitro* de certains protozoaires retrouvés au niveau des tractus intestinal et uro-génital chez l'Homme.** Symbole x: méthode de culture non réalisable à l'heure actuelle. Symbole ✓ : méthode de culture recommandée, LE : Locke-egg (d'après Clark et Diamond, 2002).

D'autres protozoaires se cultivent également en présence de bactéries. C'est le cas par exemple de *Dientamoeba fragilis*, parasite intestinal humain, très proche phylogénétiquement d'*H. meleagridis* (Johnson et al., 2004). En effet, ce parasite se développe au milieu d'une flore bactérienne non définie et est capable, comme *H. meleagridis*, d'ingérer les grains d'amidons présents dans le milieu de culture ainsi que des bactéries par phagocytose.

La culture *in vitro* est un pré-requis à l'étude des microorganismes, notamment à des niveaux moléculaires et physiologiques qui nécessitent en général une production importante de cellules (Clark et Diamond, 2002). Le tableau 1 présente les conditions de culture de certains protozoaires retrouvés chez l'Homme au niveau des tractus intestinal et uro-génital et ayant une importance clinique non négligeable. Des cultures axéniques ont été établies directement pour *Trichomonas vaginalis* et *Giardia intestinalis*. Pour *Blastocystis hominis* et *Entamoeba histolytica*, la culture axénique a été plus difficile à mettre en place et a nécessité plusieurs étapes (culture sur milieu solide ou passage par une étape de culture monoxénique) avant axénisation complète de la culture. Enfin, les essais d'axénisation pour *Dientamoeba fragilis* et *Balantidium coli* n'ont jamais réussi, suggérant l'importance des bactéries pour le développement *in vitro* de ces microorganismes.

Les différents essais sans succès de mise en place de culture axénique ou monoxénique d'*H. meleagridis*, nous confortent dans l'idée que les bactéries sont probablement essentielles pour la croissance *in vitro* de ce parasite. Cependant, cette flore présente dans la culture a certainement évolué lors des différents repiquages et ne reflète donc probablement pas la flore naturelle du caecum des volailles. En effet, certaines bactéries qui ont été identifiées comme étant des bactéries importantes dans la flore caecale de poulet ne sont pas retrouvées dans notre culture : c'est le cas des genres *Lactobacillus* et *Clostridium* (Gabriel et al., 2005). Au contraire, nous avons retrouvé des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* alors que de telles bactéries n'ont jamais été mises en évidence dans la flore naturelle. Les résultats obtenus devraient cependant nous permettre de faire des hypothèses sur le type de bactéries nécessaires pour le développement du parasite *in vitro*.

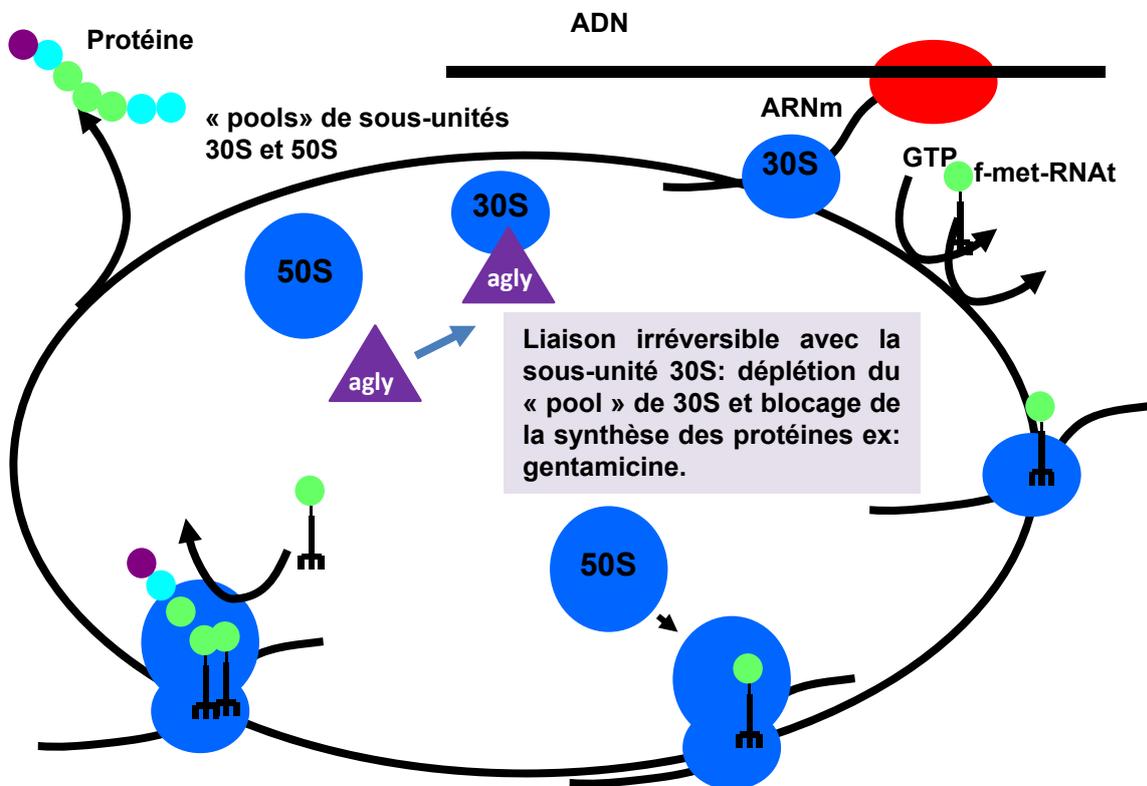


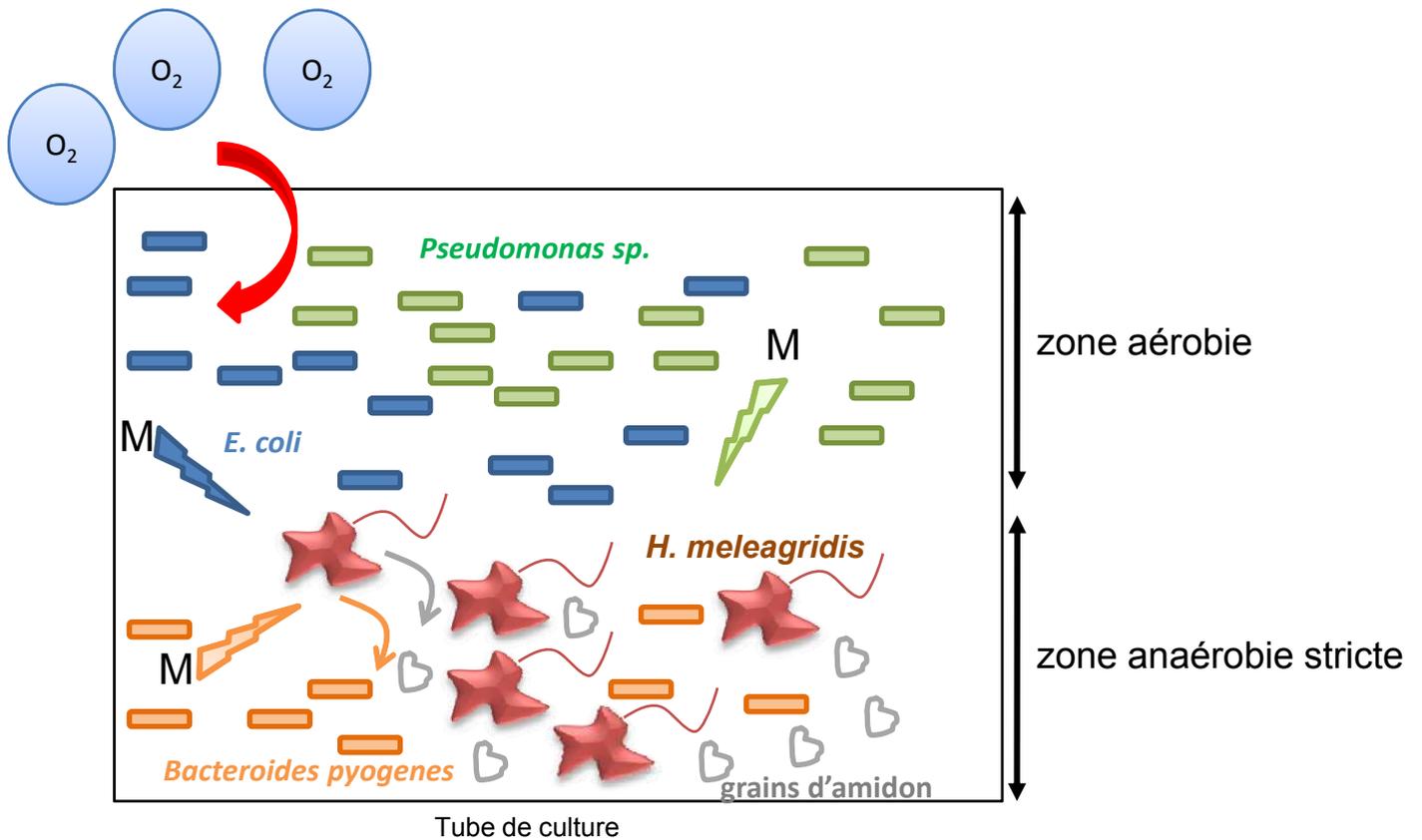
Figure 1- Mode d'action des aminoglycosides (gentamicine, kanamycine, néomycine...). Il y a formation d'une liaison irréversible de la gentamicine avec la sous-unité 30S du ribosome provoquant l'arrêt de la synthèse protéique (agly : aminoglycoside).

## I-2- La culture d'*H. meleagridis* : un véritable écosystème

Les essais de mise en place d'une culture axénique, réalisés à l'aide de différents antibiotiques, indiquent que seule la gentamicine permet une élimination totale des bactéries. Cependant, ce traitement entraîne aussi une inhibition de la croissance d'*H. meleagridis*. La gentamicine, appartient à la famille des aminoglycosides qui inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 30S des ribosomes bactériens (figure 1). Il n'était pas exclu que la gentamicine pouvait avoir aussi un effet direct sur le parasite. En effet, il a été décrit que cet antibiotique pouvait aussi être toxique chez certains eucaryotes au niveau des ARN mitochondriaux. L'absence de mitochondrie chez *H. meleagridis* suggère cependant que la gentamicine ne devrait pas avoir d'effet sur ce parasite. De plus, cette molécule a été utilisée sur *T. vaginalis*, organisme phylogénétiquement très proche d'*H. meleagridis*, jusqu'à la concentration 50 µg/mL sans induire de toxicité (Dessi et al., 2004).

L'entrée des aminoglycosides dans les cellules fait intervenir un système de transport des polyamines qui est dépendant de l'oxygène. Ces antibiotiques sont actifs contre les bactéries à métabolisme aérobie et anaérobie facultatif mais inactifs contre les bactéries anaérobies strictes. L'analyse de la flore bactérienne dans la culture d'*H. meleagridis* nous a permis de mettre en évidence des bactéries anaérobies facultatives, les entérobactéries *E. coli* et *E. fergusonii*, des bactéries aérobies (genre *Pseudomonas*) mais aussi certaines bactéries anaérobies, en particulier l'espèce *Bacteroides pyogenes*. Nos expériences de clonage-séquençage montrent que cette dernière espèce retrouvée dans la flore naturelle des poulets au niveau du caecum (Smith, 1965) et connue pour être résistante à la gentamicine, représente une proportion relativement importante des bactéries présentes dans la culture. Or, nous avons observé que la gentamicine entraîne l'élimination de toute la flore bactérienne. La culture d'*H. meleagridis* semble donc être un véritable écosystème où les différents acteurs sont interdépendants.

Un scénario peut ainsi être proposé (figure 2): *H. meleagridis* se cultive sous des conditions microaérophiles. Les bactéries aérobies (*Pseudomonas*) et anaérobies facultatives (*E. coli*) utilisent l'oxygène présent dans le milieu de culture. Ceci va permettre aux bactéries anaérobies ainsi qu'au parasite de se développer et donc de se multiplier au fond du tube en absence d'oxygène. Le parasite va se nourrir de grains d'amidon, ainsi que des bactéries



**Figure 2- Scénario envisagé pour la culture *in vitro* d'*H. meleagridis*.** Les bactéries aérobies facultatives (bleu) et aérobies strictes (vert) vont utiliser l'oxygène présent dans le milieu de culture. Les bactéries anaérobies strictes (*B. pyogenes*) sont dans le fond du tube et vont être ingérées par *H. meleagridis* (flèche orange). Les grains d'amidon sont eux aussi ingérés par le parasite (flèche grise). Les bactéries doivent relarguer dans le milieu des métabolites (M) qui vont servir au développement du parasite.

anaérobies telles que *B. pyogenes*. Cependant, nous n'avons pas encore déterminé quel(s) type(s) bactérien(s) le parasite est capable d'ingérer.

En plus de l'apport nutritionnel, les bactéries libèrent probablement certains métabolites dans le milieu de culture qui seraient essentiels à la croissance des parasites. Nous pouvons également imaginer que le parasite relargue lui aussi des métabolites dans le milieu qui seraient utilisés par les bactéries.

### **I-3- Perspectives de travail sur la culture d'*H. meleagridis***

Les observations en MET indiquent qu'*H. meleagridis* est capable d'ingérer des bactéries par phagocytose. Même s'il ne faut pas négliger l'importance des bactéries qui ne sont pas ingérées par le parasite, il serait intéressant de déterminer quels types bactériens peuvent être phagocytés.

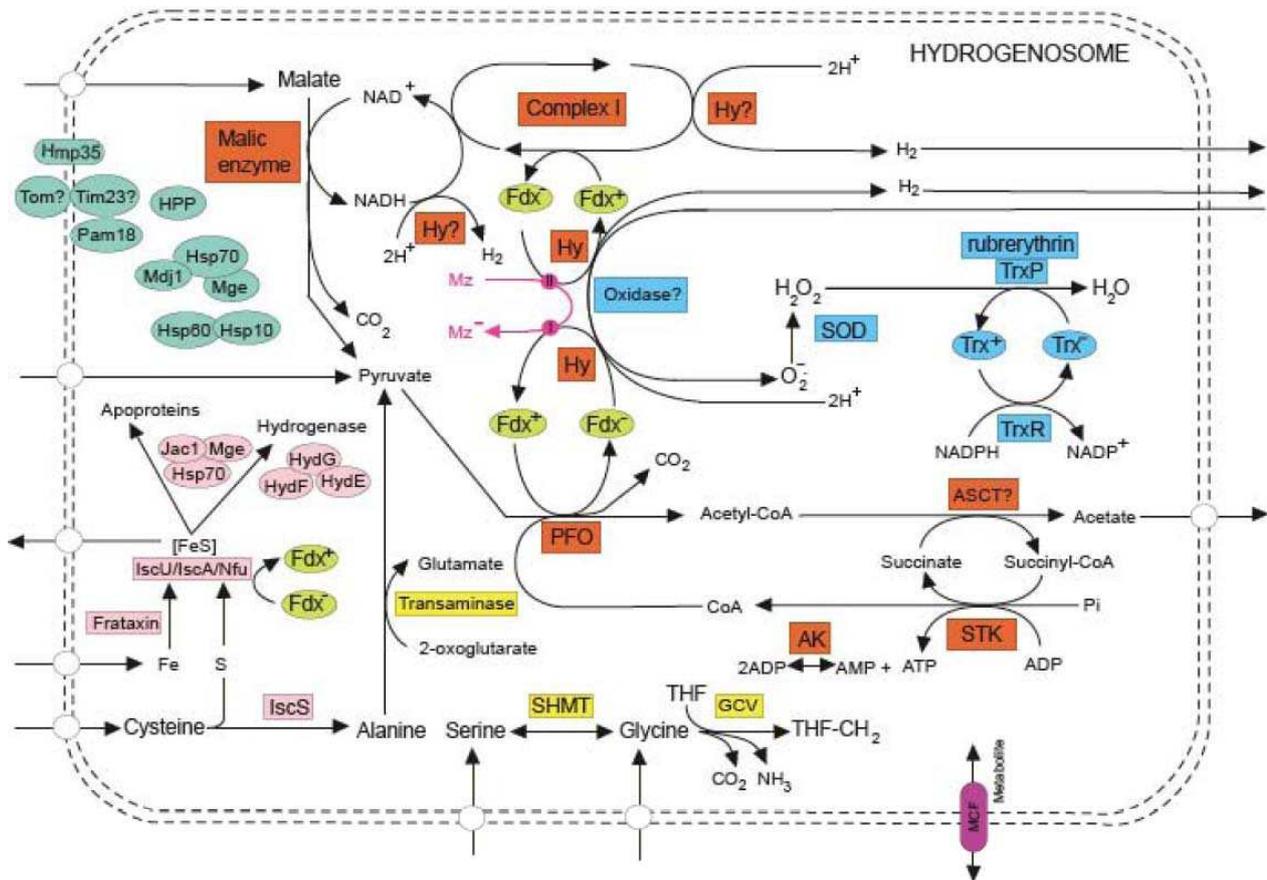
Nos premiers essais d'hybridation in situ par fluorescence (FISH pour Fluorescence In Situ Hybridization), en utilisant des sondes ADNr spécifiques des eubactéries, confirment que certaines bactéries sont ingérées par *H. meleagridis*. Dans le but de mieux caractériser ces bactéries, des sondes spécifiques déterminées dans la séquence de l'ADNr 16S de chaque type de bactéries identifiées seront synthétisées. Nous allons dans un premier temps déterminer des sondes pour repérer spécifiquement l'espèce *Bacteroides pyogenes* qui semble présente en grande quantité dans la culture et qui pourrait jouer un rôle primordial pour le développement d'*H. meleagridis*.

Nous envisagerons également de poursuivre nos travaux visant à éliminer certains types bactériens de la culture *in vitro* afin de simplifier et de contrôler la flore bactérienne. Ceci pourra être réalisé par des tests d'enrichissement en certaines bactéries, comme par exemple *Bacteroides pyogenes*. Cette expérience sera suivie par une étape d'identification par clonage séquençage qui nous permettra alors de déterminer quelles sont les bactéries essentielles au fonctionnement de cet écosystème.

Enfin, la forme cultivée actuellement au laboratoire est la forme flagellée provenant du caecum de dindes infestées expérimentalement. Il a été montré que les lésions au niveau du foie provoquées par le parasite sont dépourvues de bactéries (McDougald, 2005), laissant alors supposer que la forme amiboïde du parasite est capable de se développer et d'être



virulente en absence de bactéries. Il sera donc envisagé de mettre en place une culture *in vitro* de cette forme amiboïde, en récupérant les parasites au niveau de foies infestés. De plus, cette forme pouvant intervenir dans des processus d'infestation des tissus, elle pourrait également être utile pour réaliser des tests d'adhésions sur des cellules en culture.



**Figure 3- Carte métabolique des hydrogénosomes de *T. vaginalis* déduite de l'analyse des séquences du génome.** Les rectangles oranges représentent les enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique. La ferrédoxine (Fdx, ovales verts) transfère les électrons aux hydrogénases qui produisent de l'hydrogène moléculaire. En présence de métronidazole (rose), les électrons générés par la pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase (PFO), sont transportés par la ferrédoxine non pas vers leur accepteur normal, l'hydrogénase à fer, mais jusqu'à la drogue. Il n'y a plus production de H<sub>2</sub> mais formation d'un radical toxique NO<sub>2</sub>. Les protéines dont la fonction est prédite sont celles impliquées dans la machinerie d'assemblage des centres Fe-S et la maturation des hydrogénases (en rose), le système de détoxification de l'oxygène (bleu), un mécanisme d'import et de maturation des protéines (vert), le métabolisme des acides aminés (jaune). Les cercles ouverts dans la membrane indiquent les transporteurs non identifiés qui doivent faciliter les transports de substrats et de métabolites. Abréviations: AK, adénylate kinase; Fdx, ferrédoxine; GCV, système de clivage de la glycine; Hy, hydrogénase; PFO, pyruvate:ferrédoxine oxydoréductase; SOD, superoxyde dismutase; STK, succinate thiokinase (succinate-CoA ligase, formant l'ATP); SHMT, sérine hydroxyméthyl transférase; Trx, thiorédoxine; TrxP, thiorédoxine peroxydase; TrxR, thiorédoxine réductase; THF-CH<sub>2</sub>: N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-CH<sub>2</sub> tetrahydrofolate; Hy?: gènes codant pour des hydrogénases dépendantes de NADH; Hy: hydrogénase de 64 kDa avec de l'homologie pour NuoG; ASCT?: acétyl:succinate CoA transférase; oxydase?: aucun gène identifié dans le génome mais l'activité est présente (d'après Carlton et al., 2007).

## II- CARACTERISATION DES HYDROGENOSOMES CHEZ

### *H. MELEAGRIDIS*

#### II-1- Les hydrogénosomes chez les trichomonadines

C'est chez le parasite *Tritrichomonas foetus* que les hydrogénosomes ont été mis en évidence pour la première fois et pour lequel les descriptions morphologiques sont les plus importantes (Benchimol et al., 1996). Depuis, ces organites apparentés aux mitochondries ont été décrits chez d'autres trichomonadines mais aussi chez certains ciliés (Berger et Lynn, 1992) et champignons anaérobies (Yarlett et al., 1986).

Récemment, l'analyse du génome de *T. vaginalis* a permis d'établir une carte métabolique des hydrogénosomes (figure 3) (Carlton et al., 2007). Cette analyse est basée sur la recherche de protéines possédant à leur extrémité N-terminale le signal d'import hydrogénosomal suivant : (ML(S/T/A)X<sub>(1..15)</sub>R(N/F/E/XF), MSLX<sub>(1..15)</sub>R(N/F/XF) ou MLR(S/N)F). Au total, 138 protéines contenant cette pré-séquence d'adressage ont pu être identifiées dans le génome de *T. vaginalis*.

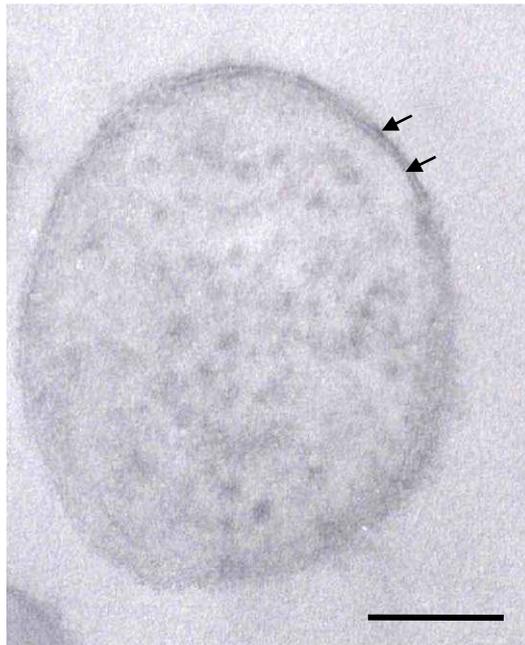
Cette étude a permis de confirmer les trois fonctions majeures des hydrogénosomes :

(1) le métabolisme énergétique : ces organites sont en effet impliqués dans la production de molécules d'ATP qui est accompagnée d'une libération d'hydrogène. Carlton et al. (2007) ont pu ainsi mettre en évidence 34 protéines jouant un rôle dans ce métabolisme énergétique.

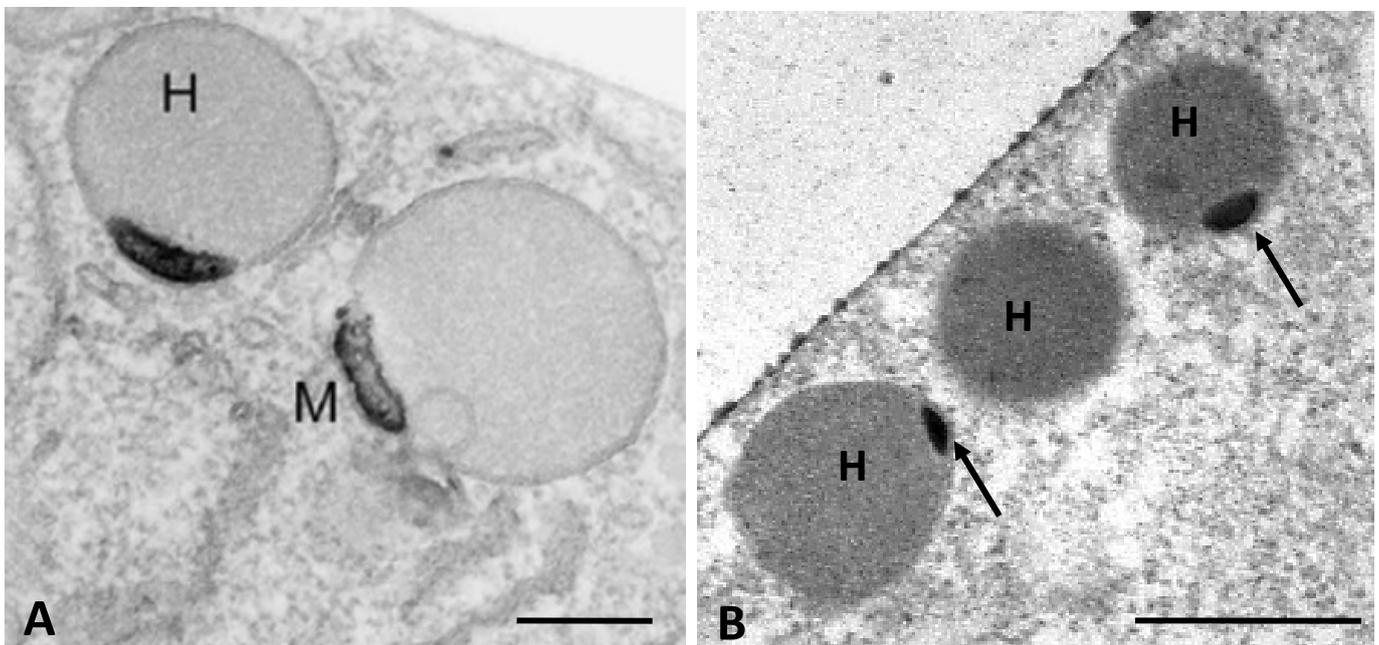
(2) la machinerie d'assemblage des centres Fe-S qui est représentée ici par 6 protéines.

(3) le métabolisme des acides aminés représenté seulement par 2 protéines qui sont impliquées dans la production d'alanine, de sérine et de glycine.

Cette étude a également mis en évidence deux autres fonctions des hydrogénosomes : la détoxification de l'oxygène ainsi qu'un mécanisme d'import et de maturation des protéines avec la présence de protéines chaperonnes. Cependant, plus de la moitié des protéines possédant un signal d'import mitochondrial n'a actuellement pas de fonction prédite (figure 14, partie analyse bibliographique).



**Figure 4 – Observation en MET d’un hydrogénosome d’*H. meleagridis* isolé à partir de la fraction enrichie. Les flèches indiquent la double membrane délimitant l’organe. Echelle : 100 nm.**



**Figure 5 – Observations en MET des hydrogénosomes de *T. fœtus* (A) et d’*H. meleagridis* (B). (A) M= « marginal plate » (d’après Yarlett et Hackstein, 2005) . (B) certains hydrogénosomes d’*H. meleagridis* présentent un vésicule aplatie ressemblant à la « marginal plate » (flèches) (H: hydrogénosomes). Echelle : 400 nm.**

✓ **Caractérisation morphologique des hydrogénosomes chez *H. meleagridis***

Mon travail a permis de mettre en évidence la présence d'hydrogénosomes chez un autre organisme appartenant aux trichomonadines, le parasite flagellé, *H. meleagridis*. Bien que les hydrogénosomes chez ce parasite soient plus petits que chez *T. vaginalis* et *T. fetus* (300 à 600 nm au lieu de 1µm), ils présentent des caractéristiques morphologiques similaires. En effet, ils sont ovoïdes, denses aux électrons et sont délimités par une double membrane. Cette double membrane a pu être observée sur des coupes ultra-fines réalisées à partir d'une fraction enrichie en hydrogénosomes (figure 4).

Comme chez *T. vaginalis*, certains hydrogénosomes d'*H. meleagridis* présentent une vésicule aplatie à la périphérie de l'organisme (figure 5). Cette vésicule, uniquement décrite au niveau des hydrogénosomes des trichomonadines, jouerait un rôle dans l'accumulation du calcium cytoplasmique et permettrait donc de réguler l'homéostasie du calcium dans la cellule. La mitochondrie est également capable d'assurer cette fonction, cependant elle ne présente pas de vésicules permettant l'accumulation du calcium.

✓ **Caractérisation moléculaire des hydrogénosomes chez *H. meleagridis***

Les séquences complètes de trois gènes codant pour des enzymes hydrogénomales ont été identifiées : la sous unité  $\alpha$  de la succinyl coenzyme A synthétase ( $\alpha$ -SCS), une enzyme malique et une hydrogénase à fer. La stratégie initialement utilisée était basée sur des amplifications de fragments de gènes par PCR en utilisant des amorces déterminées dans les régions conservées des enzymes de *T. vaginalis*. Des approches par RT-PCR et RACE-PCR ont ensuite permis d'amplifier les régions manquantes. Le pourcentage d'identité des séquences des enzymes hydrogénomales d'*H. meleagridis* avec celles de *T. vaginalis* est relativement élevé, variant de 77 à 81%.

Nous avons remarqué que deux de ces enzymes, l' $\alpha$ -SCS et l'enzyme malique, sont codées par des familles multigéniques comme c'est le cas chez *T. vaginalis* où trois gènes codent pour l' $\alpha$ -SCS et quatre gènes pour l'enzyme malique (Alderete et al., 1995; Engbring and Alderete, 1998b). En effet, l'analyse des différentes séquences amplifiées par PCR

Hm_α-SCS	MLASPVRN
Tv_α-SCS	MLAGDFSRN
Hm_EM	MLTSSVAAPVRN
Tv_EM	MLTSSVSVPRN
Séquence consensus de <i>T. vaginalis</i>	ML(S/T/A)X <sub>(1..15)</sub> R(N/F/E/XF)

**Figure 6. Alignement des pré-séquences des protéines α-SCS et ME d'*H. meleagridis* et de *T. vaginalis*.** Nous obtenons la même séquence consensus que pour les protéines de *T. vaginalis*. (Hm : *H. meleagridis*, Tv : *T. vaginalis*, SCS: succinyl coA synthétase, EM : enzyme malique).

montre des variabilités minimales suggérant la présence d'au moins trois gènes à la fois pour l'enzyme malique et pour l' $\alpha$ -SCS (résultats non montrés). Cependant, l'assemblage des séquences nous a permis d'identifier un seul gène complet pour chacune de ces 2 enzymes.

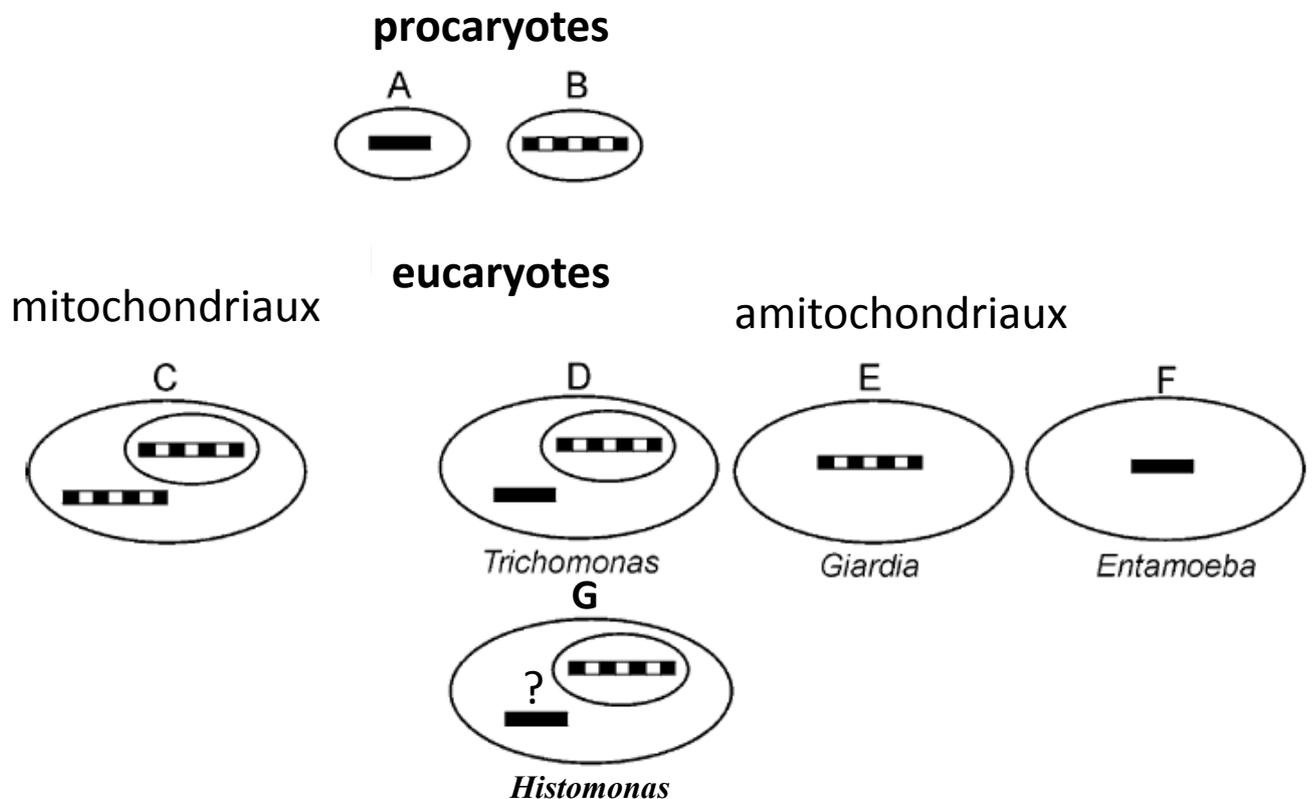
La SCS et l'enzyme malique sont retrouvées chez tous les organismes eucaryotes possédant des mitochondries ou des hydrogénosomes. L'enzyme malique catalyse la décarboxylation du malate en pyruvate dans les deux organites et la SCS permet la production d'ATP dans les hydrogénosomes (Steinbüchel et Müller, 1986a) et la production de GTP dans les mitochondries (Bridger, 1974). Chez *H. meleagridis*, ces deux enzymes possèdent des pré-séquences N-terminale très courtes (8 à 12 acides aminés) caractéristiques des enzymes hydrogénomales de *T. vaginalis* (figure 6). A l'aide d'anticorps produits contre chacune de ces enzymes, nous avons confirmé leur localisation dans les organites à double membrane d'*H. meleagridis*. Cependant, c'est l'identification d'une hydrogénase à fer et sa co-localisation avec l' $\alpha$ -SCS et l'enzyme malique qui nous a permis de confirmer que les organites à double membrane d'*H. meleagridis* correspondent effectivement à des hydrogénosomes.

Nous allons discuter des principales caractéristiques de ces trois enzymes ainsi que d'une autre enzyme spécifique des hydrogénosomes : la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase.

### L'enzyme malique

Trois classes d'enzymes maliques sont différenciées selon leur spécificité pour les coenzymes et leur capacité à décarboxyler le malate : (i) l'enzyme malique NADP spécifique présente chez les bactéries mais aussi dans le cytosol et les plastes de certains eucaryotes, (ii) l'enzyme malique NAD(P) retrouvée dans les mitochondries au niveau du cycle de Krebs, dans les hydrogénosomes et chez les bactéries, et enfin (iii) l'enzyme malique bactérienne NAD(P) spécifique capable de décarboxyler l'oxaloacétate.

Chez les protistes, les informations sur les séquences des enzymes maliques sont limitées. Deux familles d'enzymes maliques ont été mises en évidence chez *T. vaginalis* (Dolezal et al., 2004) :



**Figure 7- Représentation des différentes enzymes maliques présentes dans la nature.** Les petits rectangles noirs représentent les enzymes maliques « courtes » de type procaryotique, les rectangles hachurés noir et blanc représentent les enzymes malique « larges » de type eucaryotes. (A) eubactérie ou archaebactérie avec une enzyme malique courte (ex: *Rickettsia prowazekii*); (B) eubactérie avec un enzyme malique large (ex: *Mycobacterium tuberculosis*); (C) eucaryote avec une malique enzyme de type large dans le cytosol et dans l'organite (mitochondrie ou plastes); (D) eucaryote supérieur avec une enzyme malique « courte » dans le cytoplasme et une enzyme malique « large » dans les hydrogénosomes (*T. vaginalis*); (E) eucaryote amitochondrial avec une enzyme malique « large » dans le cytoplasme (*G. intestinalis*); (F) eucaryote amitochondrial avec une enzyme malique de type « large » dans le cytoplasme (*E. histolytica*); (G) chez *H. meleagridis*, il y a présence d'une enzyme malique de type « large » dans les hydrogénosomes, par contre nous ne savons pas si comme chez *T. vaginalis* une enzyme malique de type procaryote est présente dans le cytoplasme. (d'après Dolezal et al., 2004).

(1) Une enzyme malique cytosolique, dimère de sous-unités de 42 kDa, qui utilise spécifiquement le NADP<sup>+</sup>, et qui appartient à la famille des enzymes malique « courtes » de type procaryotique. Cette enzyme proviendrait du transfert horizontal d'un gène d'une eubactérie.

(2) Une enzyme malique hydrogénomale, tétramère de sous-unités de 60 kDa qui utilise préférentiellement le NAD<sup>+</sup> au NADP<sup>+</sup>, et qui est de la même famille que les enzymes maliques « larges » trouvées dans les mitochondries, les hydrogénosomes et le cytosol des eucaryotes mais aussi qu'on retrouve chez certaines bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium acetobutylicum* ou *Deinococcus radiodurans* (Dolezal et al., 2004).

La présence à la fois d'enzymes maliques de types procaryotique et eucaryotique dans des compartiments différents dans un même organisme apparaît être unique dans la nature (Dolezal et al., 2004).

Chez *Giardia intestinalis*, organisme possédant des mitosomes, l'enzyme malique, qui est localisée dans le cytoplasme, appartient à la même famille que l'enzyme malique hydrogénomale de *T. vaginalis*. Cette enzyme, comme celle de *T. vaginalis*, est la plus divergente parmi les enzymes maliques eucaryotiques (Hrdy et Müller, 1995 ; Sanchez et al., 1996). Au contraire, l'enzyme malique cytosolique d'*Entamoeba histolytica* est de la même famille que les enzymes maliques « courtes » bactériennes et son acquisition serait le résultat d'un transfert horizontal (Field et al., 2000).

Enfin, les enzymes maliques de *T. vaginalis* diffèrent selon leur structure, leur origine mais aussi selon leur fonction physiologique. En effet, durant la décarboxylation oxydative du malate, l'enzyme malique cytosolique NADP spécifique va produire du NADPH qui va être utilisé lors de la production d'éthanol par l'alcool déshydrogénase (Steinbüchel et Müller, 1986b), alors que dans les hydrogénosomes, le NADH produit sera recyclé par le complexe I pour permettre la production d'H<sub>2</sub>.

Lors de mon travail, nous avons identifié une enzyme malique chez *H. meleagridis* de 60 kDa et qui présente des fortes similarités (77%) avec la sous unité A de l'enzyme malique hydrogénomale de *T. vaginalis* (figure 7). La protéine est strictement localisée dans les hydrogénosomes et ne possède pas le résidu lysine en position 362 qui serait impliqué dans la spécificité pour le NADP<sup>+</sup>. En effet, des analyses de mutations et une étude structurale des



enzymes maliques cytosoliques de pigeons montrent que la lysine 362 est un résidu déterminant pour la spécificité de l'enzyme avec le NADP<sup>+</sup> (Yang et al., 2000). Ceci est en accord avec la présence de ce résidu dans la séquence de l'enzyme malique cytosolique de *T. vaginalis* et l'absence de ce résidu dans l'enzyme malique hydrogénomale. Des tests enzymatiques devront être réalisés pour déterminer si l'enzyme malique d'*H. meleagridis* fonctionne avec le NAD, ou le NADP, ou si elle est capable d'utiliser ces deux cofacteurs. Cependant, la plupart des enzymes maliques mitochondriales et hydrogénomales des trichomonades utilisant préférentiellement le NAD<sup>+</sup> comme cofacteur sont capables de fonctionner en présence de NADP<sup>+</sup> (Drmotá et al., 1996). L'enzyme malique hydrogénomale du champignon *Neocallimastix frontalis*, utilise au contraire le NADP<sup>+</sup> de façon préférentielle (Marvin-Sikkem et al., 1993).

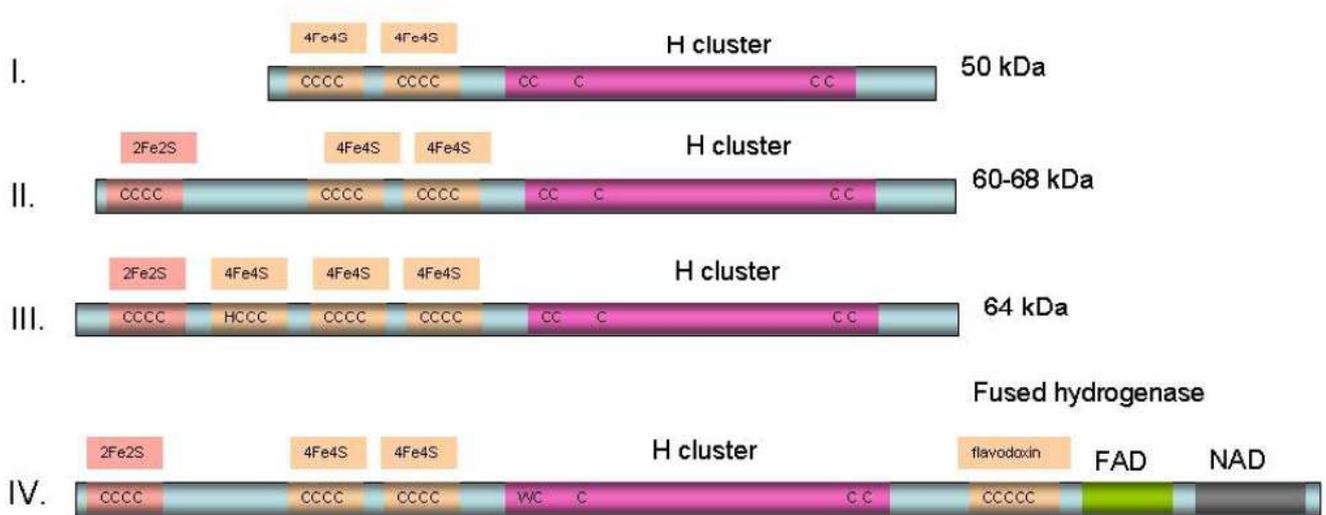
Des analyses biochimiques suggèrent que les deux types d'enzymes sont présents chez *T. fetus* et qu'elles ont les mêmes caractéristiques que celles de *T. vaginalis* (Hrdý et Mertens, 1993). Il serait donc d'intérêt de rechercher le gène codant une enzyme malique de type cytosolique chez *H. meleagridis*.

#### La succinyl coenzyme A synthétase

La deuxième enzyme que nous avons identifiée chez *H. meleagridis* est la sous unité  $\alpha$  de la succinyl coenzyme A synthétase ( $\alpha$ -SCS). Cette enzyme est présente chez les organismes mitochondriaux et intervient dans le cycle de Krebs en produisant une liaison riche en énergie. En effet, elle transfère la liaison riche en énergie du succinyl-coenzyme A pour synthétiser du GTP à partir de GDP et du phosphate. C'est une enzyme multimérique composée de plusieurs sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Cette enzyme est également retrouvée dans les hydrogénosomes. Chez *T. vaginalis* (figure 3), elle se présente sous la forme d'un tétramère  $\alpha_2\beta_2$  et va permettre la formation d'ATP. Cette réaction est couplée avec une acétyl coenzyme A transférase (Lahti et al., 1992; 1994).

La protéine d'*H. meleagridis* a une très grande homologie avec la protéine de *T. vaginalis* (81% d'identité). Lors de mon travail, nous n'avons pas recherché le gène codant la sous-unité  $\beta$  de la SCS chez *H. meleagridis*. Cependant, des analyses en immunofluorescence montrent que des anticorps polyclonaux dirigés contre la sous-unité  $\beta$  de la SCS de *Blastocystis hominis*, parasite intestinal humain possédant des organites apparentés aux

Chez *T. vaginalis*



Chez *H. meleagridis*



**Figure 8- Les quatre familles d'hydrogénases à fer chez *T. vaginalis* et l'hydrogénase à fer d'*H. meleagridis*.** Les trois premières familles diffèrent dans le nombre et le type de centres Fe-S dans la partie N-terminale de la protéine. L'hydrogénase de type IV est une nouvelle protéine de fusion, entre une hydrogénase de type II avec un domaine C-terminal diflavine qui contient des motifs de liaison à la fois pour les groupements prosthétiques FMN et FAD (d'après Carlton et al., 2007). La séquence codant l'hydrogénase à fer chez *H. meleagridis* n'est pas complète, cependant elle semble correspondre à une hydrogénase à fer de type I.

hydrogénosomes, réagissent avec les hydrogénosomes d'*H. meleagridis*, suggérant alors l'existence de cette sous-unité chez *H. meleagridis* (résultats non montrés).

### Les hydrogénases à fer

Le troisième gène que nous avons identifié code pour une hydrogénase à fer, enzyme clé des hydrogénosomes. Les hydrogénases sont un vaste ensemble d'enzymes procaryotiques et eucaryotiques qui catalysent l'oxydation réversible de l'hydrogène moléculaire. A ce jour, trois classes d'hydrogénases ont été mises en évidence : des hydrogénases associées uniquement au fer ([Fe]-hydrogénases), des hydrogénases associées au nickel et au fer ([Ni-Fe]-hydrogénases) et les hydrogénases sans association avec un métal (Vignais et al., 2001). Les [Fe]-hydrogénases sont retrouvées chez les bactéries et les eucaryotes tandis que les [Ni-Fe]-hydrogénases sont seulement décrites chez les archées et les bactéries.

Chez les eucaryotes, les hydrogénases à fer sont des enzymes clés du métabolisme énergétique hydrogénosomal. Chez *T. vaginalis*, plusieurs hydrogénases ont été identifiées. Parmi elle, TvhydA et TvhydB (51,5 et 50 kDa) correspondent à deux hydrogénases à fer qui sont strictement localisées dans les hydrogénosomes (Bui et Johnson, 1996). Une troisième hydrogénase à fer de 64 kDa, caractérisée par un long domaine N-terminal, a également été mise en évidence (Horner et al., 2000). Plus récemment, le séquençage du génome de *T. vaginalis* a permis de classer les hydrogénases à fer dans 4 grandes familles (figure 8) (Carlton et al., 2007). Ces quatre familles de protéines possèdent en commun le domaine intervenant dans l'activité catalytique de l'enzyme appelé cluster H. Cependant, elles ont des domaines fonctionnels différents, avec un nombre différent de centres Fe-S dans leur partie N-terminale, suggérant alors que la production d'hydrogène chez *T. vaginalis* doit être plus complexe que celle initialement proposée. Les hydrogénases de classe I agiraient avec la ferrédoxine alors que les hydrogénases de classe II et III seraient capables d'interagir avec la NADH déshydrogénase du complexe I, pour produire de l'hydrogène (figure 3) (Hrdy et al., 2004). La fonction des hydrogénases de classe IV n'a pas encore été déterminée.

Chez *H. meleagridis*, l'analyse de la séquence protéique montre la présence du cluster H dans la partie C-terminale de la protéine et la présence de deux centres Fe-S dans la partie N-terminale (figure 8). Les expériences d'immunomarquages que nous avons réalisées à partir d'un extrait de protéines totales et sur un extrait de protéines de la fraction enrichie en



hydrogénosomes montrent la présence de trois bandes suggérant qu'il y aurait, comme chez *T. vaginalis*, plusieurs hydrogénases. L'hydrogénase que nous avons identifiée correspond probablement à une protéine de 51 kDa appartenant à la classe I. Cependant, nos expériences de 5' RACE ne nous ont pas encore permis d'identifier la séquence codante entière probablement en raison d'ARNm tronqués. Les deux autres bandes de 48 kDa et de 65 kDa pourraient correspondre à deux autres hydrogénases à fer.

### La pyruvate ferrédoxine:oxydoréductase

La deuxième enzyme clé des hydrogénosomes est la pyruvate ferrédoxine:oxydoréductase (PFOR). Cette enzyme permet la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-coA (figure 3). La ferrédoxine va alors prendre en charge les électrons et les transférer à l'hydrogénase à fer de classe I pour produire l'hydrogène moléculaire. Dans les mitochondries et les bactéries aérobies, la décarboxylation oxydative du pyruvate est catalysée par un pyruvate déshydrogénase (PDH), complexe enzymatique formé d'au moins trois protéines (Weiland, 1983). La seule propriété commune à la PDH et à la PFOR est la présence du groupement prosthétique thiamine pyrophosphate, qui intervient dans la décarboxylation du pyruvate (Krescher et Oesterhelt, 1982). Chez *T. vaginalis*, cette protéine est localisée dans la membrane des hydrogénosomes (Williams et al., 1987). Chez *Giardia lamblia*, organisme ne possédant pas d'hydrogénosomes mais des mitosomes, des expériences de fractionnement cellulaire montrent que la PFOR est une enzyme liée à des complexes membranaires dans le cytoplasme (Ellis et al., 1993). Chez *E. histolytica*, cette protéine est à la fois localisée au niveau de la membrane plasmique et dans des structures cytoplasmiques appelées « kinetoplaste-like » du fait de leur ressemblance avec le kinétoplaste des trypanosomes (Rodriguez et al., 1998).

Nous avons recherché cette enzyme clé des hydrogénosomes chez *H. meleagridis*. Des approches par PCR, RT-PCR et RACE-PCR, en utilisant des amorces spécifiques de la PFOR de *T. vaginalis*, ont été réalisées. Cette stratégie ne nous a cependant pas permis d'amplifier un gène codant pour une PFOR chez *H. meleagridis*. Nous pouvons donc en conclure que la PFOR est peut-être moins conservée que les autres enzymes hydrogénosomales chez *H. meleagridis* ou que la décarboxylation du pyruvate se réalise grâce à une autre enzyme. En effet, chez certains organismes tels que le cilié *Nyctotherus ovalis* ou le champignon



anaérobie *Neocallimastix frontalis*, les hydrogénosomes ne possèdent pas de PFOR, mais soit une pyruvate déshydrogénase (PDH) soit une pyruvate formate lyase (PFL). Cependant, l'affiliation d'*H. meleagridis* aux trichomonadines laisse supposer que ce parasite possède des hydrogénosomes avec un métabolisme proche de celui de *T. vaginalis*. Récemment, la réalisation d'une banque d'ADNc d'*H. meleagridis* a permis d'identifier une séquence partielle d'un gène codant pour une PFOR (Bilic et al., 2007 ; communication orale lors du symposium international « Protozoal Infections in Poultry »)

## **II-2- Rôle des protéines hydrogénosomales dans l'adhésion chez les trichomonadines**

### **✓ Chez le parasite *Trichomonas vaginalis***

De nombreuses études indiquent que certaines enzymes métaboliques peuvent avoir une dualité fonctionnelle en jouant notamment le rôle d'adhésines. C'est le cas chez le flagellé *T. vaginalis* qui possède des protéines qualifiées de « moonlighting » : en effet, ces protéines localisées dans les hydrogénosomes peuvent dans certaines conditions être relocalisées à la surface du parasite.

La cytoadhérence de *T. vaginalis* aux cellules épithéliales vaginales (VEC) est très spécifique et très complexe. Le parasite va subir une transformation morphologique, pendant quelques minutes lors de l'attachement aux cellules VEC, en passant d'une forme flagellée à une forme amiboïde (Alderete et al., 1988). Quatre protéines ont été identifiées comme intervenant dans ces processus d'adhésion du parasite. Ces protéines ont été initialement nommées AP65, AP51, AP33 et AP23 (AP pour « adhesion protein »). Le rôle de ces différentes protéines dans l'adhésion du parasite a été conforté par plusieurs approches expérimentales (Arroyo et al., 1992 ; Alderete et al., 1995 ; Engbring et al., 1996 ; Alderete , 1999; Kucknoor et al., 2005b) :

- (1) Des marquages radioactifs de la surface des parasites ainsi que des expériences d'immunofluorescence indirecte montrent que ces 4 protéines sont localisées à la surface de la membrane plasmique (Arroyo et al., 1992 ).



- (2) Il y a une relation directe entre la quantité d'adhésines à la surface et le niveau de cytoadhérence (Arroyo et al., 1992).
- (3) L'élimination des protéines de surface par traitement à la trypsine entraîne une diminution de la cytoadhérence (Engbring et al., 1996).
- (4) Le prétraitement des cellules VECs avec des adhésines purifiées inhibe l'attachement des parasites (Alderete, 1999).
- (5) Le traitement des organismes avec des anticorps dirigés contre chaque protéine AP inhibe la cytoadhérence de manière concentration dépendante (Alderete, 1999).
- (6) La synthèse de ces quatre adhésines est régulée par la liaison aux cellules VECs (Arroyo et al., 1992) mais aussi par l'augmentation de la concentration en fer dans le milieu (Arroyo et al., 1993).

Une autre étude indique aussi que trois de ces quatre protéines sont codées par des familles multigéniques et qu'elles correspondent à des enzymes intervenant dans le métabolisme hydrogénosomal (Engbring et al., 1996) : il s'agit de l'AP65 qui est une enzyme malique et des adhésines AP33 et AP51 qui sont respectivement les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la succinyl coenzyme A synthétase. Une autre protéine d'adhésion nommée AP120, mise en évidence récemment, correspond à la PFOR, enzyme spécifique des hydrogénosomes (Moreno-Brito et al., 2005).

Toutes ces enzymes possèdent une séquence N-terminal d'import dans les hydrogénosomes. Cette pré-séquence, caractéristique des protéines hydrogénosomales, est également retrouvée pour certaines protéines de surface de *T. vaginalis* comme la protéine P270 (Alderete et al., 2001). Ces différentes observations suggèrent que cette pré-séquence pourrait permettre l'adressage des protéines aussi bien dans les hydrogénosomes qu'à la surface du parasite (Musatovova et Alderete, 1998).

Le fer est connu pour moduler l'expression de certains gènes chez *T. vaginalis* comme par exemple le gène codant pour le récepteur à la lactoferrine (Lehker et al., 1991). En présence d'une grande quantité de fer dans la cellule, il y a une augmentation de l'expression des adhésines et par conséquent une augmentation de la cytoadhérence du parasite (Lehker et al., 1991). Il a été montré que les protéines APs seraient localisées dans les hydrogénosomes sous des conditions classiques de culture. Lors d'une augmentation de la quantité en fer dans



la cellule ou lorsque les parasites sont mis en contact avec des cellules VECs, les protéines sont relocalisées à la surface du parasite et jouent alors le rôle de protéines d'adhésion (Garcia et al., 2003 ; Kucknoor et al., 2005c). Il est donc nécessaire de déterminer pourquoi le fer entraîne cette modification d'expression. Chez les bactéries, la liaison du fer à des facteurs de transcription va réprimer l'expression de certaines protéines (Hennecke, 1990). Cependant, aucune étude à l'heure actuelle n'a permis d'identifier les mécanismes responsables de modification de localisation des enzymes hydrogénomales chez *T. vaginalis*.

### ✓ Chez le parasite *H. meleagridis*

Nous avons montré que les séquences des enzymes hydrogénomales identifiées chez *H. meleagridis* sont très proches de celles de *T. vaginalis*. De plus, *H. meleagridis* comme *T. vaginalis* doit subir des modifications morphologiques car deux formes ont été mises en évidence : une forme flagellée dans les caeca et une forme amiboïde au niveau du foie. Parmi les protéines hydrogénomales que nous avons identifiées, deux sont homologues aux adhésines AP65 et AP33 de *T. vaginalis* : il s'agit de l'enzyme malique et de l' $\alpha$ -SCS.

Les expériences d'immunolocalisation réalisées sur des parasites après croissance en milieu classique indiquent que seule l' $\alpha$ -SCS a une double localisation. Alors qu'elle est localisée dans les hydrogénosomes des parasites après une étape de perméabilisation, elle est détectée à la surface des parasites non perméabilisés. Cette double localisation est originale car chez *T. vaginalis* elle ne se fait que selon des conditions particulières : augmentation de la concentration en fer dans le milieu ou contact des parasites avec des cellules-hôtes.

Nous avons donc entrepris de rajouter du fer dans le milieu de culture d'*H. meleagridis*. Cependant, l'ajout de fer à des concentrations de 25 et 50 mM, concentrations provoquant une modification de localisation des protéines AP65 et AP33 chez *T. vaginalis*, n'entraîne aucune modification de localisation pour les deux protéines d'*H. meleagridis*. La protéine Hm\_  $\alpha$ -SCS est toujours localisée à la fois dans les hydrogénosomes et à la surface du parasite alors que l'enzyme malique n'est retrouvée que dans les hydrogénosomes. Il faut rappeler que la culture du parasite se réalise en présence de bactéries et qu'il est possible que le fer ait été utilisé par certaines d'entre-elles.



Des essais de tests d'adhésion des parasites sont actuellement en cours au laboratoire. Ne disposant pas de lignées épithéliales de caecum de volailles ni de lignées de cellules hépatiques de volailles, nous réalisons ces premiers tests sur des cellules intestinales humaines (I 407) et sur des cellules fibroblastiques de poulet (DF1).

Ces tests d'adhésion consistent à fixer les cellules au glutaraldéhyde puis à les incuber avec un extrait protéique parasitaire. Après incubation à 37°C, les cellules sont lavées pour éliminer les protéines d'*H. meleagridis* non accrochées. Les protéines sont ensuite solubilisées en portant les cellules à ébullition dans un tampon de dénaturation contenant du SDS et du DTT (Laemmli, 1970). Les protéines sont analysées par SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie, ou transférées sur membrane PVDF pour des analyses d'immunodétection avec les différents anticorps. Les premiers résultats indiquent que la protéine Hm\_α-SCS est capable d'adhérer aux cellules I 407, ce qui semble en accord avec sa localisation à la surface des parasites. Cependant, ces résultats restent à confirmer.



### III- PREMIERES APPROCHES DE GENETIQUE FONCTIONNELLE CHEZ *HISTOMONAS MELEAGRIDIS*

#### III-1- Essais de RNAi par feeding

Nous avons entrepris de mettre en place une technique d'ARN interférence chez *H. meleagridis* dans le but d'étudier la fonction précise des gènes codant pour les trois enzymes hydrogénomales identifiées. Ayant observé que le parasite était capable d'ingérer des bactéries, nous avons choisi d'utiliser la méthode de RNAi par « feeding ».

Cette méthode a été développée pour la première fois chez le ver *C. elegans* (Timmons et Fire, 1998 ; Kamath et al., 2001). Elle consiste à faire ingérer par les vers une souche bactérienne d'*E. coli* exprimant des ARN double brin capables d'inhiber l'expression d'un gène spécifique. Elle est très facile à mettre en place, car les vers sont habituellement maintenus en culture sur un milieu contenant des bactéries *E. coli*. Cette méthode a été utilisée pour réaliser une analyse fonctionnelle à l'échelle du génome de *C. elegans* (Kamath et al., 2003). Ce travail a permis la création d'une librairie de 17 000 clones bactériens, chaque clone correspondant à un gène du ver. Le mécanisme est, cependant, très mal connu : les ARN double brin sont libérés par les bactéries dans l'intestin du ver, ils se répandent dans tous les autres tissus y compris dans les lignées germinales.

Cette méthode de RNAi par « feeding » a également été utilisée chez les protozoaires ciliés du genre *Paramecium*. Une souche d'*E. coli* (HT115) capable d'induire la synthèse des ARN double brin en présence d'IPTG a donc été donnée à ingérer aux paramécies pour étudier la fonction de plusieurs gènes codant par exemple pour une centrine appartenant au réseau infraciliare, et des facteurs de fusion membranaire (Galvani et Sperling, 2002). Les résultats montrent un effet RNAi rapide. Vingt-quatre heures après ingestion des bactéries, 60 à 80% des cellules présentent un phénotype particulier (léthalité, modification de l'assemblage du réseau infraciliare). Cet effet RNAi est rapide et peut être stoppé lorsque les paramécies sont mises dans du milieu ne contenant pas les bactéries.

Dans le but de mettre au point cette technique de RNAi chez *H. meleagridis*, nous avons choisi comme cible le gène codant pour l' $\alpha$ -SCS. En effet, cette enzyme hydrogénomale étant également retrouvée à la surface des parasites, nous supposons qu'elle



joue un rôle dans les processus d'adhésion. L'approche RNAi pourrait donc permettre d'apporter des informations plus précises sur ce rôle potentiel. Cependant, les différents essais que nous avons réalisés n'ont à l'heure actuelle montré aucune modification de l'expression du gène codant l' $\alpha$ -SCS. Il y a toujours présence de transcrit  $\alpha$ -SCS et la protéine a toujours la même localisation.

Ces résultats préliminaires peuvent s'expliquer de différentes manières :

(1) Le parasite n'est peut être pas capable d'ingérer la souche d'*E. coli* utilisée et il pourrait exister des phénomènes de compétition entre les différentes bactéries présentes dans la culture. La quantité de bactéries exprimant les ARN double brin pourrait être insuffisante par rapport aux autres bactéries présentes dans le milieu.

(2) Nous ne savons pas si *H. meleagridis* possède les gènes codant les protéines impliquées dans le processus d'ARN interférence. Récemment, l'analyse du génome de *T. vaginalis* a montré la présence de gènes codant pour l'enzyme Dicer et deux protéines de type Argonaute, suggérant qu'il est envisageable de réaliser de l'ARN interférence pour modifier l'expression de gènes chez ce flagellé (Carlton et al., 2007). Cependant, aucune étude n'a démontré la fonctionnalité de ces enzymes chez *T. vaginalis*.

(3) Les enzymes du métabolisme énergétique appartiennent fréquemment à des familles multigéniques. Par exemple, trois gènes codent pour l' $\alpha$ -SCS chez *T. vaginalis* (Alderete et al., 1995; Engbring and Alderete, 1998). Lors du séquençage des différents produits PCR du gène Hm\_ $\alpha$ -scs, nous avons mis en évidence l'existence de plusieurs variants qui diffèrent seulement de quelques nucléotides. Le système d'ARN interférence n'a peut être touché qu'un seul gène de cette famille multigénique. Il y aurait ainsi des phénomènes de compensation.

(4) L'ARNi entraîne en général une inhibition partielle de l'expression du gène cible. Il est donc parfois nécessaire de réaliser de la PCR quantitative pour détecter une faible inhibition de l'expression.

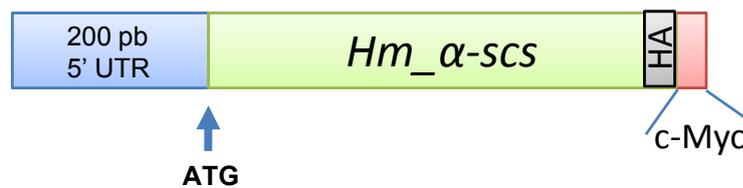
(5) Notons aussi, que le mécanisme par « feeding » est très mal connu et est donc un système très difficile à maîtriser. Même chez *C. elegans*, organisme qui est à l'origine de cette méthode, il n'y a aucune information au sujet de la libération des ARN double brin dans les tissus du ver (Timmons et Fire, 1998).

```

Tv_FD          ACTTCACTTCTCTTTAGCGAATG
Tv_α-SCS      TGTTCACTTCACATTAATG
Tv_β-SCS      TGATCACTTCACATTACAATG
Tv_α-TUB      GTGTCACTCTTCATCAATG
Tvag consensus TCAYWWYWMWMTW
Hm_α-SCS      TGACCACTTCACTTTACTCAAGATG
                * * * * * * * * * *

```

**Figure 9- Alignement des séquences Inr (initiateur) de certains gènes de *T. vaginalis* avec la séquence en amont du codon ATG du gène *Hm\_α-scs*.** Seuls deux bases sont différentes de la séquence consensus (\*). Ferrédoxine (FD), α-succinyl coA synthétase (α-SCS), β-succinyl coA synthétase (β-SCS), α- tubuline (α-TUB). Le code suivant est utilisé pour la séquence consensus: Y=T/C; W=T/A; M=C/A. (d'après Liston et Johnson, 1998).



**Figure 10- Représentation schématique d'une construction réalisée pour la mise au point d'une transfection transitoire du parasite *H. meleagridis*.** La séquence codante *Hm\_α-scs* plus une région 5' en amont de 200 pb est fusionnée en 3' avec les épitopes HA et c-myc. (HA: YPYDVPDYA; c-myc: EQKLISEEDL).

### **III-2- Premiers essais de transfection par électroporation chez *Histomonas meleagridis***

Des premiers essais de transfection d'*H. meleagridis* par électroporation ont également été réalisés. Actuellement, aucune information sur les promoteurs ainsi que sur les signaux d'initiation et de terminaison de la transcription n'est disponible chez *H. meleagridis*. La seule séquence connue, que nous avons identifiée, est une séquence d'environ 200 nucléotides en amont du codon ATG du gène codant l' $\alpha$ -SCS. Comme le montre l'alignement présenté sur la figure 9, cette séquence présente de fortes similarités avec l'élément Inr (initiateur) caractéristique des promoteurs de *T. vaginalis* (figure 9). Cet élément Inr a en effet été retrouvé dans 75% des régions 5'UTR des gènes de *T. vaginalis* (Carlton et al., 2007). Composée de 13 nucléotides, la séquence Inr est localisée à proximité du site d'initiation de la traduction (Quon et al., 1994).

Nous avons réalisé une première construction pour la mise au point d'une technique de transfection d'*H. meleagridis*. Ce vecteur contient la région 5' non codante de 200 pb et la séquence complète du gène codant la protéine Hm\_ $\alpha$ -SCS fusionnée avec les épitopes HA et c-myc (figure 10). L'utilisation d'anticorps spécifiques de ces 2 épitopes permettra de repérer la protéine de fusion chez *H. meleagridis*. Après différents essais d'électroporation des parasites en présence de ce vecteur, aucun transformant n'a été détecté suggérant que la séquence en 5' de 200 nucléotides ne doit pas être suffisante pour initier la transcription. En effet, les approches de transfection de *T. vaginalis* ont montré que des régions d'environ 1500 pb, en amont du codon d'initiation de la traduction, étaient nécessaires pour initier la transcription des gènes (Delgadillo et al., 1997).

*H. meleagridis* étant très proche phylogénétiquement de *T. vaginalis*, il serait également intéressant de réaliser des essais de transfection en clonant des séquences promotrices de gènes de *T. vaginalis* en amont de gènes d'intérêt d'*H. meleagridis*.



## **IV- RECHERCHE DE NOUVELLES MOLECULES ACTIVES CONTRE *H. MELEAGRIDIS***

### **IV-1- Nouvelles molécules actives d'origine naturelle à base d'huiles essentielles**

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-parasitaires. C'est le cas par exemple de l'essence de berbérine capable d'inhiber la croissance *in vitro* des protozoaires *Gardia lamblia* et *Entamoeba histolytica* (Kaneda et al., 1990), ou du thymol qui est actif contre *Trichomonas vaginalis* (Zemek et al., 1987). Plusieurs études ont également été réalisées chez *H. meleagridis*, montrant que la cannelle de Chine et l'huile de citron, avaient une toxicité très élevée pour ce parasite (Zenner et al., 2003).

Lors de ma thèse, la capacité de différentes formulations à base d'huiles essentielles à inhiber la croissance d'*H. meleagridis* a été évaluée en culture *in vitro*. Ce travail étant réalisé pour l'entreprise AGORAGER 2, la nature des huiles essentielles et les différentes formulations testées sont restées confidentielles.

Pour chaque formulation, nous avons effectué des tests de cytotoxicité sur des cultures de cellules fibroblastiques humaines (HFF). Nous avons ainsi remarqué que de nombreuses huiles essentielles étaient cytotoxiques. La toxicité des molécules aromatiques est en général liée à la présence de certains sites fonctionnels oxygénés comme, par exemple, des groupements cétones. De plus, peu de recherches expérimentales ont été menées pour déterminer le devenir des molécules aromatiques dans l'organisme. Par conséquent, les huiles essentielles doivent être utilisées avec vigilance, sur la base de connaissances fiables en déterminant notamment leurs concentrations cytotoxiques.

Des molécules « anti-*Histomonas* » à base d'huiles essentielles ont déjà été mises sur le marché. Cependant, des études ont démontré une inefficacité de certains de ces produits *in vivo* sur des élevages infestés expérimentalement (van der Heijden et al., 2007 ; communication orale lors du symposium international « Protozoal Infections in Poultry »).

Il est donc essentiel, avant la mise sur le marché, de réaliser des tests de cytotoxicité et de déterminer l'activité *in vivo* des différents produits. Nos formulations vont être prochainement testées *in vivo* sur des élevages infestés expérimentalement.



#### IV-2- Les enzymes hydrogénomales : cibles thérapeutiques ?

Le métronidazole, molécule appartenant à la famille des nitroimidazoles agit sur une enzyme clé du métabolisme hydrogénomal, la pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase (PFOR). En effet, les électrons générés par la PFOR vont être capturés par le métronidazole et il va y avoir production de radicaux toxiques NO<sub>2</sub> (Kulda et al., 1999).

*H. meleagridis*, comme *T. vaginalis*, est sensible au métronidazole et cette molécule a été utilisée pendant de nombreuses années en traitement préventif dans les élevages. Cependant, cette molécule s'est avérée toxique pour le consommateur et a été finalement interdite en 1995 dans la lutte contre l'histomonose. Elle reste cependant utilisée chez l'Homme dans les traitements contre certaines amibes et contre *T. vaginalis* et ceci malgré l'apparition de souches résistantes (Rasoloson et al., 2002).

Certaines protéines hydrogénomales jouant un rôle potentiel dans l'adhésion, elles constituent des cibles d'intérêt pour développer de nouvelles approches thérapeutiques. Il pourrait ainsi être envisagé de bloquer l'infestation en empêchant l'adhésion du parasite à la surface des cellules de l'hôte. Cependant, l'enzyme malique et l' $\alpha$ -SCS, également connues sous le nom d'adhésines AP65 et AP33 chez *T. vaginalis*, sont des enzymes conservées retrouvées chez les eucaryotes supérieurs et ne constituent donc pas des cibles spécifiques. Une cible thérapeutique potentielle est représentée par la PFOR, enzyme spécifique des hydrogénomomes, récemment identifiée chez *H. meleagridis*, également capable de jouer le rôle d'adhésine chez *T. vaginalis* (AP120) (Moreno-Brito et al., 2005). En effet, cette protéine est absente chez les organismes hôtes (Homme et oiseaux). L'immunogénicité de cette protéine pourrait alors servir comme cible potentielle vaccinale.



---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---



**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adams M.W.W. 1990.** The structure and mechanism of iron-hydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1020, 115-145.
- Addis M.F., Rappelli P., Cappuccinelli P., Fiori P.L. 1997.** Extracellular release by *Trichomonas vaginalis* of a NADP<sup>+</sup> dependent malic enzyme involved in pathogenicity. *Microb. Pathog.*, 23, 55-61.
- Akhmanova A., Voncken F., van Alen T., van Hoek A., Boxma B., Vogels G., Veenhuis M., Hackstein J.H. 1998.** A hydrogenosome with a genome. *Nature*, 396, 527-8.
- Akhmanova A., Voncken F.G., Hosea K.M., Harhangi H., Keltjens J.T., op den Camp H.J., Vogels G.D., Hackstein J.H. 1999.** A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol. Microbiol.*, 32, 1103-14.
- Al-Attar M.A., Fernando M.A. 1987.** Transport of *Eimeria necatrix* sporozoites in the chicken: effects of irritants injected intraperitoneally. *J. Parasitol.*, 73, 494-502.
- Alderete J.F., Garza G.E. 1985.** Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect. Immun.*, 50, 701-8.
- Alderete J.F., Demes P., Gombosova A., Valent M., Fabusova M., Janoska A., Stefanovic J., Arroyo R. 1988.** Specific parasitism of purified vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.*, 56, 2558-62.
- Alderete J.F., Garza G.E. 1988.** Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect. Immun.*, 56, 28-33.
- Alderete J.F., O'Brien J.L., Arroyo R., Engbring J.A., Musatovova O., Lopez O., Lauriano C., Nguyen J. 1995.** Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol. Microbiol.*, 17, 69-83.
- Alderete J.F., Engbring J., Lauriano C.M., O'Brien J.L. 1998.** Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microb. Pathog.*, 24, 1-16.
- Alderete J.F. 1999.** Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.*, 67(8), 4298-302.



- Alderete J.F., Millsap K.W., Lehker M.W., Benchimol M. 2001.** Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell. Microbiol.*, 3, 359-370.
- Allen P.C., Fetterer R.H. 2002.** Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin. Microbiol.*, 15(1), 58-65.
- Anton R. 1979.** Une thérapeutique d'avenir? Les actualités pharmaceutiques. 154, 23-30.
- Arisue N., Sánchez L.B., Weiss L.M., Müller M., Hashimoto T. 2002.** Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol. Int.*, 51(1), 9-16.
- Arroyo R., Engbring J., Alderete J.F. 1992.** Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol.*, 6, 853-62.
- Arroyo R., González-Robles A., Martínez-Palomo A., Alderete J.F. 1993.** Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.*, 7(2), 299-309.
- Bakatselou C., Kidgell C., Graham Clark C. 2000.** A mitochondrial-type hsp70 gene of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 110, 177-82.
- Belaiche P. 1979.** Traité de phytothérapie et aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme. Ed. Maloine, Paris, 204p.
- Benchimol M., De Souza W. 1983** May. Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *J. Protozool.*, 30(2), 422-5.
- Benchimol M., Johnson P.J., de Souza W. 1996.** Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. *Biol. Cell.*, 87(3), 197-205.
- Benchimol M., Durand R., Almeida J.C. 1997.** A double membrane surrounds the hydrogenosomes of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 154 (2), 277-82.
- Berger J., Lynn D.H. 1992.** Hydrogenosome-methanogen assemblages in the echinoid endocommensal plagiopylid ciliates *Lechriopyla mystax* Lynch, 1930, and *Plagiopyla minuta* Powers, 1933. *J. Protozool.*, 39, 4-8.
- Bishop A. 1938.** *Histomonas meleagridis* in domestic fowls (*Gallus gallus*). Cultivation and experimental infection. *Parasitology*, 30, 181-194.
- Bleyen N., De Gussem K., De Gussem J., Goddeeris B.M. 2006.** Specific detection of *Histomonas meleagridis* in turkeys by a PCR assay with an internal amplification control. *Vet. Parasitol.*, 143(3-4), 206-13.



- BonDurant R.H., Wakenell P.S. 1994.** *Histomonas meleagridis* and relatives. In Parasitic Protozoa. Vol IX. Ed Kreier JP. New York, USA, 189-206.
- Boxma B., Voncken F., Jannink S., van Alen T., Akhmanova A., van Weelden S.W., van Hellemond J.J., Ricard G., Huynen M., Tielens A.G., Hackstein J.H. 2004.** The anaerobic chytridiomycete fungus *Piromyces* sp. E2 produces ethanol via pyruvate:formate lyase and an alcohol dehydrogenase. E. Mol. Microbiol., 51(5), 1389-99.
- Boxma B., de Graaf R.M., van der Staay G.W., van Alen T.A., Ricard G., Gabaldon T., van Hoek A.H., Moon-van der Staay S.Y., Koopman W.J., van Hellemond J.J., Tielens A.G., Friedrich T., Veenhuis M., Huynen M.A., Hackstein J.H. 2005.** An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. Nature, 434(7029), 74-9.
- Bozner P. 1997.** Immunological detection and subcellular localization of Hsp70 and Hsp60 homologs in *Trichomonas vaginalis*. 83(2), 224-9.
- Bradley R. E., Johnson J., Reid W.M. 1964.** Apparent obligate relationship between *Histomonas meleagridis* and *Escherichia coli* in producing disease. J. Parasitol., 50, 51.
- Bridger, W. A. 1974.** Succinyl CoA synthetase, p.581-696. In P.D. Boyer (ed.), The enzymes. Academic Press, Inc., New York.
- Brugerolle G. 1976.** Cytologie ultrastructure, systématique et évolution des Trichomonadida. Annales de la station Biologique Besse-en-Chandesse 10, 1-57.
- Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition. Ed. Tec et doc, Paris, 1120p.
- Bui E.T., Bradley P.J., Johnson P.J. 1996.** A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. Proc. Natl. Acad. Sci .U S A. 93(18), 9651-6.
- Bui, E.T., Johnson, P.J., 1996.** Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. Mol. Biochem. Parasitol., 76, 305-10.
- Cahen P., Vandaele E. 2000.** Les experts européens sont favorables au dimétridazole additif. La semaine des filières In : La semaine vétérinaire, 990 : 4.
- Callait M.P., Granier C., Chauve C., Zenner L. 2002.** In vitro activity of therapeutic drugs against *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895). Poult. Sci. 81(8), 1122-7.
- Carlton J.M., Hirt R.P., Silva J.C., Delcher A.L., Schatz M., Zhao Q., Wortman J.R., Bidwell S.L., Alsmark U.C., Besteiro S., Sicheritz-Ponten T., Noel C.J., Dacks J.B., Foster P.G., Simillion C., Van de Peer Y., Miranda-Saavedra D., Barton G.J., Westrop G.D., Muller S., Dessi D., Fiori P.L., Ren Q., Paulsen I., Zhang H., Bastida-Corcuera F.D., Simoes-Barbosa A., Brown M.T., Hayes R.D., Mukherjee M., Okumura C.Y., Schneider R., Smith A.J., Vanacova S., Villalvazo M., Haas**



- B.J., Perteu M., Feldblyum T.V., Utterback T.R., Shu C.L., Osoegawa K., De Jong P.J., Hrdy I., Horvathova L., Zubacova Z., Dolezal P., Malik S.B., Logsdon J.M. Jr., Henze K., Gupta A., Wang C.C., Dunne R.L., Upcroft J.A., Upcroft P., White O., Salzberg S.L., ang, P., Chiu C.H., Lee Y.S., Embley T.M., Coombs G.H., Mottram J.C., Tachezy J., Fraser-Liggett C.M., Johnson P.J. 2007.** Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 12, 207-212
- Cavalier-Smith T. 1987.** Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*, 326 (6111), 332-3.
- Cavalier-Smith T. 1998.** A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 73, 203-66.
- Cavalier-Smith T. 2002.** The pagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 297-354.
- Cepicka I., Kutisova K., Tachezy J., Kulda J., Flegr J. 2004.** Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Vet. Parasitol.* 128(1-2), 11-21.
- Cerkasovova A., Lukasova G., Cerkasov J., Kulda J. 1973.** Biochemical characterization of large granule fraction of *Tritrichomonas foetus* (strain KV1). *J. Protozool.*, 20, 525.
- Chapman H.D. 1997.** Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathol.*, 26, 221-244.
- Chapman H.D., Cherry T.E., Danforth H.D., Richards G., Shirley M.W., Williams R.B. 2002.** Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *Int. J. Parasitol.*, 32(5), 617-29.
- Clark C.G., Diamond L.S. 2002.** Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol.*, 15(3), 329-41.
- Clark C.G., Roger A.J. 1995.** Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 6518-6521.
- Crespo R., Walker R.L., Nordhausen R., Sawyer S.J., Manalac R.B. 2001.** Salpingitis in Pekin ducks associated with concurrent infection with *Tetratrichomonas* sp. and *Escherichia coli*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13(3), 240-5.
- Dacks J.B., Dyal P.L., Embley T.M., van der Giezen M. 2006.** Hydrogenosomal succinyl-CoA synthetase from the rumen-dwelling fungus *Neocallimastix patriciarum*; an energy-producing enzyme of mitochondrial origin. *Gene*. 373, 75-82.
- De Gussem M. 2003.** L'histomonose peut se transmettre directement par voie cloacale. La semaine des filières. In : La semaine Vétérinaire. 1109, 43-44.



- Delappe I. P. 1953a.** Studies on *Histomonas meleagridis*. I. Use of antibiotics to facilitate in vitro isolation. Exp. Parasitol. 2, 79–86.
- Delappe I. P. 1953b.** Studies on *Histomonas meleagridis*. II. Influence of age of original inoculum and pH on growth in various media. Exp. Parasitol. 2, 117–124.
- Delappe I. P. 1953c.** Studies on *Histomonas meleagridis* III. The influence of anaerobic versus aerobic environments on the growth of the organism invitro. Exp. Parsitol. 2:209-222.
- Delappe I. P. 1953d.** Studies on *Histomonas meleagridis*. IV. A continuous automatic potentiometric method of measuring the Eh of protozoan cultures. Exp. Parasitol. 2, 289–293.
- Delgadillo M.G., Liston D.R., Niazi K., Johnson P.J. 1997.** Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 94(9), 4716-20.
- De Souza W., Benchimol M. 1988.** Electron spectroscopic imaging of calcium in the hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 20(3), 619-21.
- Dessi D., Giuseppe D., Eleonora E., Maria R., Pier L. 2005.** Long-Term Survival and Intracellular Replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* Cells: Potential Role of the Protozoon in Transmitting Bacterial Infection. Infect. Immun., 73(2), 1180-1186.
- Dolezal P., Vanacova S., Tachezy J., Hrdý I. 2004.** Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. Gene, 31, 81-92.
- Drmota T., Proost P., Van Ranst M., Weyda F., Kulda J., Tachezy J. 1996.** Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. Mol. Biochem. Parasitol., 83, 221-234.
- Duquenois P. 1982.** Les médicaments aromatiques, leurs caractères, leur contrôle. Phytothérapie, 1, 7-10.
- Dwyer D.M. 1970.** An improved method for cultivating *Histomonas meleagridis*. J. Parasitol., 56, 191-192.
- Dyall S.D., Johnson P.J. 2000.** Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. Curr. Opin. Microbiol., 3(4), 404-11.
- Dyall S.D., Koehler C.M., Delgadillo-Correa M.G., Bradley P.J., Plümper E., Leuenberger D., Turck C.W., Johnson P.J. 2001.** Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes : Conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. Mol. Cell. Biol., 20, 2488-2497.



- Dyall S.D., Yan W., Delgadillo-Correa M.G., Lunceford A., Loo J.A., Clarke C.F., Johnson P.J. 2004a.** Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature*, 431(7012), 1103-7.
- Dyall S.D., Brown M.T., Johnson P.J. 2004b.** Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*, 304(5668), 253-7.
- Ellis J.E., Williams R., Cole D., Cammack R., Lloyd D. 1993.** Electron transport components of the parasitic protozoon *Giardia lamblia*. *FEBS Lett.*, 325(3), 196-200.
- Embley T.M., van der Giezen M., Horner D.S., Dyal P.L., Foster P. 2003.** Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 358(1429), 191-201.
- Embley T.M., Martin W. 2006.** Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*, 440, 623-630.
- Engbring J.A., O'Brien J.L., Alderete J.F. 1996.** *Trichomonas vaginalis* adhesin proteins display molecular mimicry to metabolic enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 408, 207-23.
- Engbring J.A., Alderete J.F. 1998a.** Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology*, 144, 3011-3018.
- Engbring J.A., Alderete J.F. 1998b .** Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol. Microbiol.*, 28(2), 305-13.
- Field J., Rosenthal B., Samuelson J. 2000.** Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.*, 38(3), 446-55.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E and Mello C. C. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806–811.
- Fok A.K., Allen R.D. 1990.** The phagosome-lysosome membrane system and its regulation in *Paramecium*. *Int. Rev. Cytol.*, 123, 61-94.
- Franchomme P., Penoel D. 1990.** L'aromathérapie exactement. Ed. Roger Jollois, Limoges, 446p.
- Franker C. K., Doll J.P. 1964.** Experimental histomoniasis in gnotobiotic turkeys. II. Effects of some cecal bacteria on pathogenesis. *J. Parasitol.*, 50, 636–640.
- Gabriel I., Mallet S., Sibille P. 2005.** La microflore digestive des volailles: facterus de variation et conséquences pour l'animal. *INRA Prod. Anim.*, 18(5), 309-322.



- Galvani A., Sperling L. 2002.** RNA interference by feeding in *Paramecium*. Trends. Genet., 18, 11-22.
- Garcia A.F., Chang T.H., Benchimol M., Klumpp D.J., Lehker M.W., Alderete J.F. 2003.** Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. Mol. Microbiol., 47, 207-224.
- Garriga M., Pascual M., Monfort J.M., Hugas M. 1998.** Selection of *lactobacilli* for chicken probiotic adjuncts. J. Appl. Microbiol., 84(1), 125-32.
- Gasser R.B., Skinner R., Fadavi R., Richards G., Morris G. 2005.** High-throughput capillary electrophoresis for the identification and differentiation of seven species of *Eimeria* from chickens. Electrophoresis. 26(18), 3479-85.
- Gerbod D., Edgcomb V.P., Noel C., Zenner L., Wintjens R., Delgado-Viscogliosi P., Holder M.E., Sogin M.L., Viscogliosi E. 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.
- Germot A., Philippe H., Le Guyader H. 1996 .** 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.
- Gibbs B. J. 1962.** Occurrence of protozoan parasite *Histomonas meleagridis* in adults and eggs of cecal worm *Heterakis gallinae*. J. Protozool., 9, 288–293.
- Grabensteiner E, Arshad N, Hess M. 2007.** Differences in the in vitro susceptibility of mono-eukaryotic cultures of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis sp.* to natural organic compounds. Parasitol. Res., 101(1),193-9.
- Gray M.W. 1999.** Evolution of organellar genomes. Curr. Opin. Genet. Dev., 9(6), 678-87.
- Gray M.W., Burger G., Lang B.F. 1999.** Mitochondrial evolution. Science, 283(5407), 1476-81.
- Graybill H.W., Smith T. 1920.** Production of fatal blackhead in turkeys by feeding embryonated eggs of *Heterakis papillosa*. J. Exp. Med., 31, 647–655.
- Grosmond G. 2001a.** L'aromathérapie. Bulletin des G.T.V. Hors-série. Elevage et agriculture biologique, 143-145.
- Grosmond G. 2001b.** L'aromathérapie. Bulletin des G.T.V. Hors-série. Elevage et agriculture biologique, 146-148.
- Hackstein J.H., Akhmanova A., Voncken F., van Hoek A., van Alen T., Boxma B., Moon-van der Staay S.Y., van der Staay G., Leunissen J., Huynen M., Rosenberg**



- J., Veenhuis M. 2001.** Hydrogenosomes: convergent adaptations of mitochondria to anaerobic environments. *Zoology (Jena)*, 104(3-4), 290-302.
- Hackstein J.H., Yarlett N. 2006.** Hydrogenosomes and symbiosis. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 41, 117-42.
- Hafez H.M., Hauck R., Luschow D., McDougald L. 2005.** Comparison of the specificity and sensitivity of PCR, nested PCR, and real-time PCR for the diagnosis of histomoniasis. *Avian Dis.*, 49(3), 366-70.
- Hauck R., Luschow D., Hafez H.M. 2006.** Detection of *Histomonas meleagridis* DNA in different organs after natural and experimental infections of meat turkeys. *Avian Dis.*, 50(1), 35-8.
- Häusler T., Stierhof Y.D., Blattner J., Clayton C. 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, 240-251.
- Havenaar M.H., Huis in't Veld R. 1992.** Probiotics : a general view. The lactic acid bacteria. In *The Lactic Acid Bacteria in health and disease*. B.J.B., 151-170.
- Hegngi F.N., Doerr J., Cummings T.S., Schwartz R.D., Saunders G., Zajac A., Larsen C.T., Pierson F.W. 1999.** The effectiveness of benzimidazole derivatives for the treatment and prevention of histomonosis (blackhead) in turkeys. *Vet. Parasitol.*, 81(1), 29-37.
- Henriquez F.L., Richards T.A., Roberts F., McLeod R., Roberts C.W. 2005.** The unusual mitochondrial compartment of *Cryptosporidium parvum*. *Trends Parasitol.*, 21, 68-74.
- Hess M., Kolbe T., Grabensteiner E., Prosl H. 2006.** Clonal cultures of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and a *Blastocystis* sp. established through micromanipulation. *Parasitology*, 133(Pt 5), 547-54.
- Honigberg B. M., Kuldova J. 1969.** Structure of a nonpathogenic histomonad from the cecum of galliform birds and revision of the trichomonad family Monocercomonadidae. *Kirby. J. Protozool.*, 16, 526-535.
- Horimoto T., Kawaoka Y. 2006.** Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends Mol. Med.*, 12(11), 506-14.
- Horner D.S., Hirt R.P., Kilvington S., Lloyd D., Embley T.M. 1996.** Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. *Proc. Biol. Sci.*, 263(1373), 1053.
- Horner D.S., Foster P.G., Embley T.M. 2000.** Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, 17, 1695-1709.



- Hrdý I., Mertens E. 1993.** Purification and partial characterization of malate dehydrogenase (decarboxylating) from *Tritrichomonas foetus* hydrogenosomes. *Parasitology*, 107 (Pt 4), 379-85.
- Hrdý I., Müller M. 1995.** Primary structure of the hydrogenosomal malic enzyme of *Trichomonas vaginalis* and its relationship to homologous enzymes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 42(5), 593-603.
- Hrdý I., Hirt R.P., Dolezal P., Bardonova L., Foster P.G., Tachezy J., Embley T.M. 2004.** *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature*, 432(7017), 618-22.
- Hrdý I., Cammack R., Stopka P., Kulda J., Tachezy J. 2005.** Alternative pathway of metronidazole activation in *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 5033-5036.
- Hu J., McDougald L.R. 2003.** Direct lateral transmission of *Histomonas meleagridis* in turkeys. *Avian Dis.*, 47(2), 489-92.
- Hu J., Fuller L., McDougald L.R. 2004.** Infection of turkeys with *Histomonas meleagridis* by the cloacal drop method. *Avian Dis.*, 48(4), 746-50.
- Humphreys M.J., Ralphs J., Durrant L., Llyod D. 1994.** Hydrogenosomes in trichomonads are calcium stores and have a transmembrane electrochemical potential. *Biochemical Society Transactions*, 22, 324S.
- Jenkins T.M., Gorrell T.E., Müller M., Weitzman P.D. 1991.** Hydrogenosomal succinate thiokinase in *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 892-896.
- Johnson E.H., Windsor J.J., Clark C.G. 2004.** Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Microbiol.*, 17(3), 553-70.
- Kamath R.S., Martinez-Campos M., Zipperlen P., Fraser A.G., Ahringer J. 2001.** Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.*, 2, 1-10.
- Kaneda Y., Tanaka T., Than S. 1990.** Effects of berberine, a plant alkaloid, on the growth of anaerobic protozoa in anoxic culture. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.*, 15(6), 417-423.
- Katinka M.D., Duprat S., Cornillot E., Metenier G., Thomarat F., Prensier G., Barbe V., Peyretailade E., Brottier P., Wincker P., Delbac F., El Alaoui H., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivares CP. 2001.** Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414, 450-453.
- Kemp R.L., Reid W.M. 1965.** Pathogenicity studies on *Trichomonas Gallinarum* in domestic poultry. *Poult. Sci.*, 44, 215-21.



- Kemp R.L. 1974.** Failure of *Histomonas meleagridis* to establish in germfree ceca in normal poult. Avian Dis., 18, 452–455.
- Klose V., Mohnl M., Plail R., Schatzmayr G., Loibner A.P. 2006.** Development of a competitive exclusion product for poultry meeting the regulatory requirements for registration in the European Union. Nutr. Food. Res., 50, 563-571.
- Krescher L., Oesterhelt D. 1982.** Pyruvate:ferredoxin oxido- reductase, new findings on an ancient enzyme. Trends Biochem. Sci., 7, 371–4.
- Kucknoor A., Mundodi V., Alderete J.F. 2005a.** Heterologous expression in *Tritrichomonas foetus* of functional *Trichomonas vaginalis* AP65 adhesin. BMC Mol. Biol., 6(1), 5.
- Kucknoor A., Mundodi V., Alderete J.F. 2005b.** *Trichomonas vaginalis* adherence mediates differential gene expression in human vaginal epithelial cells. Cell. Microbiol., 7(6), 887-97.
- Kucknoor A.S., Mundodi V., Alderete J.F. 2005c.** Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. Infect. Immun., 73(10), 6472-8.
- Kulda J. 1999.** Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. Int. J. Parasitol., 29(2), 199-212.
- Kuo C.C., Tsai L.C., Chin T.Y., Chang G.G., Chou W.Y. 2000.** Lysine residues 162 and 340 are involved in the catalysis and coenzyme binding of NADP(+)-dependent malic enzyme from pigeon. Biochem. Biophys. Res. Commun., 270, 821-825.
- Kurland C.G., Andersson S.G. 2000.** Origin and evolution of the mitochondrial proteome. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64(4), 786-820.
- Kutisova K., Kulda J., Cepicka I., Flegr J., Koudela B., Teras J., Tachezy J. 2005.** Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. Parasitology, 131(Pt 3), 309-19.
- Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Lagier M.J., Tachezy J., Stejskal F., Kutisova K., Keithly J.S. 2003.** Mitochondrial-type iron-sulfur cluster biosynthesis genes (IscS and IscU) in the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. Microbiology. 149(Pt 12), 3519-30.
- Lahti C.J., d'Oliveira C.E., Johnson P.J. 1992.** Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. J. Bacteriol., 174, 6822-30.



- Lahti C.J., Bradley P.J., Johnson P.J. 1994.** Molecular characterization of the  $\alpha$ -subunit *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 66, 309-318.
- Lane D.J., 1991.** 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*, (Stackebrandt E & Goodfellow M,[eds), 115-117.
- Lawn A.M., Rose M.E. 1982.** Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. *J. Parasitol.*, 68(6), 1117-23.
- Lee D. L. 1971.** The structure and development of the protozoan *Histomonas meleagridis* in the male reproductive tract of its intermediate host, *Heterakis gallinarum* (Nematoda). *Parasitology*, 63, 439-445.
- Lehker M.W., Arroyo R., Alderete J.F. 1991.** The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.*, 174(2), 311-8.
- Lesser E. 1961.** In vitro cultivation of *Histomonas meleagridis* free of demonstrable bacteria. *J. Protozool.*, 8, 228-230.
- Lesser E. 1964.** Studies on the in vitro growth of *Histomonas meleagridis* with single species of bacteria. *Helm. Soc. Wash.*, 31, 265-266.
- Lill R., Diekert K., Kaut A., Lange H., Pelzer W., Prohl C., Kispal G. 1999.** The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol. Chem.*, 380(10), 1157-66.
- Lill R., Kispal G. 2000.** Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.*, 25(8), 352-6.
- Lindmark D.G., Müller M. 1973.** Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.*, 248, 7724-7728.
- Lindmark D.G., Müller M., Shio H. 1975.** Hydrogenosome in *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.*, 63, 552-554.
- Liston D.R., Johnson P.J. 1998.** Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today*, 14(7), 261-265.
- Llyod D. 1974.** *The Mitochondria of Microorganisms*, Academic Press, London.
- Lloyd D., Harris J.C., Maroulis S., Wadley R., Ralphs J.R., Hann A.C., Turner M.P., Edwards MR. 2002.** The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. lamblia, duodenalis) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. *Microbiology*, 148(Pt 5), 1349-54.



- Lu J., Hofacre C.L., Lee M.D. 2006.** Emerging technologies in microbial ecology aid in understanding the effect of monensin on necrotic enteritis. *J. Appl. Poult. Res.*, 15, 145-153.
- Luna-Arias J.P., Sanchez T., Herrera-Aguirre M.E., Chavez P., Garrido E., Orozco E. 2003.** Purification of *Entamoeba histolytica* DNA containing organelles (EkhOs): a further characterization. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 50 Suppl, 706-8.
- Lund E.E. 1963.** *Histomonas wenrichi* n. sp. (Mastigophora: Mastigamoebidae), a nonpathogenic parasite of gallinaceous birds. *J. Protozool.*, 10, 401-404.
- Lund E.E. 1966.** Augustine PC, Ellis DJ. Immunizing action of in vitro-attenuated *Histomonas meleagridis* in chickens and turkeys. *Exp. Parasitol.*, 18, 403-407.
- Lund E.E., Augustine P.C., Chute A.M. 1967.** *Histomonas meleagridis* after one thousand *in vitro* passages. *J. Protozool.*, 14, 349-351.
- Lund E.E. 1969.** Histomoniasis. *Adv. vet. Sci. comp. Med.*, 13, 355-390.
- Lund E.E., Chute A.M. 1972.** *Heterakis* and *Histomonas* infections in young peafowl, compared to such infections in pheasants, chickens, and turkeys. *J. Wildl. Dis.* 8(4), 352-8.
- Maeda K., Nagata H., Kuboniwa M., Kataoka K., Nishida N., Tanaka M. 2004.** Characterization of binding of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect. Immun.* 72(9), 5475-7.
- Mai Z., Ghosh S., Frisardi M., Rosenthal B., Rogers R., Samuelson J. 1999** .Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Biol.*, 19(3), 2198-205.
- Malewitz T. D., Runnels R. A., Calhoun L. 1958.** The pathology of experimentally produced histomoniasis in turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 19, 181-185.
- Martin W., Schnarrenberger C. 1997.** The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr. Genet.*, 32(1), 1-18.
- Martin W., Müller M. 1998.** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 5 392(6671), 37-41.
- Martin W. 2005.** The missing link between hydrogenosomes and mitochondria. *Trends Microbiol.*, 13(10), 457-9.
- Martinez-Palomo A. 1993.** Parasitic amoebas of the intestinal tract. *Parasitic Protozoa*, Academic Press, New York, p 65-141.



- Marvin-Sikkema F.D., Kraak M.N., Veenhuis M., Gottschal J.C., Prins R.A. 1993.** The hydrogenosomal enzyme hydrogenase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* sp. L2 is recognized by antibodies, directed against the C-terminal microbody protein targeting signal SKL. *Eur. J. Cell. Biol.*, 61(1), 86-91.
- Matouschek A., Pfanner N., Voos W. 2000.** Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep.*, 1(5), 404-10.
- McDougald L.R., Galloway R.B. 1973.** Blackhead disease: in vitro isolation of *Histomonas meleagridis* as a potentially useful diagnostic aid. *Avian Dis.*, 17(4), 847-50.
- McDougald L.R., Reid W.M. 1978.** *Histomonas meleagridis* and relatives; In parasitic protozoa. Vol II. Ed Kreier JP. New York, USA. 139-161.
- McDougald L.R., Fuller L., Solis J. 1986.** Drug-sensitivity of 99 isolates of coccidia from broiler farms. *Avian Dis.*, 30(4), 690-4.
- McDougald L.R., Da Silva J.M., Solis J., Braga M. 1987.** A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chickens in Brazil and Argentina. *Avian Dis.*, 31(2), 287-92.
- McDougald L.R. 1997.** Other protozoan disease of the intestinal tract. In diseases of poultry. 10th edition Ed Calnek BW. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 890-899.
- McDougald L.R., Hu J. 2001.** Blackhead disease (*Histomonas meleagridis*) aggravated in broiler chickens by concurrent infection with cecal coccidiosis (*Eimeria tenella*). *Avian Dis.*, 45(2), 307-12.
- McDougald L.R., 1998.** Intestinal protozoa important to poultry. *Poult. Sci.*, 77(8), 1156-8.
- McDougald L.R. 2003.** Protozoal infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. *Diseases of Poultry*. 11th edition. Iowa state University Press; p. 973-1023.
- McDougald L.R. 2003.** Other protozoan diseases of the intestinal tract-histomoniasis (blackhead). In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, L.R., McDougald L.R., Swayne, D.E., (Eds.), *Diseases of Poultry*. Iowa State University press, Ames, IA, pp.1001-1006.
- McDougald L.R., Jinghui H. 2004.** The efficacy of some drugs with known antiprotozoal activity against *Histomonas meleagridis* in chickens. *Vet. Parasitol.*, 121, 233-238.
- McDougald L.R. 2005.** Blackhead Disease (Histomoniasis) in Poultry: A Critical review. *Avian Dis.*, 49, 462-476.
- McGuire W.C., Moeller M.W., Morehouse N.F. 1964.** The effect of dimetridazole on the growth and prevention of histomoniasis in poultry. *Poult. Sci.*, 43, 864-871.



- McLaughlin J., Aley S. 1985.** The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. J. Protozool., 32(2), 221-40.
- Morehouse N.F., Rude T.A., Vatne R.D. 1968.** Liver regeneration in blackhead-infected turkeys treated with 1,2-dimethyl-5-nitroimidazole. Avian Dis. 12(1), 85-95.
- Moreno-Brito V., Yanez-Gomez C., Meza-Cervantez P., Avila-Gonzalez L., Rodriguez A., Ortega-Lopez J., Gonzalez-Robles A., Arroyo R. 2005.** A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. Cell. Microbiol., 7, 245-258.
- Mountzouris K.C., Tsirtsikos P., Kalamara E., Nitsch S., Schatzmayr G., Fegeros F. 2007.** Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. Poultry Science, 86(2), 309-17.
- Mukherjee M., Sievers S.A., Brown M.T., Johnson P.J. 2006a.** Identification and biochemical characterization of serine hydroxymethyl transferase in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. Eukaryot. Cell., 5(12), 2072-8.
- Mukherjee M., Brown M.T., McArthur A.G., Johnson P.J. 2006b.** Proteins of the glycine decarboxylase complex in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. Eukaryot. Cell., 5(12), 2062-71.
- Müller M. 1993.** The hydrogenosome. J. Gen. Microbiol., 139, 2879-2889.
- Müller M. 2000.** A mitochondrion in *Entamoeba histolytica*? Parasitol. Today., 16(9), 368-9.
- Mundodi V., Kucknoor A.S., Klumpp D.J., Chang T.H., Alderete J.F. 2004.** Silencing the ap65 gene reduces adherence to vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. Mol. Microbiol., 53(4), 1099-108.
- Musatovova O., Alderete J.F. 1998.** Molecular analysis of the gene encoding the immunodominant phenotypically varying P270 protein of *Trichomonas vaginalis*. Microb. Pathog., 24(4), 223-39.
- Nicholas J. 1972.** Précis d'incubation, d'élevage et de pathologie de dindon. Ed. maloine, Paris ; 237 p.
- Nisbet E.G., Sleep N.H. 2001.** The habitat and nature of early life. Nature, 409(6823), 1083-91.
- Norton R.A. 1997.** Pathogenicity of a strain of *Trichomonas gallinarum* in turkeys and its possible interaction with cecal coccidia. Avian Dis., 41(3), 670-5.



- O'Brien J.L., Lauriano C.M., Alderete J.F. 1996.** Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*. *Microb. Pathog.*, 20, 335-49.
- Pancholi V., Fischetti V.A. 1993.** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A *streptococci* is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 90(17), 8154-8.
- Paul R.G., Williams A.G., Butler R.D. 1990.** Hydrogenosomes in the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *J. Gen. Microbiol.*, 136(10), 1981-9.
- Priest J.W., Hajduk S.L. 1994.** Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 26(2), 179-91.
- Putignani L., Tait A., Smith H.V., Horner D., Tovar J., Tetley L., Wastling J.M. 2004.** Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, 129, 1-18.
- Quon D.V., Delgadillo M.G., Khachi A., Smale S.T., Johnson P.J. 1994.** Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91(10), 4579-83.
- Rasoloson D., Vanáčová S., Tomková E., Rázga J., Hrdy I., Tachezý J., Kulda J. 2002.** Mechanisms of *in vitro* development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology*, 148, 2467-2477.
- Reeves R.E., Warren L.G., Susskind B., Lo HS. 1997.** An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J. Biol. Chem.*, 272(2), 726-31.
- Riordan C.E., Ault J.G., Langreth S.G., Keithly J.S. 2003.** *Cryptosporidium parvum* Cpn60 targets a relict organelle. *Curr. Genet.*, 44(3), 138-47.
- Rodriguez M.A., Baez-Camargo M., Delgadillo D.M., Orozco E. 1996.** Cloning and expression of an *Entamoeba histolytica* NAPD+(-) dependent alcohol dehydrogenase gene. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1306(1), 23-6.
- Rodriguez M.A., Hidalgo M.E., Sanchez T., Orozco E. 1996.** Cloning and characterization of the *Entamoeba histolytica* pyruvate: ferredoxin oxidoreductase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 78(1-2), 273-7.
- Rodriguez M.A., Garcia-Perez R.M., Mendoza L., Sanchez T., Guillen N., Orozco E. 1998.** The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba*. *Microb. Pathog.*, 25(1), 1-10.



- Roger A.J., Clark C.G., Doolittle W.F. 1996.** A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 93(25), 14618-14622.
- Rybicka K., Honigberg B.M., Holt S.C. 1972.** Fine structure of the mastigont system in culture forms of *Histomonas meleagridis* (Smith). Protistologica, 8, 107-120.
- Sánchez L.B., Hashimoto T., Müller M. 1996.** Sequence of a malic enzyme gene of *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol., 82(2), 145-51.
- Savey M., Chermette R. 1981.** Histomoniasis in farm-raised chickens: Clinical report. Point Veterinaire, 12, 68-72.
- Schuster F. L. 1968.** Ultrastructure of *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, a parasitic amebo-flagellate. J. Parasitol., 54, 725-737.
- Shirley M.W. 1975.** Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. Parasitology, 71(3), 369-76.
- Shirley M.W. 1986.** News methods for the identification of species and strains of *Eimeria*, p; 13-35. In L.R. McDougald, P.L Long, and L.P. Joyner (ed.) Research in avian coccidiosis. University of Georgia, Athens.
- Shirley M.W., Bushell A.C., Bushell J.E., McDonald V., Roberts B. 1995.** A live attenuated vaccine for the control of avian coccidiosis: trials in broiler breeders and replacement layer flocks in the United Kingdom. Vet. Rec., 137(18), 453-7.
- Shirley M.W., Bedrnik P. 1997.** Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: Success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. Parasitol.Today., 13(12), 481-4.
- Shirley M.W., Ivens A., Gruber A., Madeira A.M., Wan K.L., Dear P.H., Tomley F.M. 2004.** The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. Trends Parasitol., 20(5), 199-201.
- Shirley M.W., Smith A.L., Tomley F.M. 2005.** The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. Adv. Parasitol., 60, 285-330.
- Shivaprasaud H. L., Senties-Cue G., Chin R. P., Crespo R., Charlton B., Cooper G. 2002.** Blackhead in turkeys, a re-emerging disease? Proc. 4th International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. Ed. H. M.Hafez. pp. 143-144.
- Sigler P.B., Xu Z., Rye H.S., Burston S.G., Fenton W.A., Horwich A.L. 1998.** Structure and function in GroEL-mediated protein folding. Annu. Rev. Biochem., 67, 581-608.
- Smith T. 1895.** An infectious disease among turkeys caused by Protozoa (infectious enterohepatitis). USDA, Bur. Anim. Ind. Bull., 8, 3-27.



- Smith H.W. 1965.** Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J. Pathol. Bacteriol.*, 89, 95-122.
- Spindler L. A. 1967.** Experimental transmission of *Histomonas meleagridis* and *Heterakis gallinarum* by the sow-bug, *Porcellio scaber*, and its implications for further research. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 34, 26-29.
- Steinbüchel A., Müller M. 1986a.** Anaerobic pyruvate metabolism of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes; *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 57-65.
- Steinbüchel A., Müller M. 1986b.** Glycerol, a metabolic end product of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 20(1), 45-55.
- Sutak R., Dolezal P., Fiumera H.L., Hrdy I., Dancis A., Delgadillo-Correa M., Johnson P.J., Muller M., Tachezy J. 2004.** Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 101(28), 10368-73.
- Tachezy J., Sanchez L.B., Müller M. 2001.** Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of *IscS*. *Mol. Biol. Evol.*, 18(10), 1919-28.
- Tan K.S., Ng G.C., Quek E., Howe J., Ramachandran N.P., Yap E.H., Singh M. 2000.** *Blastocystis hominis*: A simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. *Exp. Parasitol.*, 96(1), 9-15.
- Tauxe R.V. 1991.** Forward: transmission of human bacterial pathogens through poultry (banquet address). In *Colonization Control of human bacterial Enteropathogens* ed; Blankenship, L.C. pp. XV-XXIII. New York: Academic press.
- Tielens A.G., Rotte C., van Hellemond J.J., Martin W. 2002.** Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.*, 27(11), 564-72.
- Timmons L., Fire A. 1998.** Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395, 854.
- Tovar J., Fischer A., Clark C.G. 1999.** The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.*, 32(5), 1013-21.
- Tovar J., León-Avila G., Sánchez L.B., Sutak R., Tachezy J., van der Giezen M., Hernández M., Müller M., Lucocq J.M. 2003.** Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 426(6963), 172-6.
- Tyzzer E. E. 1920.** The flagellate character and reclassification of the parasite producing "blackhead" in turkeys—*Histomonas* (gen. nov.) *meleagridis* (Smith). *J. Parasitol.*, 6, 124-131.



- Tyzzer E.E. 1924.** The chicken has a carrier of *Histomonas meleagridis* (Blackhead): the protozoon in its flagellated state. *J. Med. Res.*, 44, 676-678.
- Tyzzer E. E. 1934.** Studies on histomoniasis or blackhead infection, in the chicken and the turkey. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.*, 69, 189–264.
- Ullu E., Tschudi C., Chakraborty T. 2004.** RNA interference in protozoan parasites. *II Microbiol.*, 6(6), 509-19.
- van der Giezen M., Sjollem K.A., Artz R.R., Alkema W., Prins R.A. 1997.** Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome. *FEBS Lett.*, 408(2), 147-50.
- van der Giezen M., Kiel J.A., Sjollem K.A., Prins R.A. 1998.** The hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* is targeted to mitochondria of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.*, 33(2), 131-5.
- van der Giezen M., Slotboom D.J., Horner D.S., Dyal P.L., Harding M., Xue G.P., Embley T.M., Kunji E.R. 2002.** Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *EMBO J.*, 21(4), 572-9.
- van der Giezen M., Birdsey G.M., Horner D.S., Lucocq J., Dyal P.L., Benchimol M., Danpure C.J., Embley T.M. 2003.** Fungal hydrogenosomes contain mitochondrial heat-shock proteins. *Mol. Biol. Evol.*, 20(7), 1051-61.
- van der Giezen M., Cox S., Tovar J. 2004.** The iron-sulfur cluster assembly genes *iscS* and *iscU* of *Entamoeba histolytica* were acquired by horizontal gene transfer. *BMC Evol. Biol.*, 4, 7.
- van der Giezen M., Tovar J. 2005.** Degenerate mitochondria. *EMBO Rep.*, 6, 525-30.
- van Hoek A.H., Akhmanova A.S., Huynen M.A., Hackstein J.H. 2000.** A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. *Mol. Biol. Evol.* 17(1), 202-6.
- Vignais P.M., Billoud B., Meyer J. 2001.** Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 455-501.
- Voncken F., Boxma B., Tjaden J., Akhmanova A., Huynen M., Verbeek F., Tielens A.G., Haferkamp I., Neuhaus H.E., Vogels G., Veenhuis M., Hackstein J.H. 2002.** Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. *Mol. Microbiol.*, 44(6), 1441-54.
- Wehr E.E., Farr M.M., McLoughlin D.K. 1958.** Chemotherapy of blackhead in poultry. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 132, 439-445.



- Weiland O.H. 1983.** The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 96, 123–70.
- Whatley J.M., John P., Whatley F.R. 1979.** From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 204(1155), 165-87.
- Williams B.A., Hirt R.P., Lucocq J.M., Embley T.M. 2002.** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*, 418(6900), 865-9.
- Williams B.A., Keeling P.J. 2003.** Cryptic organelles in parasitic protists and fungi. *Adv. Parasitol.*, 54, 9-68.
- Williams K., Lowe P.N., Leadlay P.F. 1987.** Purification and characterization of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Biochem. J.*, 246(2), 529-36.
- Williams R.B. 1998.** Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int. J. Parasitol.*, 28(7), 1089-98.
- Williams R.B. 1999.** A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int. J. Parasitol.*, 29(8), 1209-29.
- Williams R.B. 2002.** Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002). *Avian Dis.*, 46(4), 775-802.
- Williams R.B. 2003.** Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathol.*, 31(4), 317-53.
- Yang Z., Floyd D.L., Loeber G., Tong L. 2000.** Structure of a closed form of human malic enzyme and implications for catalytic mechanism. *Nat. Struct. Biol.*, 7(3), 251-7.
- Yarlett N., Orpin C.G., Munn E.A., Yarlett N.C., Greenwood C.A. 1986.** Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem. J.*, 3, 729-39.
- Yarlett N. 1994.** Fermentation product generation in rumen *chytridiomycetes*. Pages 129-146 in Mountfort DO, Orpin CG, eds. *Anaerobic fungi*. New York : marcel Dekker.
- Yarlett N., Hackstein J.H.P. 2005.** Hydrogenosomes: one organelle, multiple origins. *BioScience*, 55 (8), 657-668.
- Zayat M. 1999.** L'aromathérapie c'est pas sorcier. Guide des ressources n°8. Ed. Swaa, 29-31.
- Zemek J., Valent M., Podova M., Kosikova B., Joniak D. 1987.** Antimicrobial properties of aromatic compounds of plant origin. *Folia Microbiol.*, 32, 421-425.



**Zenner L., Callait M.P., Granier C., Chauve C. 2003.** *In vitro* effect of essential oils from cinnamomum aromaticum, citrus limon and allium sativum on two intestinal flagellates of poultry, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Histomonas meleagridis*. Parasite, 10, 153-157.

