

Université  
de Liège



Université de Liège

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Vie

**Analyses biochimiques, protéomiques et  
transcriptomiques du métabolisme  
énergétique chez l'algue secondaire verte  
*Euglena gracilis* (Euglenozoa, Excavata).**

**Emilie Perez**

**Thèse déposée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences**

**Année académique 2014 – 2015**

**Promoteur** : Pierre Cardol – Laboratoire de Génétique et Physiologie des Microalgues

**Co-promoteur** : Denis Baurain – Laboratoire de Phylogénomique des Eucaryotes



Université  
de Liège



Université de Liège

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Vie

---

# **Analyses biochimiques, protéomiques et transcriptomiques du métabolisme énergétique chez l'algue secondaire verte *Euglena gracilis* (Euglenozoa, Excavata).**

**Emilie Perez**

**Thèse déposée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences**

**Année académique 2014 – 2015**

**Jury de thèse :**

M. Pierre CARDOL (Promoteur, ULg)

M. Denis BAURAIN (Co-Promoteur, ULg)

M. Moreno GALLENi (Président, ULg)

M. Jacques DOMMES (ULg)

M. Fabrice FRANCK (ULg)

M. Patrick MEYER (ULg)

M. Marc BOUTRY (UCL)

M. Henner BRINKMANN (Leibniz-Institut DSMZ, Allemagne)

Cette recherche a été financée par une bourse de doctorat FRIA (FRS-FNRS).



## RESUME

L'ATP est la principale source d'énergie du vivant. Chez les organismes eucaryotes photosynthétiques, il est majoritairement produit par les ATP synthétases, dont l'activité est liée aux chaînes de transport d'électrons enchâssées dans la membrane interne de la mitochondrie et dans les membranes thylakoïdiennes du chloroplaste. Le fonctionnement des chaînes de transport d'électrons est directement corrélé à la disponibilité en pouvoir réducteur, principalement le NAD(P)H. Ce pouvoir réducteur est issu de la dégradation des structures carbonées. Il peut notamment provenir de la dégradation des sucres produits par le cycle de Calvin dans le chloroplaste et dégradés par la glycolyse dans le cytoplasme. Les produits de cette dégradation sont ensuite utilisés par le cycle de Krebs dans la mitochondrie. Dans une moindre mesure, la dégradation des acides gras et des acides aminés permet également de générer du pouvoir réducteur. Ainsi, la production d'énergie par les cellules eucaryotes photosynthétiques repose sur un ensemble de voies métaboliques dont le fonctionnement est interconnecté ; il s'agit du métabolisme énergétique.

*Euglena gracilis* est une algue secondaire verte, ce qui signifie qu'elle a acquis son chloroplaste par endosymbiose entre son ancêtre Euglenozoa phagotrophe et une algue verte de type prasinophyte. Cet évènement d'endosymbiose secondaire est en quelque sorte une répétition de l'évènement d'endosymbiose primaire beaucoup plus ancien survenu entre l'ancêtre des Archaeplastida et une cyanobactérie. Quel que soit l'évènement d'endosymbiose, il s'accompagne de transferts de gènes du génome du symbiote vers le génome nucléaire de l'hôte ; on parle alors d'EGT (pour Endosymbiotic Gene Transfer). De plus, il existe des transferts de gènes horizontaux qui se produisent en dehors de l'évènement d'endosymbiose ; on parle alors de LGT (pour Lateral Gene Transfer). Ainsi, les algues telles qu'*Euglena gracilis* sont dites « complexes » car il s'agit de chimères d'au moins deux groupes eucaryotes ; il ne serait donc pas surprenant d'y trouver des voies métaboliques inédites. Ce constat nous a donc amenés à la question suivante : dans quelle(s) mesure(s) l'intégration du chloroplaste a-t-elle influé sur le métabolisme énergétique suite à l'endosymbiose secondaire chez *Euglena gracilis* ?

Nous avons abordé cette question sous trois angles :

1. l'analyse biochimique de l'influence des conditions de culture sur le métabolisme énergétique d'*Euglena gracilis* ;
2. l'analyse protéomique de la composition atypique en sous-unités des complexes de sa chaîne respiratoire mitochondriale ;
3. les analyses protéomiques et transcriptomiques de son métabolisme énergétique.

*Euglena gracilis* pouvant croître sur une large variété de milieux, nous avons testé l'influence de plusieurs d'entre eux sur son métabolisme énergétique, en nous intéressant principalement à la respiration et à la photosynthèse. Il ressort de nos résultats qu'*Euglena gracilis* requiert une source de carbone exogène, organique ou inorganique, pour atteindre un taux de croissance optimal. En outre, quelle que soit la source de carbone testée, l'augmentation de sa concentration initiale stimule la respiration. En revanche, une concentration trop élevée en carbone organique induit la perte des chlorophylles et la dégénérescence réversible du chloroplaste. Si l'intensité lumineuse ne semble pas avoir d'effet drastique sur le métabolisme énergétique d'*Euglena gracilis*, la présence ou l'absence de lumière joue un rôle important. A l'obscurité, comme en présence d'une concentration trop élevée en carbone organique, la synthèse des chlorophylles est stoppée, entraînant par conséquent une diminution de l'activité photosynthétique. Il semble alors que la proportion en complexes photosynthétiques diminue alors que celle des complexes mitochondriaux augmente, suggérant une possible compensation au niveau de la production énergétique par la respiration.

Ensuite, l'analyse protéomique des complexes mitochondriaux isolés, sous forme native ou après séparation de leurs sous-unités constitutives, nous a permis de mettre en évidence une composition atypique en sous-unités chez *Euglena gracilis*, très proche de celle décrite chez les kinétoplastidés. En effet, plus de 80 sous-unités additionnelles « spécifiques » ont été décrites chez les kinétoplastidés, principalement chez *Trypanosoma brucei*. Si ces sous-unités se retrouvaient aisément au sein des autres espèces kinétoplastidées, elles ne semblaient pas partagées par les autres organismes eucaryotes. Or, nos analyses protéomiques et bioinformatiques nous ont permis de mettre en évidence que plus de la moitié de ces sous-unités se retrouvent chez *Euglena gracilis*, en plus ou en remplacement de sous-unités additionnelles eucaryotes classiques. Cependant, la grande divergence d'un certain nombre de ces sous-unités eucaryotes classiques ne nous permet pas d'affirmer que l'ensemble des sous-unités additionnelles communes aux Euglenozoa est effectivement spécifique à ce groupe ; il pourrait s'agir de sous-unités extrêmement divergentes. La haute masse moléculaire apparente de certains des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale d'*Euglena gracilis* tend à confirmer qu'au moins une partie de ces sous-unités additionnelles sont bien spécifiques aux Euglenozoa.

Enfin, nos analyses protéomiques et transcriptomiques d'*Euglena gracilis* dans différentes conditions de culture ont permis de fournir (i) un transcriptome plus complet grâce auquel davantage de séquences protéiques ont pu être annotées et (ii) des données d'abondance relative en fonction des conditions de culture testées pour un ensemble considérable de protéines et de transcrits. De ces données, nous avons pu déterminer les grandes lignes du métabolisme énergétique général d'*Euglena gracilis*, et plus spécifiquement du métabolisme énergétique mitochondrial. On observe alors que les protéines impliquées dans la photosynthèse sont majoritairement plus abondantes en

absence de source de carbone, organique ou inorganique, alors que les protéines impliquées dans la respiration sont majoritairement plus abondantes en présence d'une source de carbone. Si les enzymes liées à l'assimilation du carbone organique et celles du cycle de Krebs sont stimulées par la présence d'une source de carbone, leur abondance diminue à lumière modérée. Par ailleurs, les enzymes impliquées dans le cycle du glyoxylate et dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras ne semblent stimulées qu'en présence d'acétate, à l'obscurité ou faible lumière. Quant aux enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés et dans la voie des pentoses-phosphates, leur abondance n'est élevée qu'en présence d'une source de carbone inorganique.

En conclusion, les analyses effectuées au cours de cette thèse permettent une meilleure compréhension du métabolisme énergétique, et notamment du métabolisme mitochondrial, chez *Euglena gracilis*. Elles ont également permis l'acquisition d'un ensemble conséquent de données protéomiques et transcriptomiques qui permettront tant de poursuivre l'analyse du métabolisme énergétique général que d'investiguer l'origine phylogénétique des protéines impliquées dans les différentes voies de ce métabolisme.





## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mes promoteurs Pierre Cardol et Denis Baurain pour, d'abord, m'avoir proposé un sujet de thèse qui m'a permis de faire tout ce que j'aimais sans avoir à choisir entre la biochimie et la bioinformatique et, ensuite, m'avoir encouragée à le concrétiser. Merci pour votre encadrement et votre sympathie, ainsi que pour avoir partagé avec moi vos expériences respectives de chercheurs. Ces cinq années passées à vos côtés m'ont apporté énormément, tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel.

Je tiens également à remercier Claire Remacle pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de Génétique et Physiologie des Microalgues, dans lequel j'ère depuis mai 2009 (rien que ça). Je remercie aussi toute son équipe (actuelle et passée) avec qui j'ai partagé de très bons moments : Benjamin Bailleul, Nicolas Berne, Nadine Coosemans, Franceline Duby, Barbara Emonds-Alt, Damien Godaux, Véronique Larosa, Simon Massoz, Charlotte Plancke, Michèle Radoux, Hélène Vigeolas et Rémi Willamme ; ainsi que tous les étudiants, stagiaires ou mémorants, qui ont chacun apporté leur touche de bonne humeur (une pensée particulière pour Gwenaëlle Gain, fidèle à l'euglène).

Merci aussi à ceux que j'ai rencontrés au sein du laboratoire de Phylogénomique des Eucaryotes et, plus particulièrement, Rosa Gago et Luc Cornet.

Mais si j'ai finalisé cette thèse (ou du moins, si je l'ai finalisée sans m'être coupée du monde), c'est aussi grâce à mes amis. Je remercie donc Kwan-Yu, toujours au fait des expos, conventions ect de Liège et d'ailleurs, et compagnon enthousiaste de city-trip. Véro (encore !), « Petit-Futé » liégeoise (non, Liège ne se résume pas à son « Carré »), expatriée en Italie (pour la bonne cause) qui ne manque pas de déjà connaître les endroits incontournables où se remplir le ventre de bonnes choses, et qui est toujours de bon (d'excellent) conseil.

Il y a aussi ceux que j'ai laissés dans le sud, Marjorie et Julien (mais Lyon, c'est déjà le Nord) et Virgine et Alexis (et leur petite Chloé). Marjo, je me souviendrai toujours de notre première conversation où tu affirmais vouloir devenir généticienne (l'ADN est tellement fascinant !) alors que je ne jurais que par les mathématiques. Treize ans plus tard (merci le coup de vieux...), c'est toi la matheuse et moi la biologiste. Que de rebondissements ! Vivi, avec toi ne comptons pas les années (c'est moi qui ai connu Arnaud la première, je ne lâcherai rien !), on a grandi ensemble, on sait tout (a priori) l'une de l'autre, et pourtant, on a encore et toujours tant à partager. Merci à toutes les deux d'avoir toujours été, et d'être encore, là pour moi, quelle que soit la distance. Et merci aussi (mais le mot est faible) de m'avoir accordé une place de choix dans les grands moments de vos vies.

Et, il y a celles rencontrées au détour d'un forum, dispersées aux quatre coins du monde, mais avec qui on trouve toujours un créneau pour passer un bon moment, même si ce doit être qu'une fois par an (heureusement Skype existe !). Merci donc aux Chlexeuses (on assume), aux FAMES (on y croit), Aurélie, Florie, Marie et Séverine. Et, vivement l'Angleterre !

Enfin, je souhaite remercier ma famille. D'abord mes parents, Michel et Domi, qui m'ont toujours fait confiance et soutenue dans mes choix, bons ou mauvais, et qui m'ont laissée partir dans le Noooooord (folle que je suis !). Ensuite, mon petit frère (plus si petit que ça), Pierre, convaincu que j'ai la science infuse et qui me fait pourtant découvrir encore plein de choses. Mes tantes, Marie-Pierre, Brigitte et Lydia, qui sont pour moi des exemples et auprès de qui je sais pouvoir trouver conseil. Mon grand-père, Jean, simplement parce que je suis sa petite-fille adorée ! Mes cousins (et cousine), Julien, Matthieu, Sylvain et Sintya qui ne manquent pas d'égayer les réunions de famille. Et, Muriel et Jean-Louis, parce que c'est tout comme ! Merci à tous de m'entourer et de m'avoir permis d'arriver jusqu'ici.

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
1. Diversité des eucaryotes	1
1.1 Opisthokonta et Amoebozoa (Amorphea)	2
1.2 Archaeplastida (ou Plantae)	2
1.3 SAR	3
1.4 CCTH	3
1.5 Excavata	3
2. Endosymbioses	9
2.1 Endosymbioses primaires	9
2.1.1 Evolution de la mitochondrie	9
2.1.1.1 La mitochondrie	11
2.1.1.2 L'hydrogénosome	11
2.1.1.3 Le mitosome	12
2.1.2 Evolution du plaste des Archaeplastida	13
2.2 Endosymbioses multiples (secondaires et tertiaires)	13
3. Métabolisme énergétique	15
3.1 Le cycle de Krebs	15
3.2 Le cycle du glyoxylate	15
3.3 La chaîne respiratoire	16
3.3.1 Le complexe I ou NADH:ubiquinone oxydoréductase	17
3.3.2 Le complexe II ou succinate:ubiquinone oxydoréductase	18
3.3.3 Le complexe III (complexe $bc_1$ ) ou ubiquinol:cytochrome <i>c</i> oxydoréductase	18
3.3.4 Le complexe IV ou cytochrome <i>c</i> oxydase	19
3.3.5 L'ATP synthétase	20
3.3.6 Les voies alternatives	21
3.3.6.1 NAD(P)H déshydrogénases alternatives (ou de type II)	21
3.3.6.2 Oxydase(s) alternative(s) ou AOX	21
3.3.6.3 Les protéines découplantes ou UCP	22
3.4 La photosynthèse	22
3.4.1 Le photosystème II	23
3.4.2 Le complexe cytochrome $b_6f$	24
3.4.3 Le photosystème I	24
3.4.4 L'ATP synthétase	24
3.5 Le cycle de Calvin	25

3.6 Autres voies cataboliques	26
3.6.1 La glycolyse	26
3.6.2 La voie des pentoses-phosphates	27
3.6.3 La $\beta$ -oxydation	28
3.6.4 La dégradation des acides aminés	30
<b>4. <i>Euglena gracilis</i></b>	<b>31</b>
4.1 Généralités	31
4.2 Particularités du métabolisme énergétique	33
4.2.1 La chaîne respiratoire mitochondriale d' <i>Euglena gracilis</i>	33
4.2.2 Autres voies métaboliques	33
But du travail	35

## **CHAPITRE 1 : INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LE METABOLISME**

<b>ENERGETIQUE D'<i>EUGLENA GRACILIS</i></b>	<b>39</b>
Introduction	39
Matériel et méthodes	41
1. Culture cellulaire	41
1.1 Matériel cellulaire et conditions de culture	41
1.2 Croissance cellulaire	41
2. Extraits protéiques et nucléotidiques	41
2.1 Extraction des fractions membranaire et soluble	41
2.2 Purification des mitochondries	42
2.3 Extractions des ARN totaux	42
3. Dosages	43
3.1 Dosage des protéines par Bradford	43
3.2 Dosage des ARN totaux	43
3.3 Dosage des chlorophylles	44
3.4 Dosage des pigments à l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	44
4. Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide en conditions natives (BN-PAGE)	44
4.1 Séparation des complexes	44
4.2 Mise en évidence du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale	45
4.3 Mise en évidence de l'ATP synthétase de la chaîne respiratoire mitochondriale	45
4.4 Coloration au bleu de Coomassie	46
5. Mesures de respiration et de photosynthèse	46

Résultats	47
1. Etude de la croissance et de la composition en pigments d' <i>Euglena gracilis</i> en fonction des conditions de culture	47
1.1 Croissance	47
1.2 Blanchiment	49
1.3 Profils pigmentaires	51
2. Etude de la respiration et de la photosynthèse chez <i>Euglena gracilis</i> en fonction des conditions de culture	51
2.1 Respiration	52
2.2 Photosynthèse	53
2.3 Les complexes membranaires	55
Discussion	58

<b>CHAPITRE 2 : LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE DE L'ALGUE SECONDAIRE VERTE <i>EUGLENA GRACILIS</i> PARTAGE DE NOMBREUSES SOUS-UNITÉS ADDITIONNELLES AVEC LES TRYPANOSOMATIDAE PARASITES.</b>	<b>65</b>
Avant-propos	65
Publication	67
Figures supplémentaires	79

<b>CHAPITRE 3 : ANALYSES PROTEOMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE PRELIMINAIRES DU METABOLISME ENERGETIQUE CHEZ <i>EUGLENA GRACILIS</i>.</b>	<b>83</b>
Introduction	83
Matériel et méthodes	85
1. Analyse du transcriptome	85
1.1.1 Normalisation à la DSN	85
1.1.1.1 Préparation du mélange réactionnel	85
1.1.1.2 Traitement à la DSN	85
1.1.1.3 Purification des fragments d'ADN traités à la DSN	86
1.1.1.4 Enrichissement en fragments d'ADN	86
1.1.1.5 Purification des fragments d'ADN enrichis	86
1.1.2 Séquençage Illumina	87
1.2 Assemblage du transcriptome	87
1.3 Quantification et annotation fonctionnelle des transcrits	87
1.4 Annotation taxonomique	88
2. Analyses protéomiques	89
2.1 Analyse iTRAQ	89

2.1.1 Spectrométrie de masse	89
2.1.1.1 Précipitation des protéines	89
2.1.1.2 Digestion des protéines et marquage iTRAQ	90
2.1.1.3 Chromatographie en phase inverse	90
2.1.1.4 Analyse MS	91
2.2 Annotation des protéines	91
2.2.1 Annotation taxonomique	91
2.2.2 Annotation fonctionnelle	92
Résultats	93
1. Composition du transcriptome	93
2. Analyse taxonomique	97
3. Analyse fonctionnelle	98
3.1 Protéomique soluble	98
3.2 Protéomique membranaire	101
3.3 Protéomique mitochondriale	103
3.4 Transcriptomique	107
3.4.1 Abondance des transcrits des séquences identifiées en iTRAQ	107
3.4.2 Abondance des transcrits les plus variables entre conditions	110
Discussion	111
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>117</b>
1. <i>Euglena gracilis</i> et les Euglenozoa : une chaîne respiratoire atypique ?	117
2. Les particularités du métabolisme énergétique d' <i>Euglena gracilis</i>	124
3. Les données transcriptomiques	128
Perspectives	130
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>133</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>145</b>

# INTRODUCTION GENERALE





## 1. Diversité des eucaryotes

La phylogénie, qui consiste à étudier les relations de parenté entre les êtres vivants, permet la classification des organismes vivants. Dès la publication de la théorie de l'évolution par Charles Darwin en 1859 dans « De l'origine des espèces » [1], les biologistes se sont employés à déterminer les liens de parenté entre les organismes en fonction de différents critères, à commencer par les comparaisons morphologiques, puis à partir de la fin des années 1960 et l'essor de la biologie moléculaire, par des comparaisons moléculaires [2]. Depuis lors, de nombreuses classifications ont été proposées, regroupant les organismes en divers assemblages de haut niveau. Ainsi, le modèle de Carl Woese reconnaît trois domaines : Archaea (= Archaeobacteria), Bacteria (= Eubacteria) et Eucarya (= Eukaryota) [3]. Les plus récentes divisent le domaine eucaryote en cinq super-groupes monophylétiques (Figure 1) : Opisthokonta, Amoebozoa, Archaeplastida, SAR (Stramenopiles, Alveolata et Rhizaria) et Excavata, et en plusieurs lignées indépendantes, parmi lesquelles les plus étudiées sont regroupées dans un groupe *ad hoc* : CCTH (Cryptophyta, Centrohelida, Telsonemida et Haptophyta) [4, 5].

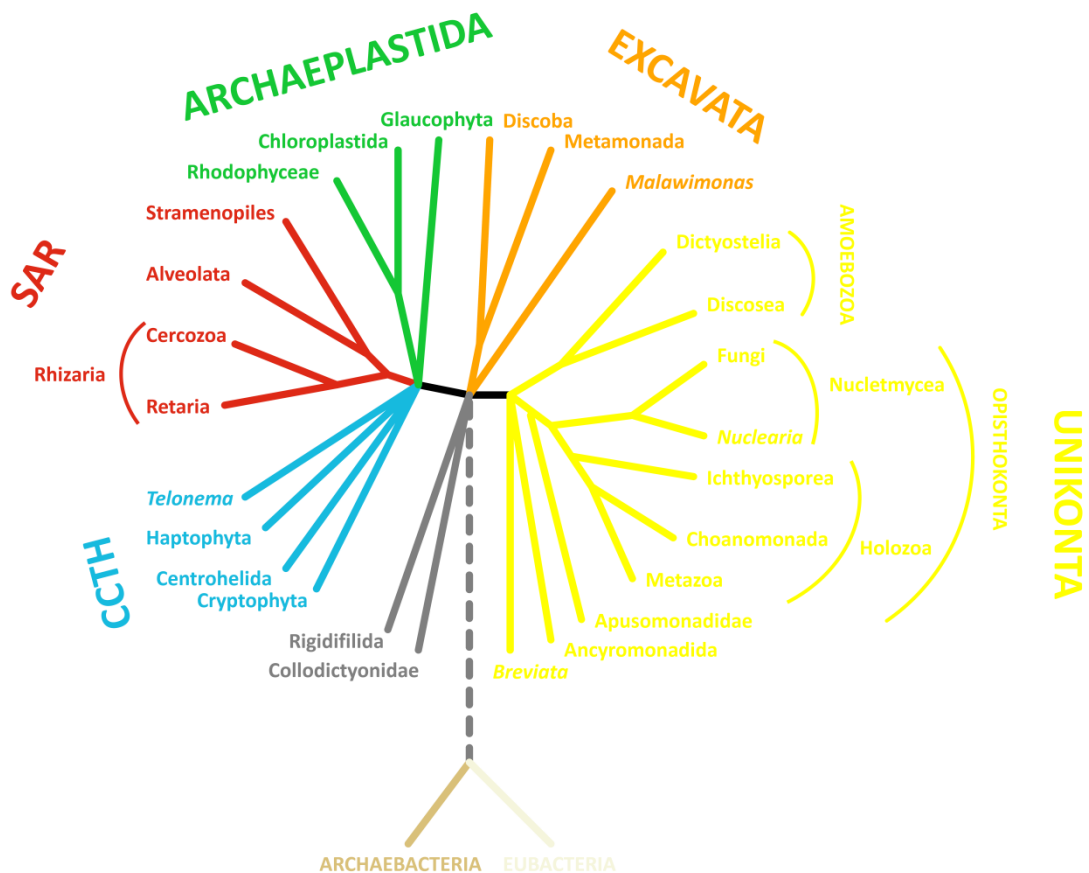


Figure 1 : Diversité des eucaryotes. Adapté de Adl *et al.* 2012.

### 1.1 Opisthokonta et Amoebozoa (Amorphea)

Les Opisthokonta et Amoebozoa sont souvent associés en un groupe appelé Amorphea (ou Unikonta), auquel s'ajoutent les taxons Apusomonadidae, *Breviata*, et probablement Ancyromonadida [4].

Les Opisthokonta regroupent à la fois des organismes pluricellulaires et unicellulaires. Ils se divisent en deux groupes : les Holozoa et les Nucletmycea (ou Holomycota). Au sein des Holozoa, on retrouve les Metazoa (ou animaux, tels que *Homo sapiens*), les Choanomonada (unicellulaires formant parfois des colonies, tels que *Monosiga brevicollis*) et les Ichthyosporea (unicellulaires principalement parasites des vertébrés et des invertébrés marins). Parmi les Nucletmycea, on retrouve principalement les champignons vrais (ou Fungi, tels que *Saccharomyces cerevisiae*) et trois genres de protistes, dont *Nuclearia* [4, 5]. Il s'agit du groupe d'eucaryotes le plus étudié et pour lequel on dispose du plus grand nombre de données moléculaires : 5 938<sup>1</sup> génomes séquencés sont disponibles sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), dont principalement des génomes de Metazoa (5 295 génomes séquencés).

Les Amoebozoa sont des organismes unicellulaires au sein desquels on retrouve les amibes et d'autres organismes amiboïdes (myxomycètes et amiboflagellés). Ce super-groupe présente une variété considérable de protistes aux morphologies diverses, parfois parasites (*Acanthamoeba castellanii*, Discosea, qui provoque des kératites), avec ou sans mitochondrie, avec un ou plusieurs noyaux etc. Il possède cependant beaucoup moins de représentants (parmi lesquels le myxomycète modèle *Dictyostelium purpureum*, Dictyostelia) que celui des Opisthokonta et seulement 14 génomes séquencés sont actuellement disponibles sur le site du NCBI (dont 7 génomes de *Dictyostelium*).

### 1.2 Archaeplastida (ou Plantae)

Les Archaeplastida regroupent l'ensemble des organismes issus de l'endosymbiose primaire entre l'ancêtre phagotrophe du groupe et une cyanobactérie. Le chloroplaste peut parfois être réduit mais il possède dans tous les cas de la chlorophylle *a*. On retrouve au sein de ce super-groupe trois branches : les Glaucophyta (possédant seulement la chlorophylle *a* et des phycobilines), les Rhodophyta (ou algues rouges, telles que *Cyanidioschyzon merolae*, possédant la chlorophylle *a*, des caroténoïdes et des phycobilines) et les Chloroplastida (ou Viridiplantae = plantes vertes, présentant la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b*), qui réunissent les Charophyta (ou Streptophyta parmi lesquels on retrouve les plantes terrestres) et les Chlorophyta (ou algues vertes, telles que *Chlamydomonas reinhardtii*) [4]. 729 génomes sont actuellement disponibles sur le site du NCBI dont 637 uniquement d'Embryophyta (plantes terrestres).

---

<sup>1</sup> Ensemble des génomes disponibles dans la section « Genome » du NCBI.

### 1.3 SAR

Le super-groupe des SAR réunit Stramenopiles, Alveolata et Rhizaria. Les Stramenopiles sont des organismes unicellulaires ou multicellulaires aux morphologies très variées, dont certaines espèces ont acquis la photosynthèse par endosymbiose secondaire entre leur ancêtre phagotrophe et une algue rouge. Les Stramenopiles photosynthétiques présentent de la chlorophylle *c* que l'on ne retrouve dans aucun membre des Archaeplastida, et sont parmi les organismes les plus étudiés à l'heure actuelle étant donné leur rôle dans la photosynthèse à l'échelle mondiale (principalement les diatomées). Les lignées Stramenopiles les plus étudiées sont les Phaeophyceae (= algues brunes), les Diatomea (= Bacillariophyceae ou diatomées), les Oomycetes et le genre *Blastocystis*. Les Alveolata sont des organismes exclusivement unicellulaires aux morphologies variées, dont le caractère commun est d'avoir des alvéoles corticales. Les trois principales lignées des Alveolata sont les Dinoflagellata (= dinophytes), les Apicomplexa et les Ciliophora (= ciliés). Au sein des Alveolata, certains organismes ont aussi acquis un chloroplaste par endosymbiose secondaire (voire tertiaire) entre leur ancêtre phagotrophe et une algue à plaste rouge. Enfin, les Rhizaria sont un groupe d'organismes unicellulaires, dont les principales lignées sont les Cercozoa, au sein desquels se retrouvent les Chlorarachniophyta ayant acquis un chloroplaste par endosymbiose secondaire avec une algue verte (voir 2.2), et les Retaria [4].

104 génomes de Stramenopiles sont actuellement disponibles sur le site du NCBI, dont 20 de Diatomea, 35 d'Oomycetes et 27 de Phaeophyceae. 75 génomes d'Alveolata sont disponibles, dont principalement des génomes d'Apicomplexa (53), et seulement 5 génomes de Rhizaria.

### 1.4 CCTH

Les CCTH sont un super-groupe *ad hoc* au sein duquel sont réunis différents genres ou lignées eucaryotes, à savoir : les Centrohelida, les Cryptophyta, le genre *Telonema* et les Haptophyta. Certaines espèces de cryptophytes et toutes les haptophytes possèdent un chloroplaste acquis par endosymbiose secondaire avec une algue rouge (voir 2.2) ce qui, pendant des années, a entraîné leur classement avec les SAR à tort (ancien groupe des Chromalveolata) [4].

Les données disponibles sur les organismes groupés au sein du groupe CCTH sont très parcellaires, avec seulement 4 génomes de Cryptophyta et 4 génomes d'Haptophyta disponibles sur le site du NCBI.

### 1.5 Excavata

Les Excavata comprennent deux groupes, les Discoba et les Metamonada, auxquels est parfois ajouté le genre *Malawimonas*. Cependant, cet ajout se fait sur base de comparaisons

morphologiques, alors que les études phylogénétiques actuelles ne confirment pas l'appartenance du genre *Malawimonas* aux Excavata [6, 7].

Le groupe des Metamonada comprend trois lignées : les Parabasalia (tels que *Trichomonas vaginalis* et *Tritrichomonas foetus*), les Fornicata (tels que *Giardia intestinalis*) et les Preaxostyla (tels que *Trimastix marina*). Le groupe des Discoba contient également trois lignées : les Jakobida (tels que *Reclinomonas americana* et *Andalucia godoyi*), les Heterolobosea (tels que *Naegleria fowleri* et *Naegleria gruberi*) et les Euglenozoa, au sein desquels se retrouvent les kinétoplastidés (tels que *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* et *Crithidia fasciculata*), les diplomémidés (tels que *Diplonema papillatum*) et les euglénidés (tels que *Euglena gracilis* et *Euglena longa*) (Figure 2).

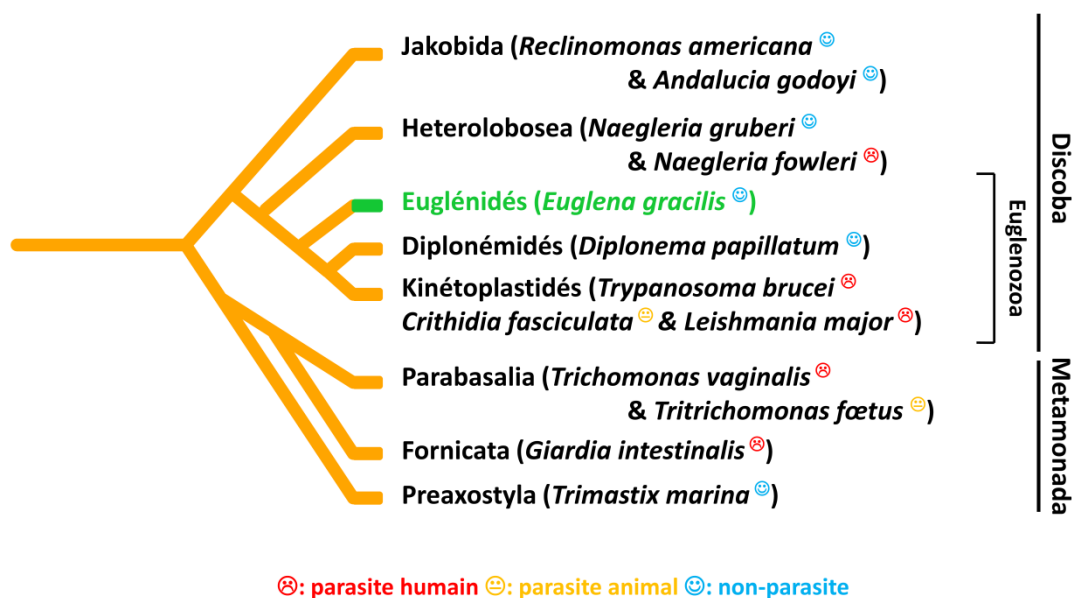
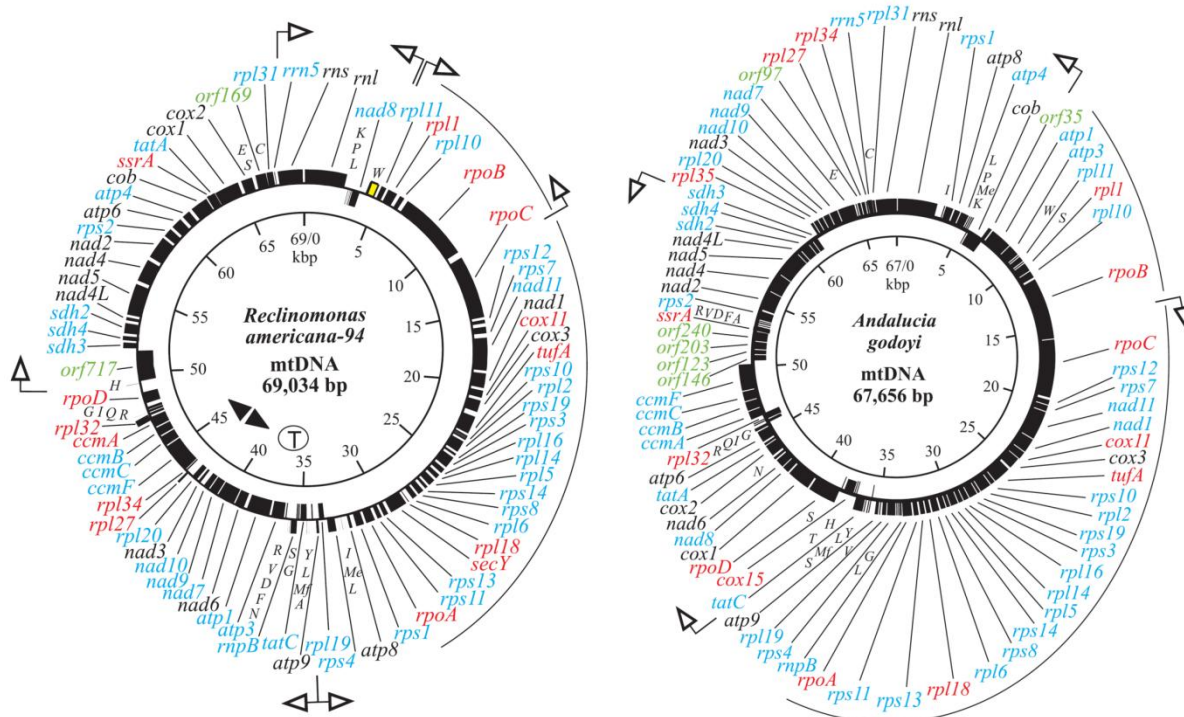


Figure 2 : Diversité des Excavata. Adapté de Walker *et al.* 2011.

Les Excavata sont donc un ensemble hétérogène de protistes dont certains sont hétérotrophes libres (ex. *Diplonema papillatum*), d'autres des parasites des animaux et/ou de l'Homme, et d'autres enfin des photosynthétiques mixotrophes (ex. *Euglena gracilis*) [4]. Parmi les organismes parasitaires excavés les plus connus, citons *Trypanosoma brucei* responsable de la maladie du sommeil en Afrique et *Trypanosoma cruzi* responsable de la maladie de Chagas en Amérique du sud, *Leishmania major* responsable de la leishmaniose, *Trichomonas vaginalis* qui cause la trichomonase chez l'Homme et *Tritrichomonas foetus* qui cause cette même maladie chez les bovins, mais aussi *Naegleria fowleri* ou « l'amide mangeuse de cerveau » responsable de la méningo-encéphalite amibienne primaire chez l'Homme, *Giardia intestinalis* responsable de la lambliaose ou « fièvre du castor » chez l'Homme, et *Crithidia fasciculata* responsable d'une infection des intestins chez le moustique [5].

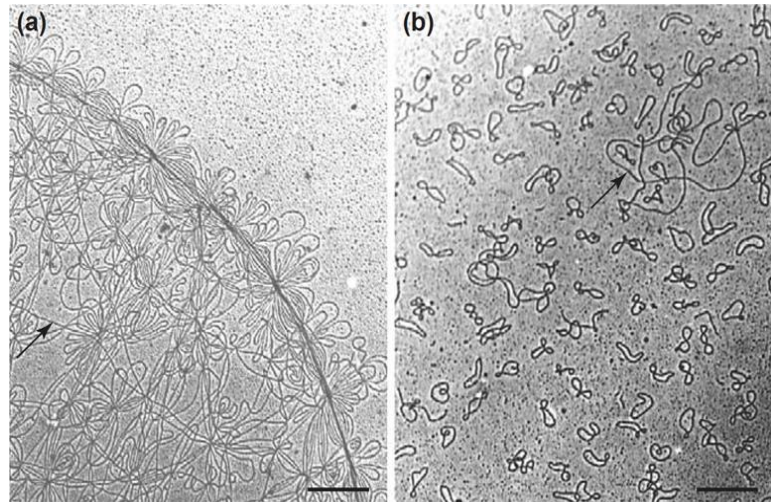


**Figure 3 : Génomes mitochondriaux des Jakobidés *Reclinomonas americana* et *Andaluca godoyi*. Burger et al. 2013.**

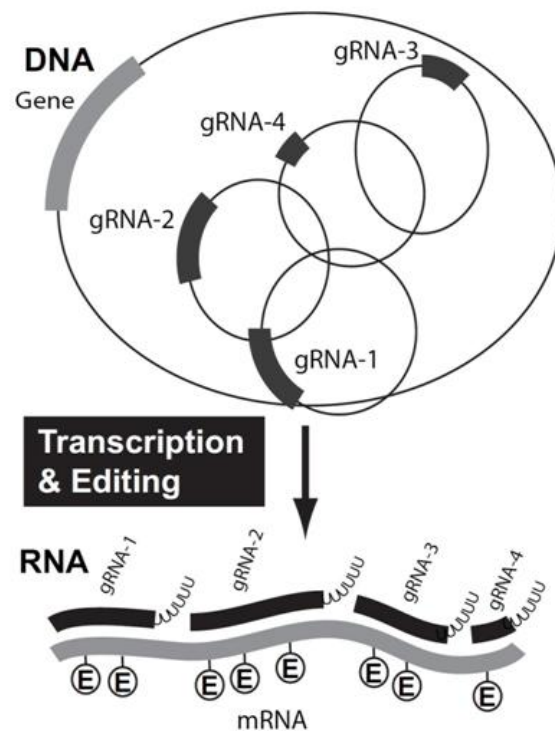
Outre cette diversité, les Excavata présentent également une grande variété au niveau des mitochondries et organites apparentés (hydrogénosomes et mitosomes). Les trois lignées des Metamonada ne possèdent pas de mitochondries, mais des mitosomes pour les Fornicata et Preaxostyla et un hydrogénosome pour les Parabasalia [8]. Au sein des Discoba, les Heterolobosea et les Jakobidés disposent de mitochondries riches en gènes, la mitochondrie des Jakobidés étant souvent présentée comme une mitochondrie ancestrale [9]. En effet, les génomes mitochondriaux de *Reclinomonas americana* et d'*Andaluca godoyi* contiennent respectivement 98 et 100 gènes encodant entre autres 26 sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (ND1-6, ND4L, NDUFS1-3,7,8, SH2-4, COB, COX1-3, alpha, gamma, ATPA-C et ATPA6L). De plus, ce sont les seuls génomes mitochondriaux ayant conservé l'ARN polymérase bactérienne [10, 11] (Figure 3).



**Figure 4 :** Kinétoplaste observé en microscopie électronique chez *Trypanosoma brucei*. Grand crochet : zone d'exclusion. Petits crochet et flèches : filaments unilatéraux. Ogbadoyi *et al.* 2003.

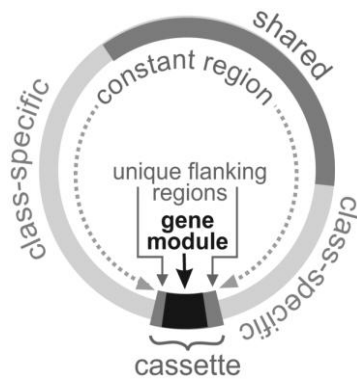


**Figure 5 :** Structure de l'ADK observée en microscopie électronique chez *Crithidia fasciculata*. a. ADK lié. Barre d'échelle = 0,3  $\mu\text{m}$ . b. ADK délié par la topoisomérase II. Barre d'échelle = 0,5  $\mu\text{m}$ . Flèches : Maxicircle. Liu *et al.* 2005.



**Figure 6 :** Système d'édition des ARNm du kinétoplaste. Le maxicircle encode le gène. Les minicircles encodent les ARNg nécessaires à la transcription et l'édition du gène. Lukes *et al.* 2009.

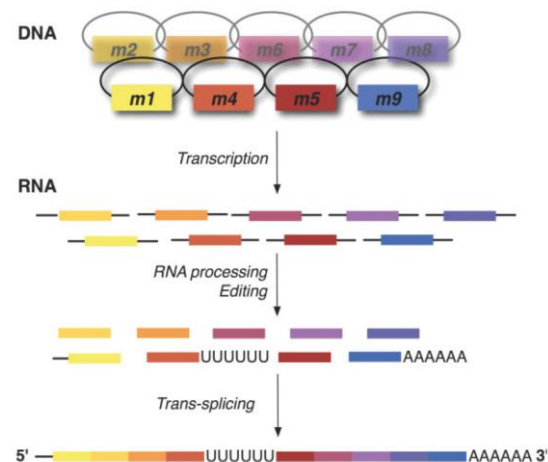




**Figure 7 : Structure des chromosomes mitochondriaux des diplonémidiés.** Cassette : région spécifique à un chromosome donné. Gene module : région codante de la cassette. Unique flanking regions : régions non-codantes de la cassette. Class-specific : régions spécifiques à une classe (A ou B) de chromosomes. Shared : région partagée entre tous les chromosomes. Kiethega *et al.* 2013.

Les Euglenozoa, quant à eux, présentent des mitochondries complexes. Celle des kinétoplastidés est présente en un unique exemplaire situé à la base du flagelle. Particulièrement grosse, elle s'observe facilement en microscopie électronique, ainsi que son kinétoplaste constitué d'ADN condensé (ou ADNk) [12, 13] (Figure 4). L'ADNk est un réseau très complexe de molécules d'ADN, appelées maxicircles et minicircles, enchevêtrées les unes aux autres [14] (Figure 5). Il se compose de 10 000 à 20 000 minicircles d'environ 1 kb pour 20 à 50 maxicircles d'environ 23 kb. Les maxicircles encodent les ARN ribosomiques et les protéines de la chaîne respiratoire ; ils sont donc assimilés à l'ADN mitochondrial « classique », alors que les minicircles encodent des ARN guides (ou ARNg) nécessaires au système d'édition des ARNm, qui consiste en l'insertion et la délétion d'uridines [10, 15, 16] (Figure 6). La taille du génome mitochondrial des diplonémidiés est extrêmement grande (environ 600 kb chez *Diplonema papillatum*). Il est lui aussi très particulier puisque tous les gènes sont fragmentés et chaque fragment, appelé module, se retrouve sur un chromosome circulaire unique (de 5 à 10 kb selon les espèces). Chaque chromosome comprend une cassette contenant un module et deux régions non-codantes uniques de part et d'autres du module, deux régions spécifiques à la classe du chromosome (A ou B) de part et d'autres de la cassette et enfin une région conservée au sein de tous les chromosomes (Figure 7). Les pré-ARNm transcrits à

**Figure 8 : Epissage et édition des ARNm dans les mitochondries des diplonémidiés.** Exemple du gène *cox1*. m1 à m9 : modules 1 à 9 du gène *cox1*, chaque module (rectangle de couleur) se trouve sur un chromosome circulaire. Ligne noire : région non-codante.



partir de ces chromosomes nécessitent une forme d'épissage permettant la liaison entre deux modules adjacents. Cet épissage fait intervenir des ARN anti-sens appelés ARNpp, qui sont chacun spécifique à une liaison entre deux modules. Les diploméidés possèdent également un système d'édition permettant l'insertion d'uridines, ainsi que l'ajout d'une queue poly-A au module 3' indépendamment de l'épissage (Figure 8) [17, 18]. Enfin, la taille du génome mitochondrial des euglénidés est estimée à 50–60 kb et, bien qu'il soit mal connu, il semble y avoir en son sein coexistence entre des gènes entiers et des gènes fragmentés. Chaque fragment (ou module) se retrouve sur un chromosome linéaire d'environ 4 kb, ce qui laisse penser que les euglénidés disposeraient d'un système d'épissage assez similaire à celui décrit chez les diploméidés. Le génome mitochondrial des euglénidés présente en outre de nombreuses régions répétées et ne semble pas faire intervenir de système d'édition [16, 17, 19].

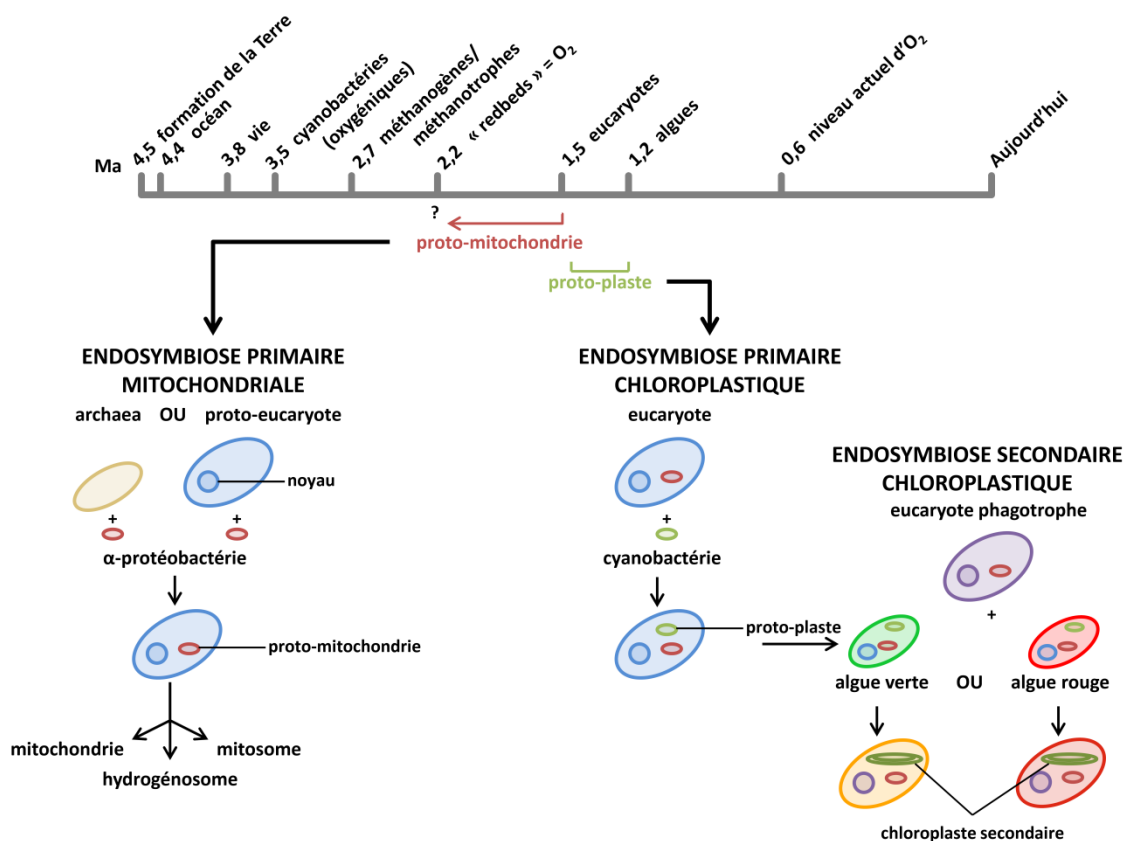


Figure 9 : Endosymbioses et évolution de la mitochondrie et du chloroplaste. Adapté de Dyaal *et al.* 2004.



## 2. Endosymbioses

La théorie endosymbiotique postule que les chloroplastes et les mitochondries sont issus de l'endosymbiose entre un organisme eucaryote et un organisme procaryote (ou eucaryote) qui sera alors conservé et transformé en organite plutôt que d'être potentiellement digéré (Figure 9). Cette théorie a été avancée par Mereschowsky au début du XX<sup>ème</sup> siècle pour expliquer l'origine des chloroplastes [20], puis a été reprise à la fin des années 1920 pour les mitochondries [21]. Cette théorie fut tout d'abord rejetée pour revenir dans les années 1960 [22] et enfin être corroborée par les analyses effectuées sur les génomes chloroplastiques et mitochondriaux qui apparaissent comme des génomes procaryotes « miniatures » [11, 23]. Dans les années 1970, d'autres théories avaient été avancées pour expliquer l'origine de ces organites. Parmi ces théories, l'une proposait que les chloroplastes et mitochondries sont issus d'invaginations de la membrane plasmique [24] et une autre qu'il s'agissait d'une restructuration des membranes internes de l'ancêtre cyanobactérien des eucaryotes [25]. Cependant, depuis les années 1980 et les analyses d'ARNr 16S, la théorie endosymbiotique est la plus plausible, proposant les cyanobactéries comme ancêtre des chloroplastes et les  $\alpha$ -protéobactéries comme ancêtres des mitochondries [26, 27]. En effet, les génomes chloroplastiques et mitochondriaux encodent respectivement entre 50 et 200 protéines et entre 3 et 67 protéines pour environ 4 000 – 5 000 protéines dans un génome procaryote [11, 23]. Ces génomes ont donc été réduits au cours du temps, soit par transfert endosymbiotique de gènes (ou EGT pour Endosymbiotic Gene Transfert) du génome de l'organite vers le génome nucléaire de l'hôte [28], soit par perte des gènes [29]. A présent, les génomes chloroplastique et mitochondrial encodent principalement quelques-unes des sous-unités des complexes impliqués dans les chaînes de transfert d'électrons, ainsi que des composants de la machinerie de synthèse des protéines (ARN de transfert ou ARNt et quelques ARN ribosomiques ou ARNr) nécessaires à l'expression des premières [30].

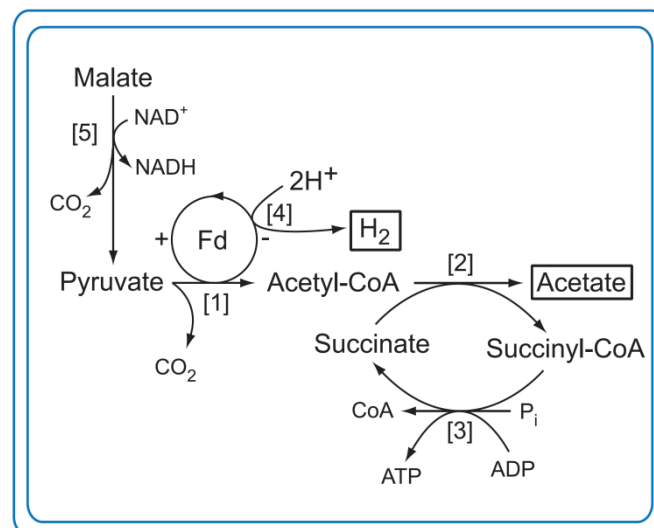
### 2.1 Endosymbioses primaires

#### 2.1.1 Evolution de la mitochondrie

La mitochondrie est issue d'un évènement d'endosymbiose primaire unique survenu il y a environ 1,5 milliard d'années et ayant conduit au dernier ancêtre commun des eucaryotes (LECA pour Last Eukaryotic Common Ancestor) [31]. La nature de l'hôte est encore débattue : il pourrait s'agir d'un organisme appartenant au domaine des Archaea ; on a alors apparition de la mitochondrie avant celle du noyau au sein de l'eucaryote primitif. L'« hypothèse de l'hydrogène » qui stipule que la mitochondrie est issue d'une endosymbiose entre une Archaea autotrophe et

anaérobie  $H^+$ -dépendante et une Eubacteria hétérotrophe et anaérobie produisant de l'hydrogène, en est un exemple [32]. A l'inverse, si l'hôte est un proto-eucaryote sans mitochondrie (= Archezoa), on a alors apparition séquentielle du noyau, puis de la mitochondrie au sein de l'eucaryote primitif. La théorie proposant la fusion d'une Archaea et d'une Eubacteria pour la formation du noyau est un exemple de ce second scénario [33]. En revanche, tout indique qu'au moins un symbiote bactérien est issu du groupe des  $\alpha$ -proteobacteria [27, 34].

Entre LECA et les eucaryotes modernes, la mitochondrie a évolué au sein des différentes lignées de façon indépendante. On retrouve aujourd'hui différents types de mitochondries et d'organites issus des mitochondries : les mitochondries aérobies, les mitochondries anaérobies, les mitochondries anaérobies facultatives, les mitochondries productrices d'hydrogène, les hydrogénosomes et les mitosomes [8, 35]. Si tout le monde s'accorde sur l'origine  $\alpha$ -protéobactérienne de la mitochondrie, les activités présentes au sein de la mitochondrie ancestrale de LECA sont encore discutées et sont fonction des théories proposées pour l'origine des eucaryotes [3, 32, 33, 36-41]. La théorie la plus probable serait que LECA disposait d'une mitochondrie possédant toutes les activités présentes dans les différents types de mitochondries et organites apparentés (hydrogénosomes) actuels ; il s'agirait donc d'une proto-mitochondrie anaérobie facultative et productrice d' $H_2$  [35].



**Figure 10 : Vue générale du métabolisme de l'hydrogénosome.** Fd : Ferrédoxine. [1] : Pyruvate:ferredoxine oxydoréductase. [2] : Acétate:succinate coA-transférase. [3] : Succinyl-coA synthétase. [4] : Hydrogénase. [5] : Enzyme malique. Encadrés : Produits finaux. Müller *et al.* 2012.

### 2.1.1.1 La mitochondrie

La mitochondrie est traditionnellement décrite comme un organite cytoplasmique présent chez la grande majorité des organismes eucaryotes. Elle possède deux membranes, une externe, lisse et perméable aux petites molécules grâce à de nombreux canaux, et une interne, disposant de transporteurs membranaires spécifiques, qui présente des invaginations ou crêtes mitochondriales qui augmentent considérablement sa surface. Ces membranes délimitent deux compartiments : l'espace intermembranaire, à la composition chimique similaire au cytosol, et la matrice. La mitochondrie joue un rôle dans l'apoptose (ou mort cellulaire programmée), dans le stockage d'ions (calcium, potassium et sodium) ou encore dans la différenciation cellulaire, mais son rôle principal est la production d'énergie. En effet, elle est le siège des dernières étapes de la respiration cellulaire qui permet la production de 36 à 38 molécules d'ATP pour une molécule de glucose : le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique), dans la matrice, et la phosphorylation oxydative (dont l'accepteur final d'électrons est l'O<sub>2</sub>), dans la membrane interne (pour plus de détails, voir 3.1 et 3.3).

Certaines mitochondries présentent des activités supplémentaires. Les mitochondries anaérobies peuvent produire de l'énergie en utilisant d'autres accepteurs finaux d'électrons. Par exemple, chez *Euglena gracilis*, en conditions anaérobies, les électrons du NADH sont transférés à un pool de rholoquinone par le complexe I avant d'être transférés au fumarate par une fumarate réductase [42]. Il a également été décrit chez *Nyctotherus ovalis* (Alveolata, SAR) des mitochondries produisant de l'hydrogène qui disposent, en sus d'une forme réduite de chaîne respiratoire mitochondriale, d'une hydrogénase à fer qui leur permet d'utiliser les protons comme accepteurs finaux d'électrons permettant la production d'H<sub>2</sub> [43].

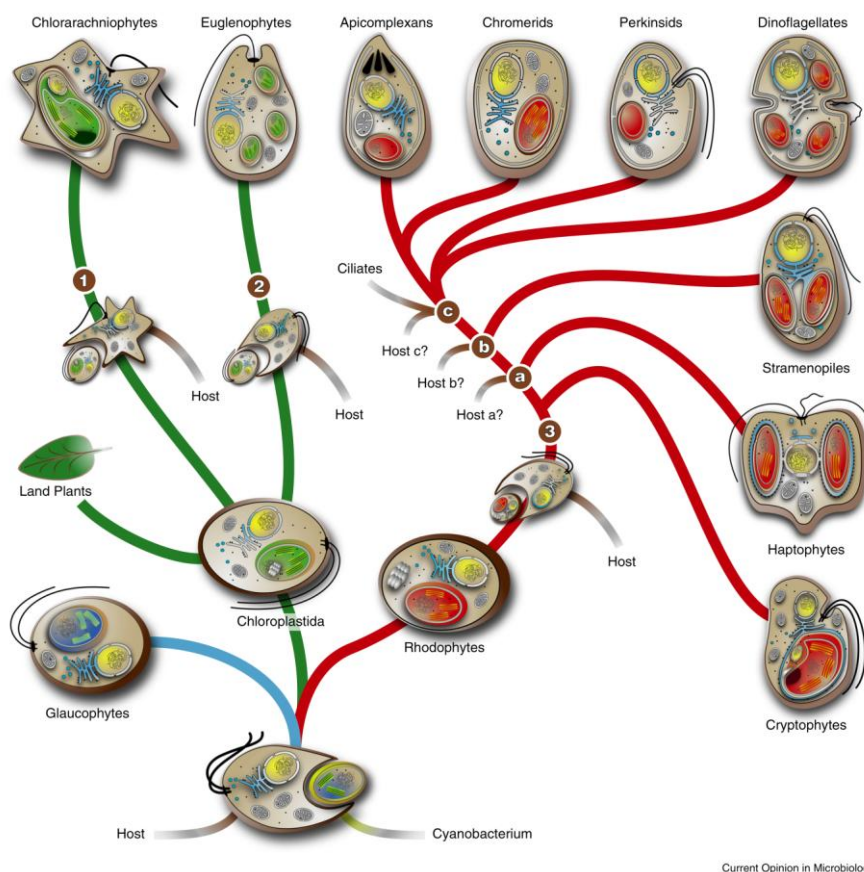
### 2.1.1.2 L'hydrogénosome

L'hydrogénosome a été décrit pour la première fois en 1973 chez *Tritrichomonas foetus* [44]. Il s'agit d'un organite à double-membrane, ne possédant généralement pas de génome, sensible à l'oxygène et produisant de l'hydrogène et de l'ATP. Les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'hydrogénosome sont : une enzyme malique convertissant le malate en pyruvate, une pyruvate:ferrédoxine oxydoréductase qui convertit le pyruvate en acétyl-coA, une acétate:succinyl-coA transférase qui transfère le coenzyme-A de l'acétyl-coA au succinate formant de l'acétate et du succinyl-coA et, pour finir, une succinyl-coA synthétase qui permet la régénération du succinate tout en formant une molécule d'ATP, et une hydrogénase à fer qui réoxyde la ferrédoxine et produit une molécule d'H<sub>2</sub> (Figure 10) [8]. Au premier abord, mitochondrie et hydrogénosome ne semblent pas liés évolutivement. Pourtant la découverte de protéines chaperons dans les hydrogénosomes formant un groupe monophylétique avec celles présentes chez les mitochondries (HSP60, HSP70 et HSP10) est le premier indice d'une origine commune entre les deux organites [45]. C'est la

découverte de la mitochondrie produisant de l'hydrogène chez *Nyctotherus ovalis* (qui peut être assimilée à un hydrogénosome ayant conservé un génome mitochondrial rudimentaire) qui a permis de confirmer que les mitochondries et les hydrogénosomes descendent du même organe ancestral [43].

### 2.1.1.3 Le mitosome

Le mitosome présente une double membrane mais ne possède pas de génome et ne synthétise pas d'ATP. La seule activité subsistant au sein des mitosomes est la synthèse des clusters Fe-S essentiels au fonctionnement des cellules eucaryotes, activité qui se situe classiquement dans les mitochondries. Les mitosomes ont également des systèmes d'import des protéines identiques à ceux décrits chez les mitochondries. De plus, à l'instar des hydrogénosomes, les mitosomes présentent deux des protéines chaperons mitochondriales : HSP60 et HSP70. Il est donc admis que le mitosome descend du même organe ancestral que l'hydrogénosome et la mitochondrie. Il s'agit de la forme mitochondriale la plus dégénérée [8, 46].



Current Opinion in Microbiology

**Figure 11 : Les différentes lignées photosynthétiques.** 1 et 2 : Endosymbioses secondaires vertes. 3 : Endosymbiose secondaire rouge. a, b et c : Endosymbioses tertiaires ou quaternaires rouges. Apicomplexans, Chromerids, Perkinsids et Dinoflagellates appartiennent aux Alveolata. Zimorski *et al.* 2014.

### 2.1.2 Evolution du plaste des Archaeplastida

Le plaste (= chloroplaste) des Archaeplastida est lui aussi issu d'un évènement unique d'endosymbiose primaire survenu entre 1,5 et 1,2 milliards d'années entre l'ancêtre eucaryote des Archaeplastida et une cyanobactérie (dont le genre est encore investigué) [31]. Le plaste primaire a ensuite évolué de telle sorte que trois principales lignées sont apparues au sein des Archaeplastida : les Rhodophyta, les Glaucophyta et les Chloroplastida [4] (Figure 11).

Le plaste primaire possède deux membranes, une interne et une externe, qui délimitent deux espaces : l'espace intermembranaire et le stroma. Au sein du stroma se trouvent les thylakoïdes, pouvant être empilés sous forme de grana, qui sont formés d'une unique membrane qui sépare le lumen (ou espace thylakoïdien) du stroma. Le plaste est le siège de la photosynthèse qui prend place dans les membranes thylakoïdiennes et du cycle de Calvin dans le stroma.

### 2.2 Endosymbioses multiples (secondaires et tertiaires)

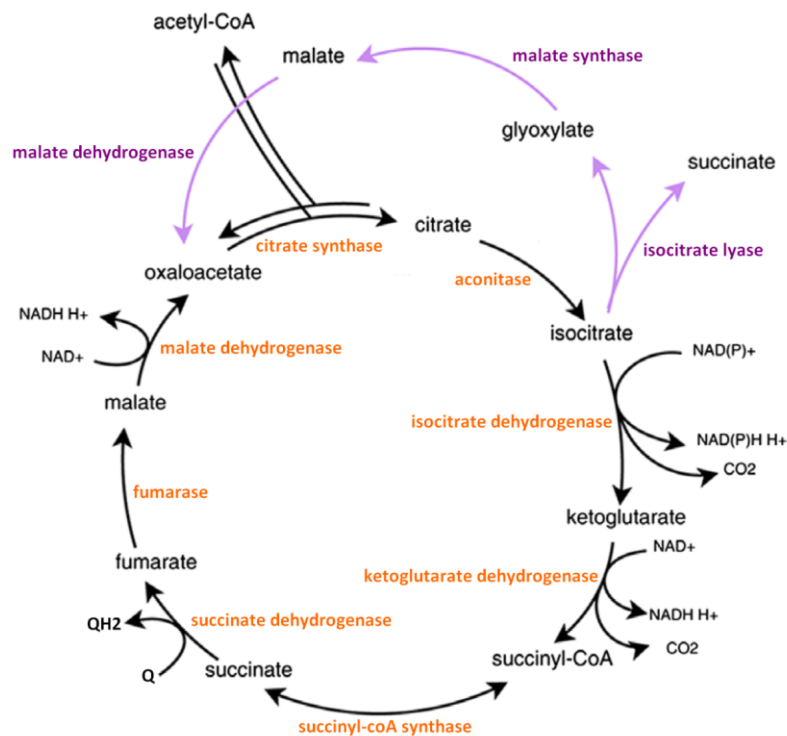
Les évènements évolutifs les plus remarquables impliquant le chloroplaste sont les endosymbioses multiples, au moins secondaires, survenues indépendamment les unes des autres au cours de l'évolution. La théorie de l'endosymbiose secondaire a été énoncée pour la première fois en 1981 sur base du nombre de membranes chloroplastiques observées, notamment chez *Euglena gracilis*, qui présente trois membranes chloroplastiques, et sur la présence d'une structure à double membrane enchâssée dans le chloroplaste correspondant au noyau dégénéré du symbiote et appelée nucléomorphe ; elle se retrouve entre autres chez les Cryptophyta (CCTH) [47].

Deux lignées sont issues d'une endosymbiose secondaire entre un ancêtre eucaryote phagotrophe et une algue verte : les Chlorarachniophyceae, qui possèdent également un nucléomorphe (Rhizaria, SAR) et les Euglenophyceae (Euglenozoa, Excavata). L'analyse phylogénétique des gènes chloroplastiques d'*Euglena gracilis* et de *Gymnochlora stellata* (Chlorarachniophyceae, SAR) indique que ces deux lignées sont issues d'évènements distincts d'endosymbiose secondaire, puisque, outre l'appartenance des ancêtres phagotrophes à des supergroupes eucaryotes différents, le symbiote d'*Euglena gracilis* s'apparente aux algues vertes de type prasinophyte, alors que celui de *Gymnochlora stellata* s'apparente aux algues vertes de type Ulvophyceae [48]. D'autres lignées photosynthétiques sont issues d'endosymbioses entre un ancêtre eucaryote phagotrophe et une algue rouge : les Stramenopiles (SAR), les Alveolata (SAR), les Haptophyta (CCTH) et les Cryptophyta (CCTH) [35] (Figure 11)<sup>2</sup>. Au contraire des algues secondaires vertes, il semblerait que les algues secondaires rouges aient pour origine un évènement d'endosymbiose secondaire unique. Le résultat de cet évènement serait ensuite impliqué dans des

<sup>2</sup> A noter que de nombreuses lignées au sein des Stramenopiles, des Alveolata et des Cryptophyta ne sont pas photosynthétiques.

endosymbioses tertiaires et quaternaires faisant intervenir plusieurs hôtes différents. Cette hypothèse, dite « rhodoplex », se base notamment sur la monophylie d'un groupe de gènes qui se retrouve dans l'ensemble des chloroplastes complexes rouges [49-51]. Elle a remplacé le modèle « chromalvéolé », qui a prévalu entre 2000 et 2010, et postulait une seule endosymbiose secondaire rouge, suivie d'une évolution strictement verticale et accompagnée de nombreuses pertes de plastes (ex. ciliés, oomycètes) [52, 53].

*Euglena gracilis* est donc issue d'une endosymbiose secondaire entre son ancêtre Euglenozoa phagotrophe et une algue verte de type prasinophyte [54]. Cependant, au sein des euglénidés, seules les Euglenophyceae sont phototrophes (hormis les espèces ayant perdu leur chloroplaste, telles qu'*Euglena longa*), les autres phylum pouvant être osmotrophes ou phagotrophes (bactérovores ou eucaryovores). Les espèces osmotrophes ou phototrophes ont perdu la possibilité d'effectuer la phagotrophie mais possèdent encore pour certaines le « mouvement euglénoloïde » (il s'agit de déformations cellulaires rythmiques spécifiques aux euglénidés et participant à la phagotrophie) hérité de leur ancêtre phagotrophe. Récemment, une espèce d'euglénidé à la fois eucaryovore et phototrophe, dont la survie dépend autant de sa capacité à effectuer la photosynthèse que de la possibilité de phagocyter sa proie eucaryote (*Tetraselmis*, Archaeplastida), a été décrite et semble donc représenter le maillon entre phagotrophie et phototrophie chez les euglénidés [55] (Figure 11).



**Figure 12 : Cycles de Krebs et du glyoxylate.** Orange : enzymes du cycle de Krebs. Violet : enzymes du cycle du glyoxylate. Adapté de Plancke *et al.* 2014 [56].

### 3. Métabolisme énergétique

#### 3.1 Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs a été décrit pour la première fois en 1937 par Krebs et Johnson [57, 58]. Il s'agit d'une série de réactions enzymatiques qui permet d'oxyder l'acétyl-coA entraînant la perte de deux carbones et la synthèse de pouvoir réducteur (NADH). L'acétyl-coA peut être issu de la dégradation des acides gras, des acides aminés ou celle des sucres (Figure 12).

La première étape du cycle de Krebs est catalysée par la citrate synthétase (EC 2.3.3.1) et permet la condensation de l'acétyl-coA (composé à deux carbones) et de l'oxaloacétate (composé à quatre carbones) en citrate (composé à six carbones). La seconde étape (isomérisation), catalysée par l'aconitase (EC 4.2.1.3), transforme le citrate en aconitate puis en D-isocitrate. La troisième étape, catalysée par l'isocitrate déshydrogénase (EC 1.1.1.42), transforme l'isocitrate en  $\alpha$ -ketoglutarate ce qui libère un premier carbone (sous forme de  $\text{CO}_2$ ) et permet la formation d'une molécule de NADH. La quatrième étape est catalysée par l' $\alpha$ -ketoglutarate déshydrogénase (il s'agit d'un complexe enzymatique formé par trois sous-unités, l'oxoglutarate déshydrogénase (E1, EC 1.2.4.2), la dihydrolipoyl succinyltransférase (E2, EC 2.3.1.61) et la dihydrolipoyl déshydrogénase (E3, EC 1.8.1.4)) qui transforme l' $\alpha$ -ketoglutarate en succinyl-coA par décarboxylation libérant une seconde molécule de  $\text{CO}_2$  et permettant la formation d'une seconde molécule de NADH. Lors de la cinquième étape, la succinyl-coA synthétase (EC 6.2.1.4 ou 6.2.1.5) convertit le succinyl-coA en succinate en libérant une molécule de GTP (équivalent à l'ATP). La sixième étape est catalysée par la succinate déshydrogénase (il s'agit également d'un complexe de la chaîne respiratoire (voir 3.3.2), généralement formé de quatre sous-unités, EC 1.3.5.1) qui permet la formation de fumarate à partir du succinate, tout en réduisant les quinones membranaires. L'avant-dernière étape consiste en l'hydratation de la double liaison carbone du fumarate pour donner du malate, réaction catalysée par la fumarate hydratase (EC 4.2.1.2). Pour finir, lors de la huitième étape, le malate est déshydrogéné par une malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37 ou 1.1.5.4) pour produire de l'oxaloacétate qui sera ré-injecté dans le cycle. Cette étape produit également la dernière molécule de NADH. D'un point de vue énergétique, le bilan du cycle de Krebs est donc la formation de trois molécules de NADH, une molécule de quinone réduite ( $\text{QH}_2$ ) et une molécule de GTP pour la perte de deux carbones [59].

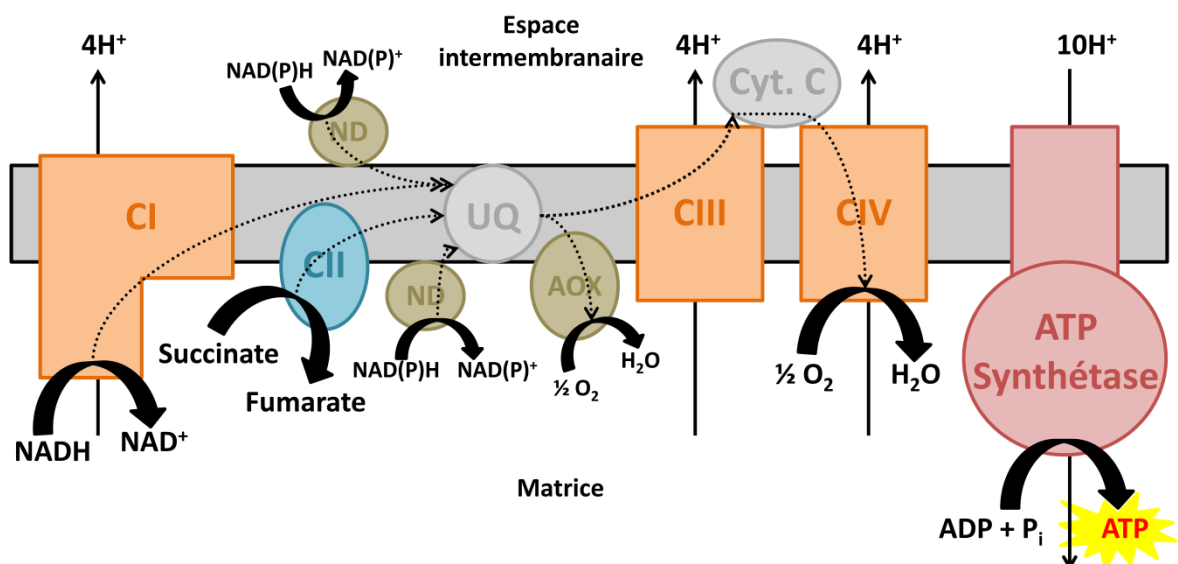
#### 3.2 Le cycle du glyoxylate

Le cycle du glyoxylate a été découvert par Kornberg et Krebs en 1957 et est décrit comme un cycle de Krebs modifié [60]. Il court-circuite le cycle de Krebs, évitant les étapes de décarboxylation et donc la perte de deux carbones par émission de deux molécules de  $\text{CO}_2$ . Le cycle du glyoxylate comprend deux enzymes : l'isocitrate lyase, qui clive l'isocitrate produit lors de la seconde étape du

cycle de Krebs en succinate et glyoxylate, et la malate synthase, qui condense le glyoxylate avec une molécule d'acétyl-coA pour former du malate [61] (Figure 12).

### 3.3 La chaîne respiratoire

Le NADH produit par le cycle de Krebs dans la matrice mitochondriale est réoxydé par la chaîne respiratoire, dans la membrane interne, qui transfère les électrons jusqu'à l' $O_2$ . Chez la plupart des organismes eucaryotes, la chaîne respiratoire mitochondriale se compose de quatre complexes multiprotéiques (I, II, III et IV), ainsi que d'oxydoréductases additionnelles, et s'accompagne d'une ATP synthétase (communément appelée  $F_1F_0$ -ATP synthétase, ou complexe V). Tout d'abord, les électrons sont transmis du NADH au pool d'ubiquinone par le complexe I (ou NADH:ubiquinone oxydoréductase) ou par les NADH déshydrogénases de type II que l'on retrouve sur les faces interne et externe de la membrane interne de la mitochondrie chez les plantes, les champignons et certains protistes (comme *Trypanosoma brucei*). Comme mentionné au paragraphe 3.2, les électrons du succinate sont transmis au pool d'ubiquinone par le complexe II. Ils sont ensuite transférés du pool d'ubiquinone réduit au cytochrome c par le complexe III (ou ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase) puis à l' $O_2$  via le complexe IV (ou cytochrome c oxydase). Chez les plantes, certains champignons et de nombreux protistes, il existe également une ou plusieurs ubiquinol oxydase(s) (ou oxydase(s) alternative(s), AOX) qui court-circuitent les complexes III et IV en transférant les électrons du pool d'ubiquinone réduit directement à l' $O_2$ .



**Figure 13 : Chaîne de transport d'électrons dans la membrane interne mitochondriale des plantes, des champignons et de certains protistes.** CI : complexe I. CII : complexe II. CIII : complexe III. CIV : complexe IV. ND : NAD(P)H déshydrogénases de type II. AOX : Oxydase alternative. UQ : pool d'ubiquinone. Flèches en pointillé : transferts d'électrons. Adapté de Rasmusson *et al.* 1998 [62].



Le transfert des électrons à travers les complexes I, III et IV est couplé à la translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, ce qui crée un gradient électrochimique de protons ou force proton motrice ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) composé d'un gradient de concentration ( $\Delta\text{pH}$ ) et d'un potentiel membranaire ( $\Delta\Psi$ ). L'énergie associée permet à la  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP synthétase de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique ( $\text{P}_i$ ). Un potentiel membranaire élevé s'oppose au transfert d'électrons, ce qui augmente la durée de vie des semiquinones au niveau des complexes I et III. Ces semiquinones transfèrent alors leurs électrons directement à l'oxygène ce qui entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS) extrêmement toxiques pour les cellules. Différentes oxydoréductases alternatives (AOX, NDH de type II) permettent en revanche un transfert d'électrons non associé à la translocation de protons et donc insensible au  $\Delta\Psi$  (Figure 13) [63].

Il existe plusieurs inhibiteurs bloquant le transfert d'électrons, chacun ciblant les différents complexes : roténone et piéricidine pour le complexe I, malonate et thényluoroacétone pour le complexe II, antimycine A et myxothiazol pour le complexe III, cyanure (KCN) et monoxyde de carbone pour le complexe IV, oligomycine et dicyclocarbodiimide (DCCD) pour l'ATP synthétase, acide salicylhydroxamique (SHAM), octyl-gallate et n-propyl gallate (PG) pour l'oxydase alternative (AOX) [64].

### 3.3.1 Le complexe I ou NADH:ubiquinone oxydoréductase

Le complexe I ou NADH:ubiquinone oxydoréductase (EC 1.6.5.3) est le complexe enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale possédant la masse moléculaire apparente la plus importante ( $\sim 1\,000$  kDa). La microscopie électronique a permis de mettre en évidence une structure en « L » comportant deux bras, l'un enchâssé dans la membrane interne mitochondriale et l'autre formant une protubérance dans la matrice [65]. Ce complexe couple l'oxydation du NADH et la réduction de l'ubiquinone à la génération du gradient de protons permettant la synthèse d'ATP par l'ATP synthétase et est sensible à la roténone. A l'heure actuelle, grâce aux études menées sur la levure *Yarrowia lipolytica*, une structure en 3 ou 4 modules fonctionnels est proposée : les modules N, Q et P, avec le module P pouvant être divisé en deux ( $\text{P}_p$  et  $\text{P}_d$ ). Les modules N et Q forment le bras périphérique, le premier permet la fixation du NADH et le second celle de l'ubiquinone, les deux sites étant liés par une chaîne de sept clusters Fe-S (fer-souffre) qui transfèrent les électrons du NADH à l'ubiquinone. Le module P ( $\text{P}_p$  étant la partie proximale et  $\text{P}_d$  la partie distale) forme le bras membranaire et semble présenter les quatre différents sites de translocation de protons. La séparation spatiale entre le transfert d'électrons et la translocation de protons laisse supposer que ces deux mécanismes ne sont pas directement couplés [66, 67].

Le complexe I est décrit comme comportant 45 sous-unités chez les mammifères [68], de 39 à 42 sous-unités chez les champignons [69-72], de 42 à 48 chez les plantes vertes [73, 74] et 55 chez

les kinétoplastidés [75, 76]. Quatorze de ces sous-unités se retrouvent chez les  $\alpha$ -protéobactéries et sont très bien conservées dans les différents super-groupes eucaryotes [77] ; elles constituent les sous-unités du « noyau bactérien » des deux bras du complexe. Parmi ces sous-unités, certaines sont encore encodées par le génome mitochondrial, leur nombre pouvant varier en fonction des organismes (5 chez *Chlamydomonas reinhardtii*, 7 chez *Yarrowia lipolytica* et *Homo sapiens*, 9 chez *Arabidopsis thaliana* et 12 chez *Reclinomonas americana*), toutes les autres sous-unités étant alors encodées par le noyau. En dehors des sous-unités du « noyau bactérien », les autres se retrouvent plus ou moins bien conservées, si bien que certaines sous-unités ont longtemps été considérées comme spécifiques à certains groupes eucaryotes [78] avant d'être réinterprétées comme extrêmement divergentes [79].

### 3.3.2 Le complexe II ou succinate:ubiquinone oxydoréductase

Le complexe II ou succinate:ubiquinone oxydoréductase (EC 1.3.5.1) est classiquement décrit comme le complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale présentant le plus faible poids moléculaire, avec seulement quatre sous-unités que l'on retrouve chez les bactéries et les eucaryotes [80]. Il existe certaines exceptions, comme celle du complexe II décrit chez *Arabidopsis thaliana*, avec 7 (ou 8) sous-unités, et celui décrit chez les trypanosomes, présentant 12 sous-unités [81-83]. Il couple l'oxydation du succinate à la réduction de l'ubiquinone sans créer de gradient de protons. Il participe au transfert d'électrons par la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi qu'au cycle de Krebs. Le rôle des quatre sous-unités classiques est bien défini : SDH1 est une flavoprotéine qui contient un FAD (accepteur d'électrons) et fixe le succinate, SDH2 contient des centres Fe-S qui permettent le transfert des électrons du FADH<sub>2</sub> à l'ubiquinone, tandis que les sous-unités SDH3 et SDH4 (contenant un hème *b* dont la fonction est encore controversée) sont hydrophobes, ce qui permet l'ancrage du complexe sur la face matricielle de la membrane interne mitochondriale, et forment, avec la sous-unité SDH2, une poche de fixation pour l'ubiquinone où elle peut être réduite [80]. Chez la grande majorité des organismes eucaryotes, ces quatre sous-unités sont à présent encodées par le noyau. Parmi les exceptions, on retrouve trois sous-unités dans le génome mitochondrial de *Reclinomonas americana* (SDH2, SDH3 et SDH4).

### 3.3.3 Le complexe III (complexe *bc<sub>1</sub>*) ou ubiquinol:cytochrome *c* oxydoréductase

Le complexe III ou ubiquinol:cytochrome *c* oxydoréductase (EC 1.10.2.2) couple l'oxydation du pool d'ubiquinone et la réduction du cytochrome *c* à la translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, ce qui permet la constitution du gradient électrochimique nécessaire à la formation d'ATP par l'ATP synthétase. Le complexe III se compose d'une dizaine de sous-unités très bien conservées à travers les eucaryotes (9 sous-unités ont été isolées chez *Chlamydomonas*

*reinhardtii* [84], 10 chez *Arabidopsis thaliana* [82], 11 chez les mammifères [85], 10 chez les trypanosomes [75]), pour une masse moléculaire approximative de 250 kDa, et sa structure est très bien définie [85]. Il possède deux sites de fixation pour l'ubiquinone au niveau de la sous-unité cytochrome *b* (COB), le site  $Q_o$ , sensible au myxothiazol, et le site  $Q_i$ , sensible à l'antimycine A. Deux ubiquinols sont fixés successivement au niveau du site  $Q_o$ , qui transfère pour chaque molécule d'ubiquinol un électron vers les centres Fe-S de la sous-unité Rieske (RIP1) et un électron vers l'hème  $b_L$  de la sous-unité COB, tout en libérant deux  $H^+$  dans l'espace intermembranaire. L'électron des centres Fe-S est ensuite transféré à la sous-unité cytochrome  $c_1$  (CYT1), qui fixe et réduit une molécule de cytochrome *c* mobile présente sur la face externe de la membrane interne mitochondriale. L'électron de l'hème  $b_L$  est transféré à l'hème  $b_H$  de la sous-unité COB, puis à une molécule d'ubiquinone fixée au niveau du site  $Q_i$ ; il y a alors formation d'une semiquinone. Pour la réduction totale de la molécule d'ubiquinone au niveau du site  $Q_i$ , il faut un second électron issu de la réduction d'une seconde molécule d'ubiquinol, ce qui entraîne la réduction d'une autre molécule de cytochrome *c*, la libération de deux autres  $H^+$  dans l'espace intermembranaire et la prise de deux  $H^+$  dans la matrice. Le bilan final est donc une molécule d'ubiquinol oxydée pour deux molécules de cytochrome *c* réduites et six protons transloqués de la matrice vers l'espace intermembranaire [85]. Ces trois sous-unités catalytiques (COB, RIP1 et CYT1) se retrouvent chez les bactéries [86]. Le complexe III peut être considéré comme bifonctionnel : en effet, les sous-unités « core » (QCR1 et QCR2) appartiennent à la famille multiprotéique des « mitochondrial processing peptidases » (MPP) et possèdent bien une activité protéolytique chez les plantes [87]. Les sous-unités supplémentaires (QCR6-10) participent simplement à la structure du complexe. Chez tous les eucaryotes, seule la sous-unité COB se retrouve encore encodée dans le génome mitochondrial.

### 3.3.4 Le complexe IV ou cytochrome *c* oxydase

Le complexe IV ou cytochrome *c* oxydase (EC 1.9.3.1) transfère les électrons du cytochrome *c* à l'oxygène présent dans la matrice mitochondriale, tout en participant à la constitution du gradient électrochimique de protons. Ce complexe, sensible au cyanure, est généralement constitué d'une dizaine de protéines (12 chez *Saccharomyces cerevisiae* [88], 13 chez les mammifères [89, 90], 10 chez *Arabidopsis thaliana* [82], 10 chez *Chlamydomonas reinhardtii* [84] et entre 10 et 15 chez les kinétoplastidés [91, 92]). Parmi les sous-unités du cœur catalytique (COX1, COX2 et COX3), bien conservées à travers les eucaryotes, les sous-unités COX2 et COX3 fixent le cytochrome *c*, qui transfère son électron au premier centre cuivre ( $Cu_A$ ) présent au sein de COX2. L'électron est ensuite transféré à l'hème  $a$ , puis à l'hème  $a_3$  couplé au centre  $Cu_B$  de la sous-unité COX1, avant de réduire l' $O_2$ . Il faut l'oxydation de quatre molécules de cytochrome *c*, la prise de huit  $H^+$  dans la matrice et la

libération de quatre  $H^+$  dans l'espace intermembranaire pour permettre la réduction d'une molécule d' $O_2$  en deux molécules d' $H_2O$  [93].

Comme pour le complexe III, les trois sous-unités catalytiques du complexe IV se retrouvent chez les bactéries [94] possédant le même type ( $aa_3$ ) de cytochrome *c* oxydase (il existe des cytochrome *c* oxydases bactériennes présentant d'autres combinaisons d'hèmes :  $caa_3$ ,  $bo_3$ ,  $bb_3$ ,  $ba_3$  et  $cbb_3$  [95]) et sont généralement encodées dans le génome mitochondrial des eucaryotes (parmi les exceptions, seule COX1 est encodée dans le génome mitochondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*). Il s'agit du complexe présentant le plus grand nombre de facteurs d'assemblage identifiés jusqu'ici [64] et l'un d'eux (COX11) est encore encodé dans le génome mitochondrial de *Reclinomonas americana*.

### 3.3.5 L'ATP synthétase

L'ATP synthétase (EC 3.6.3.14) est formée de deux domaines : le domaine  $F_o$  membranaire, qui contient un canal à protons, et le domaine  $F_1$ , constitué de la partie soluble dans la matrice, qui synthétise l'ATP. Ces deux domaines sont reliés par deux bras composés de sous-unités appartenant à la fois à  $F_o$  et à  $F_1$  : le bras central, qui fait partie du rotor de l'enzyme, permet de coupler la translocation de protons ( $F_o$ ) à la synthèse d'ATP ( $F_1$ ), et le bras périphérique ou stator, qui permet de stabiliser les deux parties de l'enzyme. Classiquement, la partie  $F_1$  est constituée de six sous-unités suivant la stœchiométrie  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  et OSCP, et la partie  $F_o$  comprend trois sous-unités suivant la stœchiométrie  $ab_2c_{10-14}$ , ainsi qu'une dizaine de sous-unités additionnelles pouvant être impliquées dans la structure du bras périphérique, la formation de dimères ou la régulation de l'activité enzymatique (7 chez les mammifères [96] et 11 chez *Saccharomyces cerevisiae* [97]). Ces dernières sous-unités peuvent parfois être remplacées par un ensemble complet de sous-unités additionnelles probablement spécifiques à différents groupes d'organismes eucaryotes (9 chez *Chlamydomonas reinhardtii* [98], 14 chez *Trypanosoma brucei* [99] et 13 chez *Tetrahymena thermophila*). Les sous-unités *c* forment un cercle au sein de la membrane interne mitochondriale et sont accolées à la sous-unité *a* contenant le canal à protons. Le passage des protons à travers la sous-unité *a* (de l'espace intermembranaire vers la matrice) entraîne la rotation du cercle de sous-unités *c*, qui lui-même entraîne les sous-unités  $\gamma$  et  $\epsilon$  de la partie  $F_1$ . Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  s'agencent alternativement autour du rotor (principalement la sous-unité  $\gamma$ ) et fixent l'ATP ou l'ADP+ $P_i$ . Les rotations de la sous-unité  $\gamma$  induisent trois changements de conformation des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  permettant (i) la fixation d'ADP et  $P_i$  (ainsi que la libération de l'ATP formé lors du cycle précédent), (ii) leur liaison et (iii) la synthèse d'ATP [100-102]. Les sous-unités *b* et  $\delta$  sont les composantes principales du stator. L'ATP synthétase peut également réaliser la réaction inverse, c'est-à-dire l'hydrolyse de l'ATP (le rotor tourne alors dans le sens inverse que lors de la synthèse d'ATP) [102]. Plusieurs analyses effectuées

chez différents organismes (mammifères, levures et algues vertes) suggèrent que l'ATP synthétase se rencontre sous forme dimérique *in vivo*, et ce bien qu'elle soit active sous forme monomérique [84].

Chez les bactéries, on retrouve les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ , OSCP (appelée  $\delta$ ),  $\gamma$ ,  $\delta$  (appelée  $\epsilon$ ), a, b et c. On peut retrouver les sous-unités a et c encore encodées dans le génome mitochondrial des eucaryotes. Chez *Reclinomonas americana*, en plus de ces trois sous-unités, on trouve également  $\alpha$ ,  $\gamma$  et b encodées dans le génome mitochondrial.

### 3.3.6 Les voies alternatives

#### 3.3.6.1 NAD(P)H déshydrogénases alternatives (ou de type II)

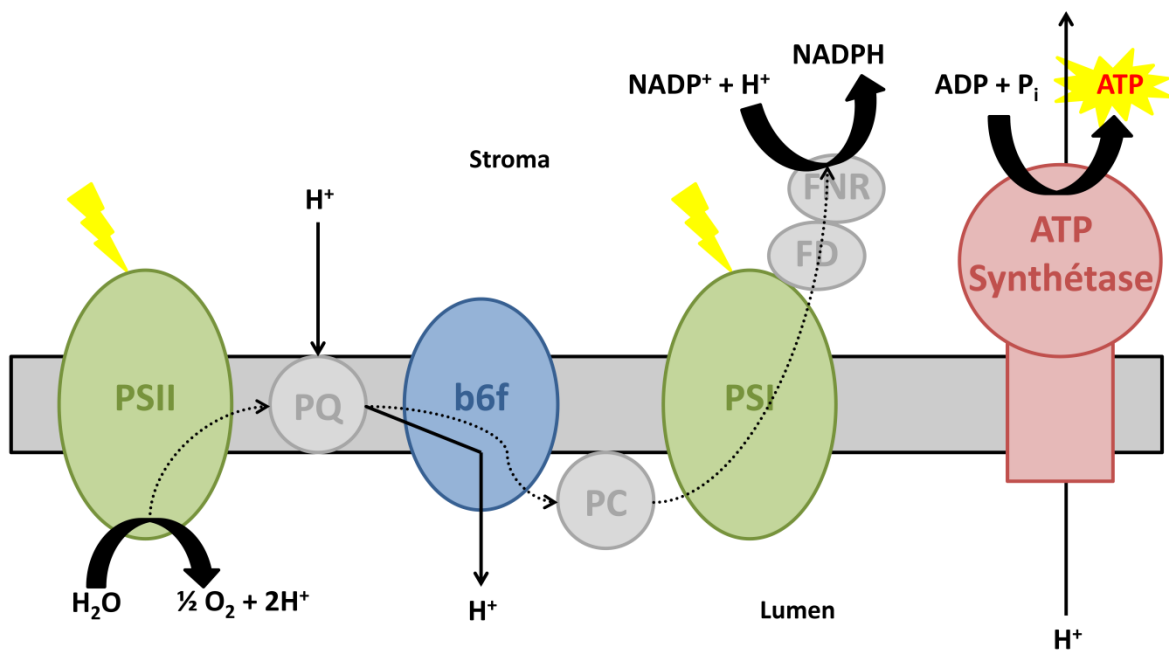
Chez les plantes, les champignons et certains protistes (tels que *Trypanosoma brucei*), il existe des NAD(P)H déshydrogénases de type II, insensibles à la roténone et présentes à la surface de la membrane interne mitochondriale. Elles peuvent se retrouver tant sur la face externe (côté espace intermembranaire) que sur la face interne (côté matrice). Il s'agit de polypeptides de masse moléculaire d'environ 50 – 60 kDa, encodés par le génome nucléaire, et présents sous différentes isoformes dans un même organisme. Ces NAD(P)H alternatives transfèrent les électrons du NADH (ou NADPH) au pool d'ubiquinone membranaire, mais ne transfèrent pas de proton dans l'espace intermembranaire, court-circuitant ainsi le complexe I de la chaîne respiratoire [103, 104].

#### 3.3.6.2 Oxydase(s) alternative(s) ou AOX

De même, chez les plantes, les champignons et presque tous les autres eucaryotes (tels que *Trypanosoma brucei*) en dehors des vertébrés [105], il existe une ou plusieurs oxydase(s) alternative(s) (ou AOX) insensible(s) au cyanure et dont le rôle principal semble être de protéger les cellules contre la formation d'espèces réactives de l'oxygène. En effet, l'AOX transfère les électrons de l'ubiquinol directement à l'oxygène moléculaire présent dans la matrice mitochondriale, sans participer à la constitution du gradient électrochimique de protons nécessaire à la synthèse d'ATP, court-circuitant alors les complexes III et IV [106]. Lorsqu'il se trouve sous forme circulante dans la circulation sanguine de l'Homme (par opposition à la forme procyclique présente chez le moustique), *Trypanosoma brucei* ne possède plus de chaîne respiratoire. Son métabolisme mitochondrial repose alors sur une glycérol-3-phosphate déshydrogénase qui transfère les électrons du glycérol au pool d'ubiquinone et sur son oxydase alternative qui transfère à son tour les électrons du pool d'ubiquinone à l'O<sub>2</sub> [107].

### 3.3.6.3 Les protéines découplantes ou UCP

Les protéines découplantes, présentes chez tous les eucaryotes excepté les levures, sont des protéines ancrées dans la membrane interne des mitochondries et appartenant à la famille des transporteurs d'anions. Les UCP dissipent le gradient de protons formé par les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale et sont donc en compétition avec la  $F_0F_1$ -ATP synthétase. Leur rôle n'a pas encore été clairement défini, mais il semblerait qu'à l'instar des oxydases alternatives, leur activité soit nécessaire au maintien de la balance énergétique, protégeant ainsi indirectement les cellules contre la formation des espèces réactives de l'oxygène [108].



**Figure 14 : Chaîne de transport d'électrons dans la membrane thylakoïdienne des chloroplastes.** PSII : photosystème II.  $b_6f$  : complexe cytochrome  $b_6f$ . PSI : photosystème I. PQ : pool de plastoquinone. PC : plastocyanine. FD : Ferrédoxine. FNR : Ferrédoxine-NADP<sup>+</sup> réductase. Adapté de Allahverdiyeva *et al.* 2015 [109].

### 3.4 La photosynthèse

Au sein de la membrane thylakoïdienne, la chaîne photosynthétique oxyde l'eau et transfère les électrons jusqu'au NADP<sup>+</sup>. La chaîne photosynthétique chloroplastique comprend trois complexes multiprotéiques, le photosystème II (ou PSII) associé à des antennes collectrices de lumière appelées LHCII, le complexe cytochrome  $b_6f$  et le photosystème I (ou PSI) associé à des antennes collectrices de lumière appelées LCHI, et s'accompagne d'une ATP synthétase chloroplastique. Les électrons sont dans un premier temps transférés de l'eau au pool de plastoquinone via le PSII ; il y a alors libération dans le lumen d'une molécule de  $\frac{1}{2}O_2$  et de deux protons par molécule d' $H_2O$ . Les électrons sont

ensuite transférés du pool de plastoquinone réduit à la plastocyanine présente sur la face interne de la membrane thylakoïdienne (côté lumen) via le complexe cytochrome  $b_6f$ , ce qui libère un proton supplémentaire au sein du lumen et entraîne la prise d'un proton côté stroma. Pour finir, le PSI transfère les électrons de la plastocyanine à la ferrédoxine et une ferrédoxine-NADP<sup>+</sup> réductase réduit le NADP<sup>+</sup> en NADPH, ce qui consomme un proton côté stroma. La libération de protons dans le lumen au niveau du PSII et du complexe cytochrome  $b_6f$  et la consommation de protons dans le stroma au niveau de la ferrédoxine-NADP<sup>+</sup> réductase créent un gradient électrochimique de protons qui permet à l'ATP synthétase chloroplastique de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (P<sub>i</sub>) (Figure 14).

Lorsque la lumière absorbée est trop importante et sature la capacité de la chaîne photosynthétique, des mécanismes de protection des centres réactionnels des photosystèmes sont mis en place. Tout d'abord, les transitions d'état (soit le transfert des antennes collectrices de lumière du PSII au PSI) permettent de protéger le centre réactionnel du PSII [110]. Il peut ensuite y avoir dissipation d'énergie principalement au niveau du PSII : il peut s'agir d'émission de fluorescence et/ou d'émission de chaleur (ou quenching non-photochimique, NPQ) [111]. Enfin, les électrons peuvent également quitter le flux linéaire de la chaîne photosynthétique et rejoindre : (i) le flux cyclique d'électrons autour du PSI, (ii) la réaction de Mehler, qui entraîne l'utilisation par le PSI de l'O<sub>2</sub> comme accepteur final d'électrons, (iii) la chlororespiration, qui fait intervenir des NADPH déshydrogénases alternatives et des oxydases alternatives (PTOX) similaires à celles retrouvées dans les mitochondries, (iv) la photorespiration qui fait intervenir la Rubisco et son activité oxygénase [112-115].

### 3.4.1 Le photosystème II

Le photosystème II (ou PSII) est un complexe multiprotéique qui se retrouve au sein des membranes thylakoïdiennes et qui contient un centre réactionnel où l'énergie lumineuse est convertie en potentiel électrochimique et où l'H<sub>2</sub>O est oxydée. Le PSII est constitué de trois paires de protéines homologues : D1 et D2 (ou PsbA et PsbD), qui forment le cœur du centre réactionnel, CP43 et CP47 (ou PsbC et PsbB), qui lient les chlorophylles, et PsbE et PsbF, qui lient le cytochrome  $b_{559}$ . S'y trouvent également un ensemble de protéines structurelles (PsbH-Z), dont certaines sont spécifiques à certains groupes eucaryotes (par exemple, PsbP et PsbQ ne se retrouvent que chez les plantes et les algues vertes, alors que PsbU et PsbV ne se retrouvent que chez les algues rouges). Les chlorophylles et  $\beta$ -carotènes présents dans les antennes collectrices de lumière (LCHII) absorbent la lumière et transfèrent l'excitation au centre réactionnel où a lieu la séparation de charges au niveau des protéines D1 et D2. Le mécanisme fait intervenir une paire de chlorophylles  $a$  P680 (ou P680),

une phéophytine a, une tyrosine active de la sous-unité D1, deux molécules d'H<sub>2</sub>O et deux molécules de plastoquinone (Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub>). Il y a alors oxydation de l'eau et réduction des plastoquinones [116].

#### 3.4.2 Le complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f*

Le complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f* (ou plastoquinone:plastocyanine oxydoréductase) est un complexe multiprotéique qui se retrouve dans les membranes thylakoïdiennes et qui transfère les électrons du pool de plastoquinone réduit à la plastocyanine, tout en couplant ce transfert à la translocation de protons du stroma au lumen. Il participe également au transfert cyclique d'électrons autour du PSI. Il contient huit sous-unités (PetA-D, PetG et PetL-N). Les sous-unités PetA (ou cytochrome *f*), PetB (ou cytochrome *b<sub>6</sub>*), PetC (ou Rieske) et PetD lient les groupes prosthétiques : les hèmes b<sub>p</sub> et b<sub>n</sub>, le cluster Fe-S, l'hème c<sub>n</sub> (du cytochrome *f*), une chlorophylle *a* et un β-carotène. Les sous-unités PetG, PetL, PetM et PetN interviennent dans la structure du complexe [117].

#### 3.4.3 Le photosystème I

Le photosystème I (ou PSI) possède une structure générale similaire au PSII avec un centre réactionnel multiprotéique et des antennes collectrices de lumières (LHCI). Les chlorophylles et β-carotènes fixés aux LHCI absorbent la lumière et transfèrent l'excitation au centre réactionnel où a lieu la séparation de charges au niveau des sous-unités PsaA et PsaB. Ces dernières lient les composants intervenant dans le transfert des électrons : la paire de chlorophylles *a* P700 (ou P700), une chlorophylle *a* (ou A<sub>0</sub>), une phyloquinone (ou A<sub>1</sub>) et un cluster 4Fe-4S (ou F<sub>x</sub>). Les sous-unités PsaC, PsaD et PsaE se trouvent du côté du stroma et lient la ferrédoxine à laquelle les électrons sont transférés grâce aux deux clusters 4Fe-4S (ou F<sub>A</sub> et F<sub>B</sub>) liés à PsaC. Les sous-unités PsaF et PsaN lient la plastocyanine du côté du lumen. Les autres sous-unités (PsaG-M et PsaO) interviennent dans la structure du PSI. Ce complexe catalyse l'oxydation de la plastocyanine du côté du lumen et la réduction de la ferrédoxine du côté du stroma [118]. Chez de nombreux organismes en dehors des Viridiplantae, tels qu'*Euglena gracilis*, la plastocyanine est remplacée par le cytochrome *c<sub>6</sub>* [119].

#### 3.4.4 L'ATP synthétase

La F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthétase chloroplastique comprend un ensemble de sous-unités homologue à celui retrouvé chez les bactéries avec une partie F<sub>1</sub> α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ et une partie F<sub>0</sub> c<sub>10</sub>abb' (voire c<sub>14</sub> chez les plantes terrestres), δ et ε participant à la structure, et sans sous-unité additionnelle comme celles qui se retrouvent chez son homologue mitochondriale. En revanche, son fonctionnement est identique à celui de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthétase mitochondriale [120].



## 3.5 Le cycle de Calvin

Le cycle de Calvin-Benson a été découvert en 1947 par Calvin et Benson [121]. Il s'agit d'un ensemble de réactions enzymatiques permettant la fixation de  $\text{CO}_2$  dans une molécule organique en C3 et consommant le NADPH et l'ATP produits lors de la phase claire de la photosynthèse. La première étape est l'incorporation du  $\text{CO}_2$  dans un composé en C5 (le ribulose bis-phosphate) pour donner deux molécules d'un composé en C3 (l'acide phosphoglycérique). Cette réaction est catalysée par l'activité carboxylase de la Rubisco (EC 4.1.1.39), l'enzyme clef du cycle de Calvin. L'étape suivante est la réduction de l'acide phosphoglycérique en triose-phosphate. Cette étape est catalysée par la phosphoglycérokinase (EC 2.7.2.3), puis par la glycéraldéhyde phosphodéshydrogénase (EC 1.2.1.12), qui utilisent respectivement une molécule d'ATP et une molécule de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  pour réduire une molécule d'acide phosphoglycérique. Enfin, la dernière étape permet la régénération du ribulose bis-phosphate. Pour cela, trois molécules de  $\text{CO}_2$  doivent être fixées pour former six trioses-phosphate et ainsi régénérer trois molécules de ribulose bis-phosphate à partir de cinq d'entre eux. Cette régénération est une suite de réactions faisant intervenir des molécules en C7 (sédoheptulose), en C6 (fructose) et en C4 (érythrose). Les trois pentoses-phosphates formés sont convertis en ribulose bis-phosphate par phosphorylation à partir d'une molécule d'ATP, réaction catalysée par la phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19) [122] (Figure 15).

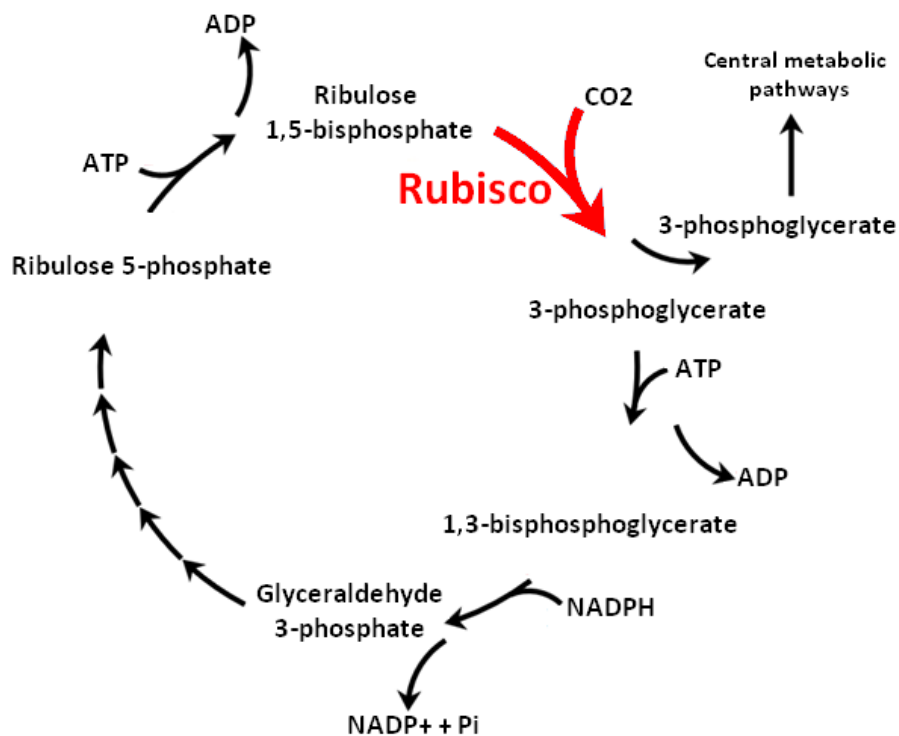


Figure 15 : Cycle de Calvin. Adapté de Raines *et al.* 2003 [109].

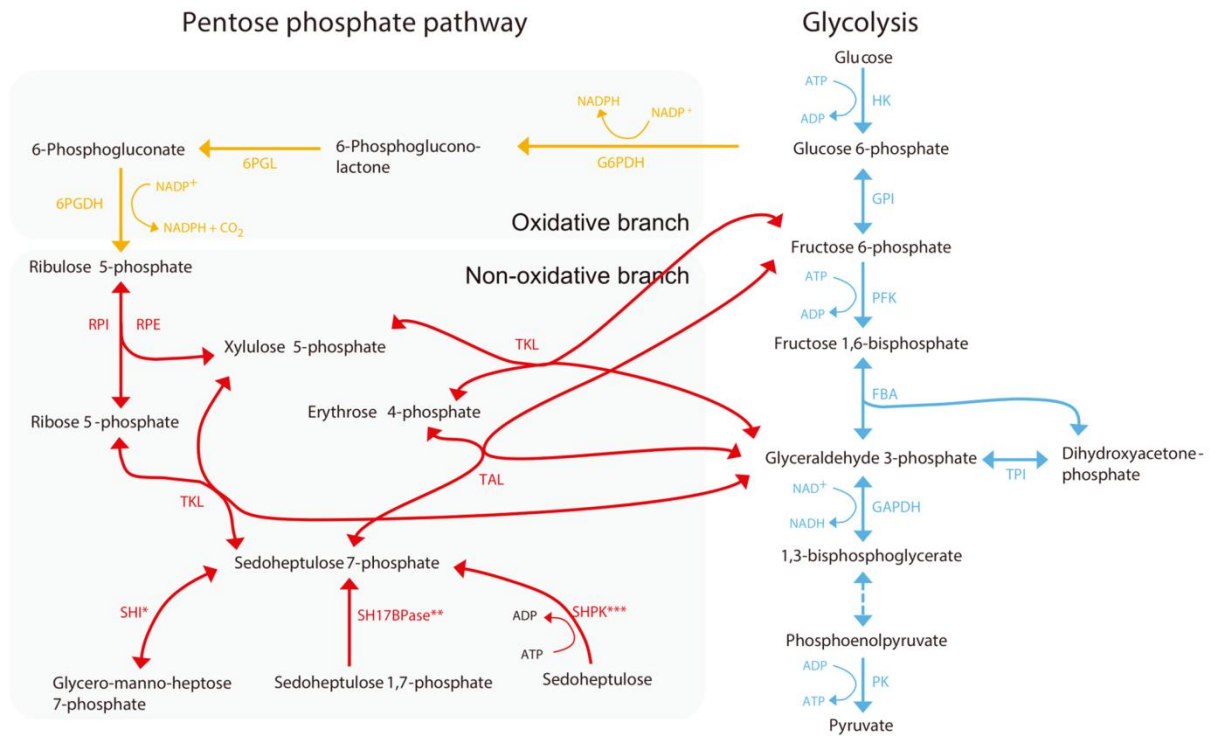
### 3.6 Autres voies cataboliques

#### 3.6.1 La glycolyse

La glycolyse a été décrite pour la première fois dans les années 1940 suite aux recherches d'Emden, Meyerhof et Parnas après les découvertes effectuées sur la fermentation dès les années 1860 par Pasteur [123]. Il s'agit d'une série de dix réactions enzymatiques qui permettent la dégradation du glucose en pyruvate tout en produisant de l'ATP et du pouvoir réducteur (NADH). Elle se déroule généralement dans le cytoplasme, mais certains organismes, tels que *Trypanosoma brucei*, possèdent des glycosomes, des organites où se déroule une partie de la glycolyse [124]. Chaque produit intermédiaire de la glycolyse peut servir de point d'entrée dans la chaîne de réactions. Ainsi d'autres sucres, comme le fructose, peuvent être catabolisés par la glycolyse lorsqu'ils sont convertis en l'un de ces produits intermédiaires (ici en fructose-6-phosphate). La glycolyse peut être divisée en deux parties : durant la première, de l'ATP est consommé, alors que durant la seconde, de l'ATP et du pouvoir réducteur sont produits.

La première étape de la glycolyse est la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate catalysée par une hexokinase (EC 2.7.1.1) qui fixe un phosphate sur le glucose en convertissant une molécule d'ATP en ADP. La seconde étape est l'isomérisation réversible du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate catalysée par la phosphoglucose isomérase (EC 5.3.1.9). La troisième étape, catalysée par la phosphofructokinase (EC 2.7.1.11), permet la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-bisphosphate via une nouvelle molécule d'ATP convertie en ADP. La quatrième étape est le clivage du fructose-1,6-bisphosphate en dihydroxyacétone-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate. Cette étape réversible est catalysée par une aldolase (EC 4.1.2.13). Seul le glycéraldéhyde-3-phosphate peut entrer dans la seconde partie de la glycolyse. Lors de la cinquième étape, le dihydroxyacétone-phosphate est donc transformé en glycéraldéhyde-3-phosphate par isomérisation grâce à une triose-phosphate isomérase (EC 5.3.1.1). Les étapes suivantes, pouvant être considérées comme la seconde partie de la glycolyse, sont donc réalisées deux fois. La sixième étape permet la fixation d'un  $P_i$  sur le glycéraldéhyde-3-phosphate, qui devient du 1,3-bisphosphoglycérate tout en générant une molécule de NADH. Cette réaction est catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12). Lors de la septième étape, le phosphate est transféré à une molécule d'ADP, ce qui permet la formation d'une molécule d'ATP, le 1,3-bisphosphoglycérate étant transformé en 3-phosphoglycérate par la phosphoglycérate kinase (EC 2.7.2.3). La phosphoglycérate mutase (EC 5.4.2.11) intervient dans la huitième étape pour transférer le phosphate restant du C3 au C2 transformant le 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate. Lors de la neuvième étape, une molécule d' $H_2O$  est retirée du 2-phosphoglycérate par une énoïase (EC 4.2.1.11), créant du phosphoénolpyruvate. Enfin, la pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) retire le phosphate

du phosphoénolpyruvate et le fixe à une molécule d'ADP, formant ainsi une nouvelle molécule d'ATP et une molécule de pyruvate. Cette dixième et dernière étape est la seule réaction irréversible de la seconde partie de la glycolyse. Le bilan final est donc la formation de deux molécules de pyruvate, deux ATP et deux NADH pour une molécule de glucose [125] (Figure 16).



**Figure 16 : Glycolyse et voie des pentoses-phosphates.** 6PGDH : 6-Phosphogluconate déshydrogénase. 6PGL : 6-Phosphogluconolactonase. G6PDH : Glucose 6-phosphate déshydrogénase. RPI : Ribose 5-phosphate isomérase. RPE : Ribulose 5-phosphate épimérase. TKL : Transkétolase. TAL : Transaldolase. SHI : Sedoheptulose 7-phosphate isomérase. SH17BPase\*\* : Sedoheptulose 1,7-bisphosphatase. SHPK : Sedoheptulokinase. HK : Hexokinase. GPI : Glucose phosphate isomérase. PFK : Phosphofructokinase. FBA : Fructose bisphosphate aldolase. TPI : Triosephosphate isomérase. GAPDH : Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase. PK : Pyruvate kinase. Stincone *et al.* 2014.

### 3.6.2 La voie des pentoses-phosphates

La voie des pentoses-phosphates a été décrite pour la première fois en 1955 par Gunsalus, Horecker et Wood [126]. Cette voie est interconnectée avec le cycle de Calvin et la glycolyse. Elle se divise en deux parties, une oxydative (qui produit deux molécules de NADPH) et une non-oxydative. Seule la partie non-oxydative se retrouve chez tous les organismes (la partie oxydative est bien présente chez la majorité des eucaryotes) et semble pouvoir être réalisée sans l'intervention des enzymes, ce qui en fait potentiellement l'une des voies métaboliques les plus anciennes [127]. La voie des pentoses-phosphates se retrouve généralement dans le cytoplasme, hormis chez les

organismes photosynthétiques où une grande partie des réactions prennent place dans le chloroplaste (dont l'entièreté de la partie oxydative) [128].

La partie oxydative de la voie des pentoses-phosphates se compose de trois étapes et est le point d'entrée du glucose-6-phosphate dans la voie. La première étape de la voie des pentose-phosphates fait intervenir la glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.49), qui convertit le glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone tout en produisant une molécule de NADPH. La seconde étape est l'hydrolyse du 6-phosphogluconolactone en 6-phosphogluconate, qui est catalysée par la 6-phosphogluconolactonase (EC 3.1.1.31). La troisième étape consiste en la décarboxylation du 6-phosphogluconate en ribulose-5-phosphate, réaction catalysée par la 6-phosphogluconate déshydrogénase (EC 1.1.1.44) et générant une nouvelle molécule de NADPH. Le ribulose-5-phosphate entre ensuite dans la partie non-oxydative de la voie des pentoses-phosphates. Lors de la quatrième étape, le ribulose-5-phosphate est (i) soit transformé en ribose-5-phosphate par une ribose-5-phosphate isomérase (EC 5.3.1.6), (ii) soit transformé en xylulose-5-phosphate par une ribulose-5-phosphate épimérase (EC 5.1.3.1). La cinquième étape est le remaniement par une transkétolase (EC 2.2.1.1) du ribose-5-phosphate et du xylulose-5-phosphate en sedoheptulose-7-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate. Puis, durant la sixième étape, le sedoheptulose-7-phosphate et le glycéraldéhyde-3-phosphate sont remaniés par une transaldolase (EC 2.2.1.2) en érythrose-4-phosphate et fructose-6-phosphate. Pour finir, l'érythrose-4-phosphate et le xylulose-5-phosphate sont remaniés par une transkétolase (EC 2.2.1.1) en glycéraldéhyde-3-phosphate et fructose-6-phosphate. Ainsi, au cours de la voie des pentoses-phosphates, il y a production de deux molécules de NADPH et formation d'intermédiaires de la glycolyse [128] (Figure 16).

### 3.6.3 La $\beta$ -oxydation

La  $\beta$ -oxydation des acides gras a été découverte en 1904 par Knoop [129]. Elle se retrouve principalement dans la mitochondrie, mais également au sein du peroxyosome, qui gère les acides gras qui ne peuvent pas entrer dans la mitochondrie (par exemple, les acides gras à très longue chaîne) [130]. Il s'agit d'un cycle de quatre réactions enzymatiques qui clive les acides gras afin de leur retirer deux carbones sous forme d'acétyl-coA, qui peut alors être utilisé par le cycle de Krebs. La  $\beta$ -oxydation est répétée autant de fois que nécessaire sur les acides gras à longues chaînes, il y a alors production de plusieurs acétyl-coA pour un acide gras (le nombre d'acétyl-coA étant fonction de la longueur de la chaîne de carbones de l'acide gras). Lors de la dégradation des acides gras, il y a également formation de pouvoir réducteur (NADH), qui sera utilisé par la phosphorylation oxydative.

Au cours de la première étape de la  $\beta$ -oxydation, un acyl-coA subit tout d'abord une déshydrogénation catalysée par une acyl-coA déshydrogénase (EC 1.3.8.7, à longue chaîne : EC 1.3.8.8 ou à très longue chaîne : EC 1.3.8.9) qui le transforme en *trans*-2-enoyl-coA et permet la

formation d'une molécule de  $\text{FADH}_2$ . La seconde étape fait intervenir une enoyl-coA hydratase (EC 4.2.1.17 ou à longue chaîne : EC 4.2.1.74) qui forme un L-3-hydroxyacyl-coA en hydratant le *trans*-2-enoyl-coA. La troisième étape est une nouvelle déshydrogénation catalysée cette fois par une 3-hydroxyacyl-coA déshydrogénase (EC 1.1.1.35 ou à longue chaîne : EC 1.1.1.211) qui transforme le L-3-hydroxyacyl-coA en 3-ketoacyl-coA, tout en formant une molécule de NADH. Pour finir, lors de la quatrième et dernière étape de la  $\beta$ -oxydation, une ketothiolase (ou acétyl-coA acyltransférase, EC 2.3.1.16) clive un acétyl-coA du 3-ketoacyl-coA tout en le remplaçant par un nouveau coenzyme A. Il y a donc libération d'une molécule d'acétyl-coA, un  $\text{FADH}_2$ , un NADH et une molécule (n-2)acyl-coA qui peut subir un nouveau cycle de  $\beta$ -oxydation [130].

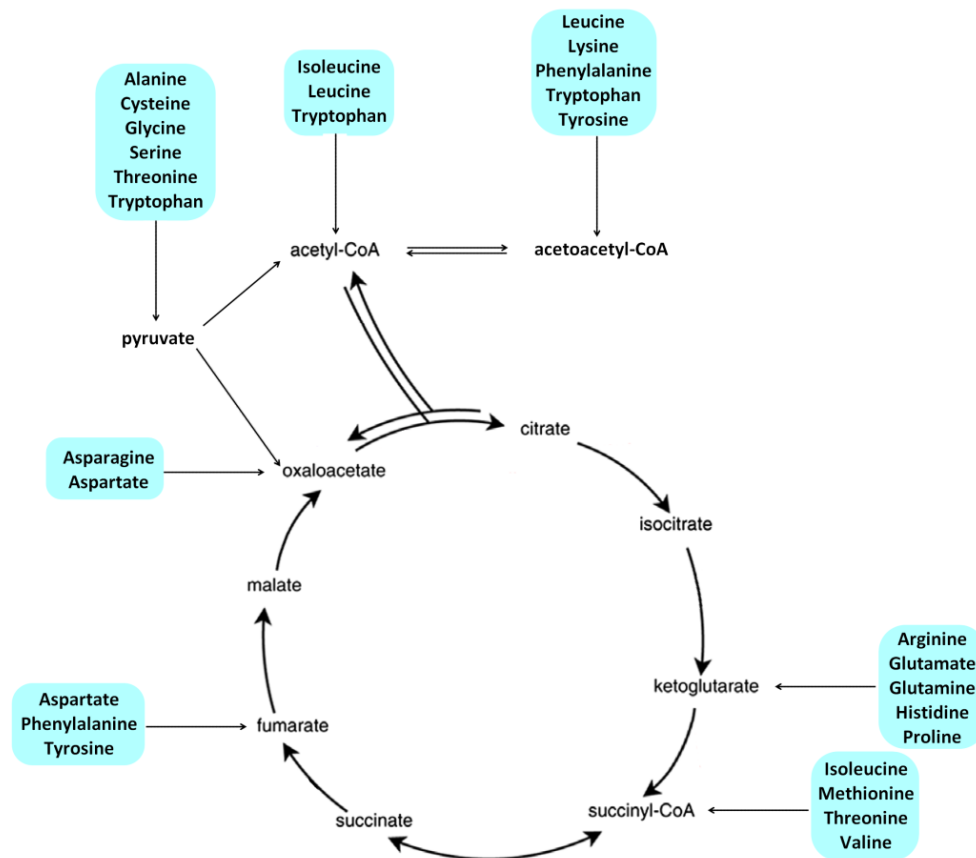


Figure 17 : Vue générale du devenir du squelette carboné des acides aminés. Adapté de Berg *et al.* 2002.

### 3.6.4 Dégradation des acides aminés

Vingt acides aminés se retrouvent universellement au sein des êtres vivants et sont les constituants des protéines : Alanine, Arginine, Asparagine, Aspartate, Cystéine, Glutamate, Glutamine, Glycine, Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Méthionine, Phénylalanine, Proline, Sérine, Thréonine, Tryptophane, Tyrosine et Valine. La dégradation des acides aminés peut produire des intermédiaires du cycle de Krebs (acétyl-coA,  $\alpha$ -ketoglutarate, succinyl-coA, fumarate et oxaloacétate) ou des produits pouvant donner de l'acétyl-coA (pyruvate et acétoacétyl-coA) [131] (Figure 17).

Les acides aminés peuvent subir deux modifications : la transamination, transfert du groupe aminé de l'acide aminé à un  $\alpha$ -ketoacide, ou la désamination, retrait du groupe aminé. Un exemple de transamination est celle de l'alanine avec l' $\alpha$ -ketoglutarate catalysée par l'alanine transaminase (EC 2.6.1.12 ou EC 2.6.1.2) qui forme un pyruvate et un glutamate. La désamination survient entre autres pour le glutamate, ce qui forme à nouveau de l' $\alpha$ -ketoglutarate. Cette réaction est catalysée par la glutamate déshydrogénase (EC 1.4.1.2, EC 1.4.1.3 ou EC 1.4.1.4). Enfin, parmi les réactions les plus courantes, il existe également des interconversions entre acides aminés. Par exemple, deux glycines peuvent être converties en sérine (et inversement) grâce à la sérine hydroxyméthyltransférase (EC 2.1.2.1) et au complexe « glycine cleavage system » (contenant la glycine déshydrogénase ou protéine P : EC 1.4.4.2, l'aminométhyltransférase ou protéine T : EC 2.1.2.10, la dihydrohypolamide déshydrogénase : EC 1.8.1.4 et la protéine H : gcvH) [131].

#### 4. *Euglena gracilis*

##### 4.1 Généralités

Les espèces d'*Euglena* ont été les premiers protistes observés par microscopie optique en 1674 par Van Leeuwenhoek qu'il décrit à l'époque comme des « animalcules » [132]. Faire une classification taxonomique des euglénidés a longtemps été très compliqué, puisque certaines espèces possèdent toutes les caractéristiques morphologiques du groupe mais ne présentent pas de chloroplaste. Ce n'est qu'en 1994 que Gockel confirme l'appartenance du genre *Astasia* aux euglénidés et que les espèces concernées sont renommées (ex. *Euglena longa*) [133]. A présent, nous savons qu'*Euglena gracilis* est une algue secondaire verte unicellulaire ayant acquis son chloroplaste par endosymbiose secondaire entre son ancêtre Euglenozoa phagotrophe et une algue verte primaire de type prasinophyte [54]. Elle appartient au groupe des Euglenozoa que l'on retrouve au sein du super-groupe des Excavata et est une « proche » parente des kinétoplastidés, qui sont pour l'essentiel parasites [4, 5].

*Euglena gracilis* est une algue d'eau douce qui se retrouve souvent dans les eaux saumâtres. Elle mesure environ 50 µm de long pour 10 µm de large (bien que la taille puisse varier d'une souche à l'autre) et possède deux flagelles dont l'un, très court, ne sort pas de la poche flagellaire. Elle dispose des organites classiques des eucaryotes photosynthétiques : un noyau, des mitochondries, des chloroplastes, des structures de Golgi, un reticulum endoplasmique, des vacuoles et péroxysomes. Les chloroplastes contiennent des pyrénoides nécessaires à la synthèse du paramylon, un β-1,3-glucane qu'elle stocke (au lieu de l'amidon = α-1,4- + α1,6-glucane). Elle présente de plus un stigma ou « eyespot » photosensible à la base de sa poche flagellaire, qui lui sert à s'orienter par phototaxie [134]. C'est un organisme à la fois photosynthétique mixotrophe, anaérobie facultatif, qui peut utiliser un grand nombre de sources de carbone organique telles que l'éthanol, l'acétate, l'acide succinique, le lactate, le glucose, etc. L'apport des vitamines B1 et B12 est nécessaire à sa croissance et elle requiert également l'ajout d'éléments minéraux à de faibles concentrations [135-142]. Cependant, une concentration trop élevée en carbone entraîne la diminution, voire la répression, de la synthèse des chlorophylles, ce qui entraîne une diminution de la photosynthèse, et ce de façon transitoire [143-145].

*Euglena gracilis* présente une morphologie variable suivant un cycle circadien, passant d'une forme ovoïde à une forme allongée. Lorsque l'algue est synchronisée sur un cycle « jour/nuit », sa morphologie est directement corrélée à sa capacité photosynthétique, la forme ovoïde présentant la capacité photosynthétique la plus basse, là où la forme allongée présente la capacité photosynthétique la plus élevée, celle-ci survenant en milieu de jour. La production d'énergie par la respiration et, dans une moindre mesure, par la photosynthèse, est nécessaire au changement

morphologique. De plus, les cellules se déplacent de manière caractéristique grâce à leur capacité à s'étirer et à se mettre en boule successivement, ainsi qu'au mouvement répétitif et complexe de leur long flagelle initiant une trajectoire légèrement hélicoïdale. Cette façon de se déplacer est appelée « mouvement euglénoïde » et est indépendante du changement morphologique [146]. Ce mouvement, ainsi que le système d'alimentation rudimentaire toujours présent chez *Euglena gracilis*, sont des vestiges du mode de vie phagotrophique de son ancêtre [147].

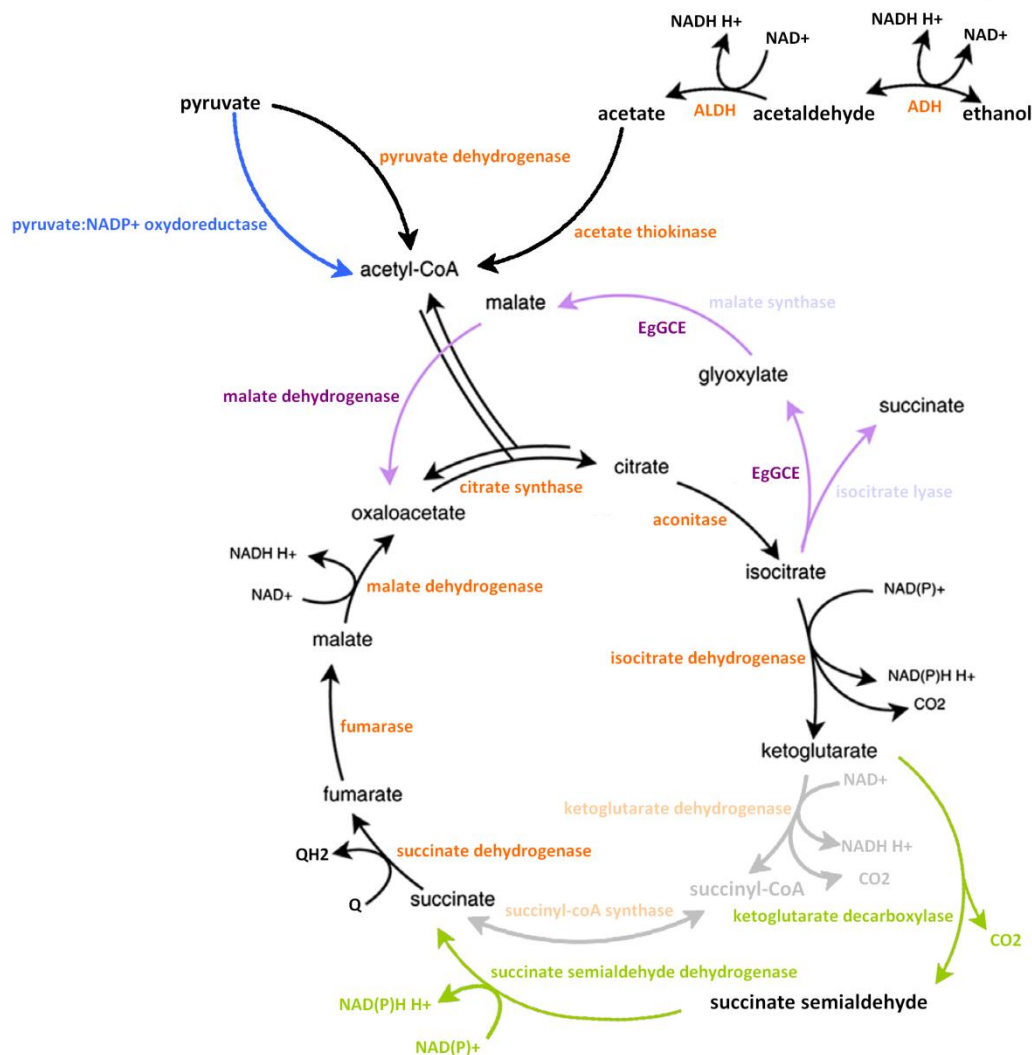


Figure 18 : Aperçu des particularités du métabolisme du carbone au sein des mitochondries d'*Euglena gracilis*. Adapté de Nakazawa *et al.* 2011, Shigeoka *et al.* 1986, Müller *et al.* 2012 et Yoval-Sánchez *et al.* 2011.



## 4.2 Particularités du métabolisme énergétique

### 4.2.1 La chaîne respiratoire mitochondriale d'*Euglena gracilis*

*Euglena gracilis* possède les complexes typiques de la chaîne respiratoire mitochondriale, disposant de trois sites de translocation de protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire (complexes I, III et IV), avec cependant un complexe III particulier puisqu'il est résistant au myxothiazol [148]. Elle présente aussi une oxydase alternative (AOX) très active à pH 6,5 et à des températures inférieures à 20°C [149], ainsi qu'une activité cytochrome *c* oxydase partiellement insensible au cyanure en présence de L-lactate [148]. *Euglena gracilis* semble disposer d'autres voies alternatives très particulières, dont une voie présentant une activité similaire à celle du complexe III (y compris le transport de protons), mais insensible à l'antimycine A. Cette voie alternative (appelée *bc<sub>1</sub>* bypass) contourne la voie des cytochromes *bc<sub>1</sub>* (ou complexe III), mais ne transporte qu'une fraction mineure d'électrons en absence d'antimycine A [150], alors qu'elle devient la voie préférentielle après une longue exposition à l'antimycine (environ 20 h) et est sensible à un autre inhibiteur classique du complexe III, le myxothiazol [140, 148]. De même, en conditions anaérobies, *Euglena gracilis* utilise préférentiellement le D-lactate comme donneur d'électrons et le fumarate comme accepteur. Elle dispose alors de déshydrogénases alternatives indépendante du NADH (ou D-iLDH) qui transmettent les électrons du D-lactate à un pool de rholoquinone, et d'une fumarate réductase qui transfère les électrons du pool de rholoquinone réduit au fumarate [8, 151]. Pour finir, son complexe IV présente une composition en sous-unités tout à fait particulière [152].

### 4.2.2 Autres voies métaboliques

L'isocitrate lyase et la malate synthase, les deux enzymes impliquées dans le cycle du glyoxylate, sont classiquement utilisées comme des marqueurs du glyoxysome, un organite que l'on retrouve chez les plantes et certains champignons et où se déroule notamment le cycle du glyoxylate. Chez *Euglena gracilis*, le cycle du glyoxylate est localisé au sein de la mitochondrie [153, 154] et l'isocitrate lyase et la malate synthase ne forme qu'une seule enzyme bifonctionnelle, appelée EgGCE (pour *Euglena gracilis* Glyoxylate Cycle Enzyme), qui possède deux domaines distincts, un en N-terminal pour l'activité malate synthase et un en C-terminal pour l'activité isocitrate lyase [153, 155]. Une enzyme bifonctionnelle pour le cycle du glyoxylate est également retrouvée chez *Caenorhabditis elegans* (Opisthokonta), chez qui l'activité isocitrate lyase se trouve en N-terminal, révélant une acquisition indépendante de l'enzyme bifonctionnelle par évolution convergente chez ces deux organismes [155, 156].

De la même façon, *Euglena gracilis* ne semble pas présenter le complexe  $\alpha$ -ketoglutarate déshydrogénase intervenant dans le cycle de Krebs, mais une  $\alpha$ -ketoglutarate décarboxylase (EC 4.1.1.71), qui transforme l' $\alpha$ -ketoglutarate en succinate semialdéhyde tout en libérant une molécule de  $\text{CO}_2$ , et dont l'activité est couplée à une succinate semialdéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.16) [157, 158]. Cette enzyme se retrouve également chez certaines  $\alpha$ -protéobactéries, telles que *Bradyrhizobium japonicum* [159].

Contrairement à ce qui a été décrit [142, 160-162], *Euglena gracilis* dispose bien d'un complexe pyruvate déshydrogénase (E1 : pyruvate déshydrogénase, E2 : dihydrolipoyl transacétylase et E3 : dihydrolipoyl déshydrogénase), fonctionnel en conditions aérobies, et dont l'expression est inhibée en conditions anaérobies [8, 163]. Elle dispose cependant bien d'une pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoréductase (PNO) sensible à l' $\text{O}_2$  et proche de la pyruvate:ferrédoxine oxidoréductase, habituellement présente chez les organismes dépourvus de mitochondries, qui remplace l'activité pyruvate décarboxylase du complexe pyruvate déshydrogénase en conditions anaérobies [8, 163]. Cette enzyme, issue de la fusion entre la pyruvate:ferrédoxine oxidoréductase et un domaine NADP<sup>+</sup> réductase, se retrouve également chez *Blastocystis hominis* (Straménopiles, SAR) ou encore *Cryptosporidium parvum* (Alveolata, SAR), où elle est apparue indépendamment de chez *Euglena gracilis* [8] (Figure 18).

**But du travail**

Au vue de l'origine chimérique d'*Euglena gracilis*, la question principale qui a amené à la réalisation de cette thèse est : de quelle(s) façon(s) l'intégration du chloroplaste suite à l'endosymbiose secondaire a-t-elle influé sur le métabolisme énergétique d'*Euglena gracilis* ? Au cours de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés au métabolisme énergétique d'*Euglena gracilis* et plus particulièrement à sa chaîne respiratoire mitochondriale.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence des conditions de culture sur le métabolisme énergétique d'*Euglena gracilis* en nous focalisant sur la respiration et la photosynthèse. Pour cela, nous avons utilisé des approches biochimiques en cultivant *Euglena gracilis* sous différentes conditions faisant varier l'intensité lumineuse, la source de carbone et sa concentration. Puis, nous avons analysé le taux de croissance et la durée de la phase exponentielle, la composition pigmentaire, les capacités respiratoire et photosynthétique et l'abondance des complexes membranaires (Chapitre 1).

Ensuite, par des analyses protéomiques et bioinformatiques, nous avons mis en évidence la composition atypique en sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire d'*Euglena gracilis*. Pour cela, nous avons séparé les complexes sous forme native, mais également sous forme dénaturée, afin d'isoler les sous-unités qui les composent. Les complexes entiers et les spots protéiques correspondant aux sous-unités ont été analysés par spectrométrie de masse, puis identifiés à l'aide des banques publiques d'EST et des données génomiques préliminaires de nos collaborateurs britanniques (Prof. Mark C. Field, University of Dundee). Dans le même temps, les sous-unités décrites classiquement chez les eucaryotes et celles décrites comme spécifiques aux kinétoplastidés ont été recherchées chez *Euglena gracilis* à l'aide de logiciels tels que OrthoMCL et HaMStR (Chapitre 2).

Pour finir, l'ensemble du métabolisme énergétique d'*Euglena gracilis* a été investigué au sein de différentes conditions de culture sélectionnées sur base des analyses effectuées dans le chapitre 1. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'influence des conditions de culture sur l'abondance relative des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique d'*Euglena gracilis*. A cette fin, nous avons utilisé une approche protéomique comparative (iTRAQ) sur les fractions soluble, membranaire et mitochondriale des cultures d'*Euglena gracilis*. En parallèle, l'approche transcriptomique nous a permis, en sus d'acquérir de nouvelles données transcriptomiques relativement plus complètes que les données publiques, d'obtenir une quantification relative des ARN totaux d'*Euglena gracilis* dans différentes conditions en séquençant chacun des extraits séparément (Chapitre 3).



## CHAPITRE 1

Influence des conditions de culture  
sur le métabolisme énergétique  
d'*Euglena gracilis*.



## CHAPITRE 2

La chaîne respiratoire mitochondriale de l'algue secondaire verte *Euglena gracilis* partage de nombreuses sous-unités additionnelles avec les Trypanosomatidae parasites.





# LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE DE L'ALGUE SECONDAIRE VERTE *EUGLENA GRACILIS* PARTAGE DE NOMBREUSES SOUS-UNITÉS ADDITIONNELLES AVEC LES TRYPANOSOMATIDAE PARASITES.

## AVANT-PROPOS

Abondamment étudiée chez les kinétoplastidés parasitaires (trypanosomes), où elle peut être une cible pour des traitements thérapeutiques, leur mitochondrie présente quelques particularités. Tout d'abord, au cours de leur cycle de vie complexe, ces parasites présentent deux types de chaînes de transport d'électrons. Dans la forme procyclique (dans l'insecte), la chaîne de transport d'électrons respiratoire est constituée de l'ensemble classique de complexes I à IV. Ceux-ci transportent les électrons de donneurs réduits à l'O<sub>2</sub> tout en permettant la translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, ce qui génère le gradient électrochimique nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthétase. Dans la forme circulante (dans la circulation sanguine de l'Homme), la chaîne de transport d'électrons n'est pas couplée à une translocation de protons et comporte uniquement une glycérol-3-phosphate déshydrogénase et une AOX, qui transfèrent les électrons du glycérol-3-phosphate à l'O<sub>2</sub>. Ensuite, il s'avère que, dans la forme procyclique, les kinétoplastidés disposent, pour chacun des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, d'un ensemble de sous-unités additionnelles apparemment spécifiques puisqu'elles ne semblent avoir aucun homologue parmi les autres groupes eucaryotes.

Dans ce chapitre, dont les résultats ont déjà fait l'objet d'une publication, nos analyses protéomiques et bioinformatiques de la composition en sous-unités des complexes mitochondriaux chez *Euglena gracilis* mettent en évidence un total de 89 sous-unités additionnelles parmi lesquelles 48 sous-unités eucaryotes classiques (parmi les 96 communes aux plantes, aux champignons et aux mammifères) et 41 sous-unités additionnelles communes aux Euglenozoa (parmi les 81 initialement décrites comme spécifiques aux kinétoplastidés). Ainsi, nous démontrons que la moitié des sous-unités décrites comme spécifiques aux kinétoplastidés sont au moins communes à l'ensemble des Euglenozoa et ne peuvent donc être associées au mode de vie parasitaire des kinétoplastidés. En revanche, la présence d'une partie de ces sous-unités pourrait expliquer les particularités de la chaîne respiratoire des Euglenozoa observées au niveau biochimique.

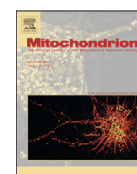
Dans ce travail, les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées par Hervé Degand et Pierre Morsomme (Université Catholique de Louvain), les mesures d'activité ATPase par Alexa Villavicencio-Queijeiro (Universidad Nacional Autónoma de México), les mesures d'inhibition de la respiration par Marie Lapaille (ULg) et la séparation des sous-unités des complexes sur gel SDS-PAGE par Laura Cilibrasi au cours de son mémoire de Master (2011 – 2012) sous ma supervision.

Erratum : La glycérol-3-phosphate déshydrogénase n'a pas été retrouvée dans nos analyses protéomiques chez *Euglena gracilis*, il s'agit de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.



Contents lists available at ScienceDirect

## Mitochondrion

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mito](http://www.elsevier.com/locate/mito)

## The mitochondrial respiratory chain of the secondary green alga *Euglena gracilis* shares many additional subunits with parasitic Trypanosomatidae



Emilie Perez<sup>a,b</sup>, Marie Lapaille<sup>a</sup>, Hervé Degand<sup>d</sup>, Laura Cilibrasi<sup>a</sup>, Alexa Villavicencio-Queijeiro<sup>e</sup>, Pierre Morsomme<sup>d</sup>, Diego González-Halphen<sup>e</sup>, Mark C. Field<sup>f</sup>, Claire Remacle<sup>a,c</sup>, Denis Baurain<sup>b,c,\*</sup>, Pierre Cardol<sup>a,c,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Genetics and Physiology of Microalgae, Department of Life Sciences, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

<sup>b</sup> Eukaryotic Phylogenomics, Department of Life Sciences, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

<sup>c</sup> PhytoSYSTEMS, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

<sup>d</sup> Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

<sup>e</sup> Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>f</sup> Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, University of Dundee, Dundee, Scotland DD1 5EH, United Kingdom

## ARTICLE INFO

Available online 21 February 2014

## Keywords:

Euglenozoa

Trypanosomatidae

OXPHOS

Proteomics

Sequence database mining

Large-scale phylogenetics

## ABSTRACT

The mitochondrion is an essential organelle for the production of cellular ATP in most eukaryotic cells. It is extensively studied, including in parasitic organisms such as trypanosomes, as a potential therapeutic target. Recently, numerous additional subunits of the respiratory-chain complexes have been described in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. Since these subunits had apparently no counterparts in other organisms, they were interpreted as potentially associated with the parasitic trypanosome lifestyle. Here we used two complementary approaches to characterise the subunit composition of respiratory complexes in *Euglena gracilis*, a non-parasitic secondary green alga related to trypanosomes. First, we developed a phylogenetic pipeline aimed at mining sequence databases for identifying homologues to known respiratory-complex subunits with high confidence. Second, we used MS/MS proteomics after two-dimensional separation of the respiratory complexes by Blue Native- and SDS-PAGE both to confirm *in silico* predictions and to identify further additional subunits. Altogether, we identified 41 subunits that are restricted to *E. gracilis*, *T. brucei* and *T. cruzi*, along with 48 classical subunits described in other eukaryotes (*i.e.* plants, mammals and fungi). This moreover demonstrates that at least half of the subunits recently reported in *T. brucei* and *T. cruzi* are actually not specific to Trypanosomatidae, but extend at least to other Euglenozoa, and that their origin and function are thus not specifically associated with the parasitic lifestyle. Furthermore, preliminary biochemical analyses suggest that some of these additional subunits underlie the peculiarities of the respiratory chain observed in Euglenozoa.

© 2014 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

## 1. Introduction

The mitochondrion is a eukaryotic organelle acquired through endosymbiosis of an  $\alpha$ -proteobacterium by either an ancestral eukaryote (Dyall et al., 2004; Gray et al., 1999) or an archaeon (Martin and Muller, 1998). Subsequently the vast majority of genes encoding mitochondrial proteins were transferred from the mitochondrial genome to the nuclear genome, and the residual mitochondrial genome

mainly encodes products involved in the synthesis of mitochondrial proteins (tRNA and rRNA) and some subunits of the oxidative phosphorylation complexes (Gabaldon and Huynen, 2005; Saccone et al., 2006). The mitochondrion plays a central role in energy production as the site of the latter stages of respiration, *i.e.*, the Krebs cycle in the matrix and oxidative phosphorylation in the inner membrane. The respiratory chain consists of four classical multi-protein complexes: complex I (CI or NADH:ubiquinone oxidoreductase, EC 1.5.6.3), complex II (CII or succinate:ubiquinone oxidoreductase, EC 1.3.5.1), complex III (CIII or ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase, EC 1.10.2.2) and complex IV (CIV or cytochrome *c* oxidase, EC 1.9.3.1). Except for CII, these complexes couple electron transfer with translocation of protons from the matrix to the intermembrane space, generating a proton gradient used by a fifth complex (CV or F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, EC 3.6.3.14) for ATP synthesis. Many organisms however have alternative pathways that transfer

\* Correspondence to: D. Baurain, Bvd du Rectorat, 27, B22, Institute of Botany, Dept of Life Sciences, University of Liège, 4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 3663864.

\*\* Correspondence to: P. Cardol, Bvd du Rectorat, 27, B22, Institute of Botany, Dept of Life Sciences, University of Liège, 4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 3663840.

E-mail addresses: [denis.baurain@ulg.ac.be](mailto:denis.baurain@ulg.ac.be) (D. Baurain), [Pierre.cardol@ulg.ac.be](mailto:Pierre.cardol@ulg.ac.be) (P. Cardol).

electrons without concomitant proton translocation, such as type-II NAD(P)H dehydrogenases (from NAD(P)H to ubiquinone) and alternative oxidases (AOX; from ubiquinol to molecular oxygen) (Michalecka et al., 2003; Van Aken et al., 2009).

Phylogenetic relationships amongst eukaryotes are notoriously difficult to resolve and thus highly disputed. In two recent syntheses of the phylogenetic literature, eukaryotes are considered as composed of about 6–9 major lineages, of which well-studied green plants, fungi and animals only correspond to a very small fraction (Adl et al., 2012; Walker et al., 2011). Amongst these major lineages excavates are a putative assemblage of (often heterotrophic) flagellates, proposed on the basis of shared morphological characters (e.g., the ventral feeding groove and associated cytoskeletal structures) and molecular data. Excavates are subdivided into two subgroups, Metamonada and Discoba, the latter consistently recovered in phylogenomic analyses (Hampl et al., 2009; Zhao et al., 2012). Within Metamonada, most lineages lack typical mitochondria and instead possess hydrogenosomes (e.g., *Trichomonas* in parabasalids) or mitosomes (e.g., *Giardia* in diplomonads) (Adl et al., 2012; Walker et al., 2011). In contrast, the three lineages comprising Discoba are mostly mitochondriate: Heterolobosea have a regular mitochondrion with a very gene-rich genome (e.g., *Naegleria gruberi*) (Gray et al., 2004), Jakobids harbour mitochondria retaining one of the highest gene complements known to date (e.g., *Reclinomonas* and *Andalucia*) (Burger et al., 2013; Lang et al., 1997), and, finally, Euglenozoa are a very diverse collection of protists, some of which are parasitic (e.g., Trypanosomatidae in kinetoplastids), others photosynthetic (e.g., euglenophytes in euglenids) or free-living heterotrophs (e.g., diplomemids). Yet, all of them present very complex mitochondria with discoidal cristae (Simpson, 1997).

Amongst the studied Trypanosomatidae are many pathogens, including *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*, respectively causing sleeping sickness, Chagas' disease and leishmaniasis in humans. Extensively studied, these parasites are characterised by a complex life cycle and an energetic metabolism possessing many unique features. On the one hand, an alternative electron transfer chain, composed of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD) and an alternative oxidase (TAO or AOX), replaces the classical complexes I–IV during the bloodstream (or mammalian-infective) stage (Chaudhuri et al., 2006). On the other hand, respiratory complexes I–IV and the ATP synthase (complex V) found in the procyclic (or insect-infective) stage of trypanosomes possess many apparently-specific additional subunits (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009; Panigrahi et al., 2008; Zikova et al., 2008, 2009).

*Euglena gracilis* is a secondary green alga, stemming from a secondary endosymbiosis between a prasinophyte green alga and a eukaryotic phagotroph belonging to the euglenids (Gibbs, 1981; Turmel et al., 2009). The *E. gracilis* mitochondrion harbours all of the classical respiratory-chain complexes. However, besides CIII, that is sensitive to antimycin A but insensitive to myxothiazol (Moreno-Sánchez et al., 2000), an antimycin A-resistant alternative pathway with CIII-like activity (including the proton translocation) carries a minor fraction of the electron flux in the presence of antimycin A (Sharpless and Butow, 1970b). *E. gracilis* also has an AOX that is active at pH 6.5 and at temperatures below 20 °C (Castro-Guerrero et al., 2004), as well as a cytochrome *c* oxidase activity partially insensitive to cyanide in the presence of L-lactate (Moreno-Sánchez et al., 2000). Its CIV, meanwhile, has a very unusual subunit composition (Bronstrup and Hachtel, 1989).

In this work, we analysed the subunit composition of the classical respiratory chain complexes (CI–V) in *E. gracilis* by combining targeted proteomics, complete proteome database mining and thorough phylogenetic analyses. We show that beyond the subunits found in all mitochondriate eukaryotes studied so far, *E. gracilis* mitochondria also contain a minimum of 40 subunits previously identified only in parasitic Trypanosomatidae (kinetoplastids). Their presence in this photosynthetic alga belonging to a group of non-parasitic euglenids and, for some also retained in the colourless *Euglena longa* and/or in the free-

living *Diplonema papillatum* (diplomemids), extends their distribution to at least Euglenozoa as a whole. These data also strongly suggest that these additional subunits are not associated with a parasitic lifestyle, but rather have a fundamental role in the Euglenozoa.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strain and growth conditions

The *E. gracilis* strain used in this work (SAG 1224-5/25) was obtained from the University of Göttingen (Sammlung von Algenkulturen, Germany). Cells were grown in the dark (DK) or under low (50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; LL) or medium (200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; ML) light at 25 °C, in liquid mineral Tris-minimum-phosphate (TMP) at pH 7.0 supplemented with a mix of vitamins (biotin 10<sup>-7</sup>%, B12 vitamin 10<sup>-7</sup>% and B1 vitamin 2  $\times$  10<sup>-5</sup>% (w/v)) and eventually with an organic carbon source (acetate 17 mM or 60 mM, ethanol 20 mM or 200 mM) (Harris, 1989; Mego and Farb, 1974; Sharpless and Butow, 1970a). In all experiments, cells in exponential phase (1–2  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL) were harvested by centrifugation for 10 min at 500–1500 g.

### 2.2. Oxygen consumption

Dark respiration rates were measured using a Clark Electrode (Hansatech Instruments, King's Lynn, England) as described in Duby and Matagne (1999). Rotenone (CI, 1–200  $\mu\text{M}$ ), antimycin A (CIII, 0.5–20  $\mu\text{M}$ ), SHAM (AOX, 0.2–2 mM), myxothiazol (CIII, 1–20  $\mu\text{M}$ ), cyanide (CIV, 0.02–2 mM) and oligomycin (CV, 0.5–40  $\mu\text{M}$ ) were added to cells grown in the presence of 60 mM acetate under low light.

### 2.3. Protein extracts

Crude total membrane fractions were prepared according to Remacle et al. (2001). The crude mitochondrial fraction was obtained as described by Moreno-Sánchez and Raya (1987). At the end of this protocol, the supernatant was centrifuged for 10 min at 10,000 g at 4 °C and the pellet containing all organelles was suspended in 250  $\mu\text{L}$  of buffer (Remacle et al., 2001) and loaded onto a mannitol/Percoll gradient (Percoll 250 mM mannitol 13%, 21% and 45% (v/v)). The gradient and sample were centrifuged for 50 min at 40,000 g at 4 °C. Mitochondria were collected at the interface between the 21% and 45% layers and then washed twice by centrifugation for 10 min at 11,000 g at 4 °C. The mitochondrial pellet was finally recovered in 300  $\mu\text{L}$  of buffer. Protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976).

To assess the purity of mitochondrial fractions, we first determined that chlorophyll content was below the detection threshold (<10<sup>-3</sup>  $\mu\text{g}$  chlorophyll per  $\mu\text{g}$  of protein). We also performed a preliminary analysis of the total protein content of mitochondrial fractions by LC-MS/MS analysis. Amongst the ~400 proteins that matched known proteins in GenBank (nr) (Benson et al., 2013) (E-value <10<sup>-10</sup>), >80% corresponded to known mitochondrial components (data not shown).

### 2.4. Enzyme activities

Enzyme activity analyses were performed on crude total membrane fractions (50–150  $\mu\text{g}$  of protein) from cells grown in the presence of 17 mM acetate under low light. CI (rotenone-sensitive NADH: duroquinone oxidoreductase), CII + III (succinate:cytochrome *c* oxidoreductase) and CIV (cyanide-sensitive cytochrome *c* oxidase) activities were measured as described in Cardol et al. (2002) and Remacle et al. (2001). CV (oligomycin-sensitive ATP synthase) activity was measured as described in Villavicencio-Queijeiro et al. (2009) based on the method from Pullman et al. (1960). The specific activities were reported as the activity inhibited by maximal concentration of inhibitors used *in vivo* (see Results).



### 2.5. Protein electrophoresis

To conduct Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) analyses (Schagger and von Jagow, 1991), protein complexes were first solubilised in the presence of either N-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (0.25–1.5%), digitonin (0.5–3.5%) (w/v), 750 mM epsilon-amino-n-caproic acid, 0.5 mM EDTA and 50 mM Bis-Tris pH 7.0, and centrifuged for 15 min at 15,000 g at 4 °C to remove insoluble matter. 0.5% (w/v) sodium taurodeoxycholate was then added to the supernatant prior to separation by electrophoresis on a 4–10% or 4–12% (w/v) polyacrylamide gradient BN gel.

Complex I activity was detected by incubating the gel in 100 mM HEPES–KOH pH 8.0 or Tris–HCl pH 7.5, containing 0.2 mM NADH and 0.1% (w/v) Nitroterazolium Blue chloride (NBT). ATP synthase activity was detected by incubating the gel in 50 mM HEPES pH 8.0, containing 10 mM ATP and 30 mM CaCl<sub>2</sub>.

BN-gels were also electroblotted according to standard protocols onto polyvinylidene fluoride membranes (Amersham GE Healthcare). Detection was performed using a BM Chemiluminescence Western blotting kit (Roche, Basel, Switzerland) with anti-rabbit peroxidase-conjugated antibodies. We used rabbit sera obtained against *Polytomella* sp. Pringsheim 198.80  $\beta$  subunit (1:200,000).

Coomassie-Blue staining and the second dimensional Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) procedure were performed as previously described (Cardol et al., 2004).

### 2.6. Mass spectrometry (MS) analyses

Stained proteins associated with spots or bands of interest were manually excised and analysed by mass spectrometry as described in Lapaille et al. (2010). MS and MS/MS queries were performed either against the GenBank protein database (nr) (Benson et al., 2013) or against a database of conceptually translated *E. gracilis* sequences assembled from contigs of 454 genomic reads and from contigs of public ESTs (see below). Precursor tolerance of 150 ppm for MS spectra and 0.1 Da fragment tolerance for MS/MS spectra were allowed. A charge state of +1 was selected. A single trypsin miscleavage and variable modifications consisting of methionine oxidation and acrylamide-modified cysteine were allowed. For protein direct identification with MASCOT, protein scores greater than 60 were considered as significant ( $P < 0.05$ ).

### 2.7. 454 sequencing of *E. gracilis* genome

*E. gracilis* DNA sequence data were obtained from strain Z1 (kind gift from William Martin, University of Düsseldorf). Cells were maintained in Huttner's medium at ~20 °C in Erlenmeyer flasks, and with ambient illumination. Cells were harvested by centrifugation for 10 min at 1000 g, washed twice with ice cold PBS and snap frozen on dry ice. Pellets were thawed and DNA extracted using a Qiagen DNAeasy extraction kit for total DNA (Qiagen UK, Manchester), and quality controlled using a NanoDrop spectrophotometer and by 1% agarose gel electrophoresis to determine that DNA was of high molecular weight. DNA was sequenced using a Titanium Roche 454 instrument and standard protocols. Approximately 1.7 million reads, corresponding to ~500 million bases that passed quality control were obtained and used in the subsequent analysis. Assembly of reads was performed using Newbler (<http://www.454.com/products/analysis-software/>).

### 2.8. In silico analyses

The initial dataset was composed of the complete protein databases of 21 organisms downloaded from various sources: *Escherichia coli* K-12 MG1655, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Rickettsia prowazekii* Rp22, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Prochlorococcus marinus* MIT9303, *Microcoleus chthonoplastes* sp. PCC 7420, *Komagataella pastoris* (NCBI RefSeq; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>), *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Saccharomyces cerevisiae* (Ensembl 68; <ftp://ftp.ensembl.org>), *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carterii*, *Micromonas* sp. RCC299, *N. gruberi*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Dictyostelium purpureum* (JGI Genome Portal; <http://genome.jgi.doe.gov>), *T. brucei*, *L. major* (TriTrypDB; <http://tritrypdb.org>), *Arabidopsis thaliana* (TAIR; <ftp://ftp.arabidopsis.org>), *Tetrahymena thermophila* (TGD; <http://www.ciliate.org>) and *Cyanidioschyzon merolae* (University of Tokyo; <http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp>).

To these complete proteomes, we added our database of translated *E. gracilis* sequences used in the MS analyses (see above). Briefly, the 23,372 ESTs of *E. gracilis* available at the NCBI (as of May 24, 2012) were contiged with CAP3 (Huang and Madan, 1999) and then translated in the reading frame yielding the longest protein fragment (using BioPerl *longorf.pl* script) (Stajich et al., 2002), whereas ~250-Mbp of 454 reads was assembled with the Velvet *de novo* assembler [version 1.2.03] (Zerbino and Birney, 2008) and then translated in the same way as EST contigs.

OrthoMCL [version 2.0.3] (Li et al., 2003) was used according to the protocol of Fischer et al. (2011) with modified settings: percent-match cutoff = 20 and E-value-exponent cutoff = 1. Five values were tested for the inflation parameter ( $I = 1.1–1.5$ ), but except for the tree in Fig. 3A (see below), the analyses reported in this article are all based on the MCL-1.2 run. Orthologous groups and singletons were annotated by BLASTP [version 2.2.25+] using a list of handpicked reference protein sequences (classical subunits of the complexes of the respiratory chain and those described in trypanosomes), which allowed us to identify the groups corresponding to the respiratory complex subunits. The sequences in each annotated orthologous group were aligned with Clustal Omega [version 1.1.0] (Sievers et al., 2011) and most alignments automatically cleared of the ambiguously aligned positions and of the sequences that were too incomplete to be accurately positioned in the trees (see below for details). The final alignments were then submitted to phylogenetic analysis with PhyML [version 3.0] (Guindon et al., 2010) using the LG + F +  $\Gamma_4$  model (Le and Gascuel, 2008; Yang, 1993). The starting tree for the heuristic search was computed by parsimony and the search included both NNI (nearest-neighbour interchange) and SPR (subtree pruning and regrafting) topological moves. The resulting trees were used to select the monophyletic subgroup of interest whenever there were several paralogues included in the same OrthoMCL orthologous group (i.e., plastidial or cytosolic in addition to mitochondrial sequences). Each selected group or subgroup was then used to build a HMM profile with HMMER [version 3.0] (<http://hmm.janelia.org>). Using a customised version of HaMStR [version 9] (Ebersberger et al., 2009), these HMM profiles allowed us to search for additional orthologous sequences in our untranslated *E. gracilis* database and in the (largely incomplete) EST databases of *E. longa* and *D. papillatum* available at the NCBI.

In order to analyse the evolution of QCR1, QCR2 and QCRTB2, we considered an additional batch of 47 broadly sampled organisms, for which we downloaded the complete protein databases: *Azospirillum brasilense*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Rhizopus delemar*, *Acanthamoeba castellanii*, *Polysphondylium pallidum*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *T. cruzi*, *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis*, *Trichomonas vaginalis*, *Galdieria sulphuraria*, *Ectocarpus siliculosus*, *Nannochloropsis gaditana*, *Cryptosporidium muris*, *P. marinus*, and *Oxytricha trifallax* (NCBI RefSeq); *Monosiga brevicollis*, *Lottia gigantea*, *Guillardia theta*, *Emiliania huxleyi*, *Aurantiochytrium limacinum*, *Aureococcus anophagefferens*, *Bigelowiella natans*, *Chlorella variabilis*, and *Ostreococcus tauri* (JGI Genome Portal); *Puccinia graminis*, *Ustilago maydis*, *Amphimedon queenslandica*, *Nematostella vectensis*, *Dictyostelium discoideum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Hyaloperonospora arabidopsidis*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Thalassiosira pseudonana*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* (Ensembl Genomes 17; <http://ensemblgenomes.org>), *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrella patens*, and *Oryza sativa* (Phytozome 9.0;

<http://www.phytozome.net>); *Chondrus crispus* (ENA; <http://www.ebi.ac.uk/ena>); *Pyropia yezoensis* (NRIFS; [http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/5\\_AG/genomes/nori](http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/5_AG/genomes/nori)); and *Cyanophora paradoxa* (Rutgers University; <http://cyanophora.rutgers.edu/cyanophora>). Finally, we also used the conceptual translation of the transcriptome of *Porphyridium purpureum* downloaded from the NCBI.

The HMM profile of the subgroup QCR1/QCR2/QCRTB2, derived from an orthologous group obtained in the MCL-1.1 run, was used to search for homologous sequences in a combined database of our 68 organisms with HMMER. To select QCR-like sequences, we drew a negative logarithmic plot of HMMER E-values using R (<http://www.R-project.org>) and set the E-value cutoff to  $10^{-107}$ , i.e., just before the first undisputable drop in  $-\log_{10}(E\text{-value})$ . The 178 retained sequences were aligned with MUSCLE [version 3.8.31] (Edgar, 2004), which resulted in a better alignment than Clustal Omega on this particular protein family. We then enriched this alignment with the four partial orthologous sequences from *E. gracilis* and *E. longa* identified by HaMStR.

Before phylogenetic analysis, the latter alignment and the MUSCLE alignment of the MCL-1.1 orthologous group were both filtered to eliminate poorly aligned positions and mostly incomplete sequences using the Bio-MUST-Core software package (D.B., unpublished). Briefly, positions due to insertions in less than 50% of the sequences were discarded. Gblocks 0.91b (Castresana, 2000) was then used with loose parameters to further filter the least reliably aligned positions. Finally, the sequences having more than 90% missing characters with respect to the longest sequence were discarded. The two pre-processed alignments were submitted to phylogenetic inference using PhyML as above, and statistical support was estimated through the analysis of 100 bootstrap pseudo-replicates (Felsenstein, 1985). Tree rooting was done manually in Seaview [version 4.4.2] (Gouy et al., 2010), while ladderisation and taxonomic colouring were automatically conducted using Bio-MUST-Core. Final trees were displayed and arranged in FigTree [version 1.4.0] (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). It is worth mentioning that a similar procedure was used to ensure that apparently Euglenozoa-specific subunits were indeed restricted to the latter group.

All *in silico* analyses were carried out on a desktop workstation running Bio-Linux 6 (<http://nebc.nerc.ac.uk/tools/bio-linux>) (Field et al., 2006).

### 3. Results

#### 3.1. *In silico* analysis of the subunit composition of respiratory-chain complexes in Euglenozoa

Additional, putatively taxon-specific, subunits of respiratory-chain complexes often share two attributes that make them difficult to be reliably identified in the genomes of non-model organisms. First, they are poorly conserved [e.g., NDUFC2/B14.5b, NDUFA7/B14.5a, NDUFA3/B9 (Cardol, 2011; Huynen et al., 2009)], which rules out simple BLAST searches and calls for iterative (e.g., PSI-BLAST) or HMM-based (e.g., HMMER) approaches. Second, they are regularly recruited from large multi-gene families with many paralogous groups, the evolution of which cannot be untangled without broadly sampled phylogenetic trees (Gabaldon and Koonin, 2013; Koski and Golding, 2001). For example, in CI, NDUFA11 is a TIM17/22-like protein, CAG9 is a gamma carbonic anhydrase, NDUFA2 features a mitochondrial ribosomal protein L51/S25/CI-B8 domain, NDUFA1 is an acyl-carrier protein, and NDUFB9 belongs to the LYR protein family while in CIII, QCR1/2 both belong to the peptidase family M16. Consequently, when searching for the orthologues of known additional subunits in a target genome, it may be hard to ensure that a given gene, identified with a weak PSI-BLAST hit, actually corresponds to the reference subunit used as the query for the search, and not to a paralogous gene of the same family, potentially fulfilling a different function in a different cell compartment. In this work, we used a carefully designed phylogenetic pipeline to ensure

maximal specificity when identifying orthologous mitochondrial proteins in five Euglenozoa (*E. gracilis*, *E. longa*, *T. brucei*, *L. major* and *D. papillatum*) and in a heterolobosean outgroup (*N. gruberi*) (Fig. 1). This higher reliability is at the expense of lower sensitivity, which means that we probably failed to identify genuine orthologous genes, some of them previously reported, e.g., in *N. gruberi* (Cardol, 2011). However, we argue our approach is sound in the context of a study aimed at expanding the taxonomic distribution of reportedly taxon-specific subunits.

To this end, we compiled an inventory of 99 subunits constituting the traditional complexes of the respiratory chain in model eukaryotes, using *S. cerevisiae*, *H. sapiens* (both Opisthokonta) and *A. thaliana* (Viridiplantae = green plants) as reference organisms. In addition, we also included the 84 apparently specific subunits described in *T. brucei* and/or *T. cruzi* (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009; Panigrahi et al., 2008; Zikova et al., 2008, 2009) (Supplemental Table 1). In the following, TC and TB notations refer to subunits described in *T. cruzi* and *T. brucei*, respectively. We then collected the complete proteomes of six bacteria (*E. coli* K-12 MG1655, *M. loti* MAFF303099, *R. prowazekii* Rp22, *Nostoc* sp. PCC 7120, *P. marinus* MIT9303, *M. chthonoplastes* sp. PCC 7420) and 15 broadly sampled eukaryotes (*H. sapiens*, *B. taurus*, *S. cerevisiae*, *K. pastoris*, *D. purpureum*, *C. merolae*, *C. reinhardtii*, *V. carteri*, *Micromonas* sp., *A. thaliana*, *P. tricornutum*, *T. thermophila*, *N. gruberi*, *T. brucei* and *L. major*). To this database, we added private 454 genomic contigs and public EST contigs of *E. gracilis*, all translated in the frame that yielded the longest predicted protein fragment (see Materials and methods for details).

In order to confidently cluster orthologous respiratory complex subunits in our complete proteomes, we first carried out an all-vs-all comparison of our database sequences using BLASTP. Application of the OrthoMCL pipeline to the resulting BLAST reports allowed us to generate between 35,800 and 49,522 orthologous groups, by varying the inflation parameter (I) from 1.1 to 1.5. These groups only contained orthologous and in-paralogous genes (due to terminal duplications), with out-paralogous genes (due to ancestral duplications) automatically sorted out into different groups. This unbiased global approach spared us the need to choose 99 specific E-value thresholds for separating orthologues from paralogues in each individual case, as done in more conventional database mining studies. For each of these five MCL runs, we annotated the orthologous groups by comparison with our inventory of reference proteins (again using BLASTP). This revealed that the value of "I" leading to the best delineation of the different subunits was 1.2. Amongst the 605 annotated orthologous groups of the MCL-1.2 run, we carefully selected one group for each subunit, generally the one including both the reference protein(s) and the largest sample of species. These 99 groups were then aligned, cleared of ambiguously aligned positions and of incomplete sequences (because short sequences hinder analyses), and finally used to compute phylogenetic trees (Supplemental Figs. 1 and 2; see also Fig. 3 below). In each of these trees, we identified and analysed the subtree corresponding to the mitochondrial paralogue (by opposition to the plastid paralogue) by its proximity to the two  $\alpha$ -proteobacteria and/or by its inclusion of the reference protein(s). However, as the sequences in our *E. gracilis* database had only been translated in a single frame and were sometimes very short, each mitochondrial subgroup was re-analysed with HaMStR (based on HMM profiles and applying the best-reciprocal hit (BRH) orthology criterion) to find additional orthologous sequences in our *E. gracilis* nucleotide database (using six-frame translation) and in the incomplete public EST databases of the secondarily non-photosynthetic *E. longa* and of the free-living diplomonid *D. papillatum*. Altogether, this allowed us to identify a total of 84 mitochondrial subunits in euglenids (*E. gracilis* and *E. longa*), 8 in *D. papillatum* and 118 in kinetoplastids (*T. brucei* and *L. major*). Note that all the subunits specifically described in trypanosomes were also found in *L. major*. This is why, in the following, we refer to them as "apparently kinetoplastid-specific subunits". Furthermore, 60 subunits were found for the heterolobosean *N. gruberi*, which we selected as outgroup (Fig. 2). Accession numbers and



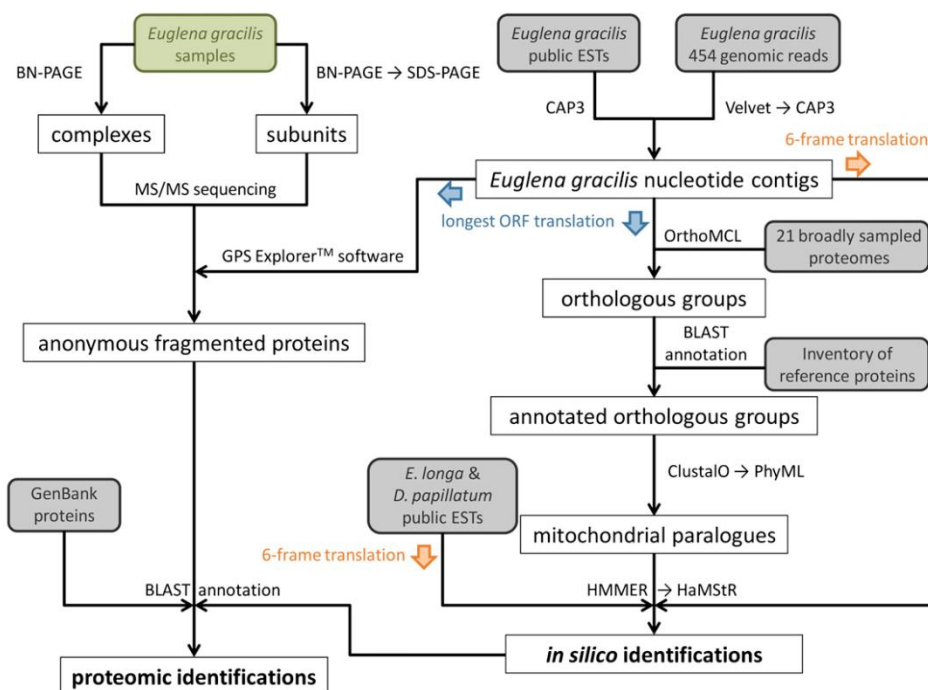


Fig. 1. Scheme of the computational pipeline for *in silico* and proteomic identifications.

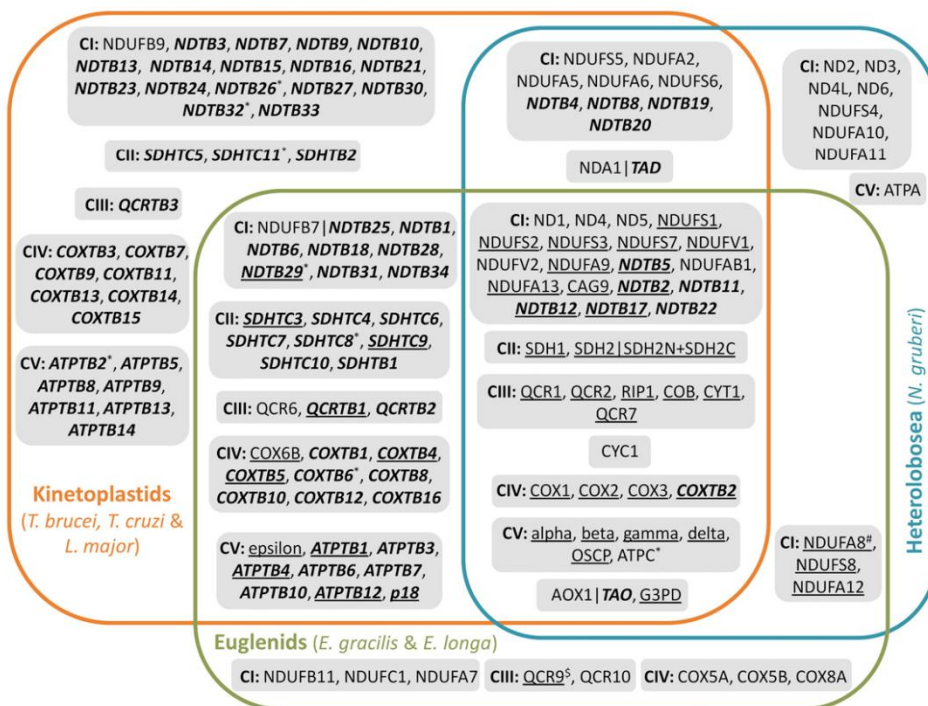


Fig. 2. Subunits of respiratory-chain complexes and proteins of alternative pathways found within euglenids (*E. gracilis* and *E. longa*), kinetoplastids (*T. brucei*, *T. cruzi* and *L. major*) and Heterolobosea (*N. gruberi*). <sup>5</sup>At the exception of *Euglena* *NDUFA8* (see text for details and Fig. 6) and *QCR9*, all proteins were identified by bioinformatic analyses (see Supplemental Files 1 and 5). Underlined proteins were found in *E. gracilis* by proteomic analyses (see Supplemental Table 3 and Supplemental File 8). Proteins marked in bold and italics are specific to Euglenozoa. For each sector of the diagram, the proteins are grouped by respiratory complex. Proteins marked with \* were also found in diplomonids (*D. papillatum*; see Supplemental File 6). <sup>5</sup>*Euglena* *QCR9* protein is not homologous to the canonical *QCR9* subunit found in mammals and fungi (see text for details).

identified sequences in excavate representatives are given in Supplemental Files 1–7.

### 3.1.1. Complex I

We found 19 of the 45 conventional subunits of the eukaryotic CI in *E. gracilis*. The majority of these subunits were either core subunits (ND1/4/5, NDUFS1–3/7/8 and NDUFV1/2) that trace back to the  $\alpha$ -proteobacterial ancestor of the mitochondrion or amongst the additional subunits whose primary structure is the best conserved of CI (NDUFA7/9/12/13, NDUFAB1, NDUFB7/11, NDUFC1, and CAG9). The CAG9 group corresponds to gamma carbonic anhydrases, two of which are present in *E. gracilis* (CAG1/2). Most of these 19 proteins were also identified in *N. gruberi*. Out of the 34 additional CI subunits described in *T. brucei* as potentially kinetoplastid-specific (Acestor et al., 2011; Panigrahi et al., 2008), we found 14 subunits in *E. gracilis* (NDTB1/2/5/6/11/12/17/18/22/25/28/29/31/34) (Fig. 2). Three of these subunits were also identified in *D. papillatum* (NDTB26/29/32) and 10 in *N. gruberi* (NDTB2/4/8/11/12/17–20/22). Finally, we concluded that NDTB25 is actually homologous to a conventional subunit (NDUFB7), that NDTB5 is paralogous to a conventional subunit (NDUFA9), and that NDTB2 and NDTB3 are paralogous to each other.

### 3.1.2. Complex II

CII is typically described as a four-subunit complex in mammal/fungal species. In contrast, *T. cruzi* presents a set of 11 subunits, of which only three are identical to the conventional subunits SDH1 and the two fragments of SDH2 (SDH2N and SDH2C) (Gawryluk and Gray, 2009; Morales et al., 2009). Four of the *T. cruzi*-specific subunits (SDHTC3/6/8/9) and two other additional subunits (SDHTB1/2) have been identified in *T. brucei* (Acestor et al., 2011). Similarly, we found the canonical SDH1 and SDH2 subunits in *E. gracilis* (the latter also split in two parts, SDH2N and SDH2C), as well as eight apparently kinetoplastid-specific subunits (SDHTC3/4/6–10 and SDHTB1) (Fig. 2). In addition, SDHTC8 and SDHTC11 were identified in *D. papillatum*, while only SDH1 and SDH2 were found in *N. gruberi*.

### 3.1.3. Complex III

Amongst the 10 classical CIII subunits, eight were found in *E. gracilis* (QCR1, QCR2, RIP1, COB, CYT1, QCR6, QCR7 and QCR10) and six in *N. gruberi* (QCR1, QCR2, RIP1, COB, CYT1 and QCR7) (Fig. 2). In *T. brucei*, three additional apparently specific subunits (QCRTB1, QCRTB2 and QCRTB3) have been described (Acestor et al., 2011), two of which were found in *E. gracilis* (QCRTB1/2). Interestingly, we noticed that in the MCL-1.1 run, QCRTB2 fell in an orthologous group of M16 peptidases also containing QCR1 and QCR2. Thus, to confirm that QCRTB2 was indeed homologous to QCR1/QCR2, we aligned all the sequences of the MCL group and used the resulting alignment for inferring a phylogenetic tree (Fig. 3A). This tree allowed us to separate the sequences belonging to the subgroup QCR1/QCR2/QCRTB2 from the rest of the M16 peptidase family. To determine the evolutionary relationships between QCR1, QCR2 and QCRTB2, we built a HMM profile of this subgroup and used it to search a larger database enriched of 47 broadly sampled eukaryotic proteomes (in addition to the 21 used above; see Materials and methods for a complete list of organisms). QCR-like sequences matching the HMM profile were then aligned, supplemented with four short sequences of *E. gracilis* and *E. longa* identified by HaMStR, and finally submitted to phylogenetic analysis. From the obtained tree (Fig. 3B), we concluded that QCRTB2 was likely the result of a duplication of the QCR1 gene having taken place in the common ancestor of Euglenozoa.

### 3.1.4. Complex IV

Amongst the 13 mammalian CIV subunits (Kadenbach et al., 1983), we identified seven subunits in *E. gracilis* (COX1–3/5A/5B/6B/8A), and only three in *N. gruberi*, all encoded in the mitochondrial genome (Fig. 2). Amongst the 15 apparently kinetoplastid-specific subunits described in *T. brucei* (Zikova et al., 2008), nine were found in *E. gracilis*

(COXTB1/2/4–6/8/10/12/16), one in the partial database of *D. papillatum* (COXTB6) and one in the complete proteome of *N. gruberi* (COXTB2).

### 3.1.5. ATP synthase

Eukaryotic F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases of mammal, fungal and land plant model organisms (Collinson et al., 1994; Heazlewood et al., 2003; Velours and Arselin, 2000) usually consist of ~20 subunits, seven of which were found in *E. gracilis* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , OSCP, c), one in *D. papillatum* (subunit c) and seven in *N. gruberi* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , OSCP, a, c). Amongst the 15 apparently specific subunits described in *T. brucei* (Zikova et al., 2009), we identified eight subunits in *E. gracilis* (ATPTB1/3/4/6/7/10/12 and p18) and one in *D. papillatum* (ATPTB2) (Fig. 2).

### 3.1.6. Alternative pathways

Alternative pathways described in trypanosomes are similar to the alternative pathways described in other protists, green plants and fungi: an alternative oxidase (AOX or TAO), a type-II NADH dehydrogenase (NDA or TAD) (Acestor et al., 2011; Fang and Beattie, 2002) and a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD), the activity of which compensates for the absence of oxidative phosphorylation during the bloodstream stage (Chaudhuri et al., 2006). Our analyses demonstrated that trypanosomal alternative oxidase and type-II NADH dehydrogenase are homologous to those of the other organisms. While we recovered an AOX and a G3PD in *E. gracilis*, we did not find a NDA (Fig. 2). All three of these enzymes were found in *N. gruberi*.

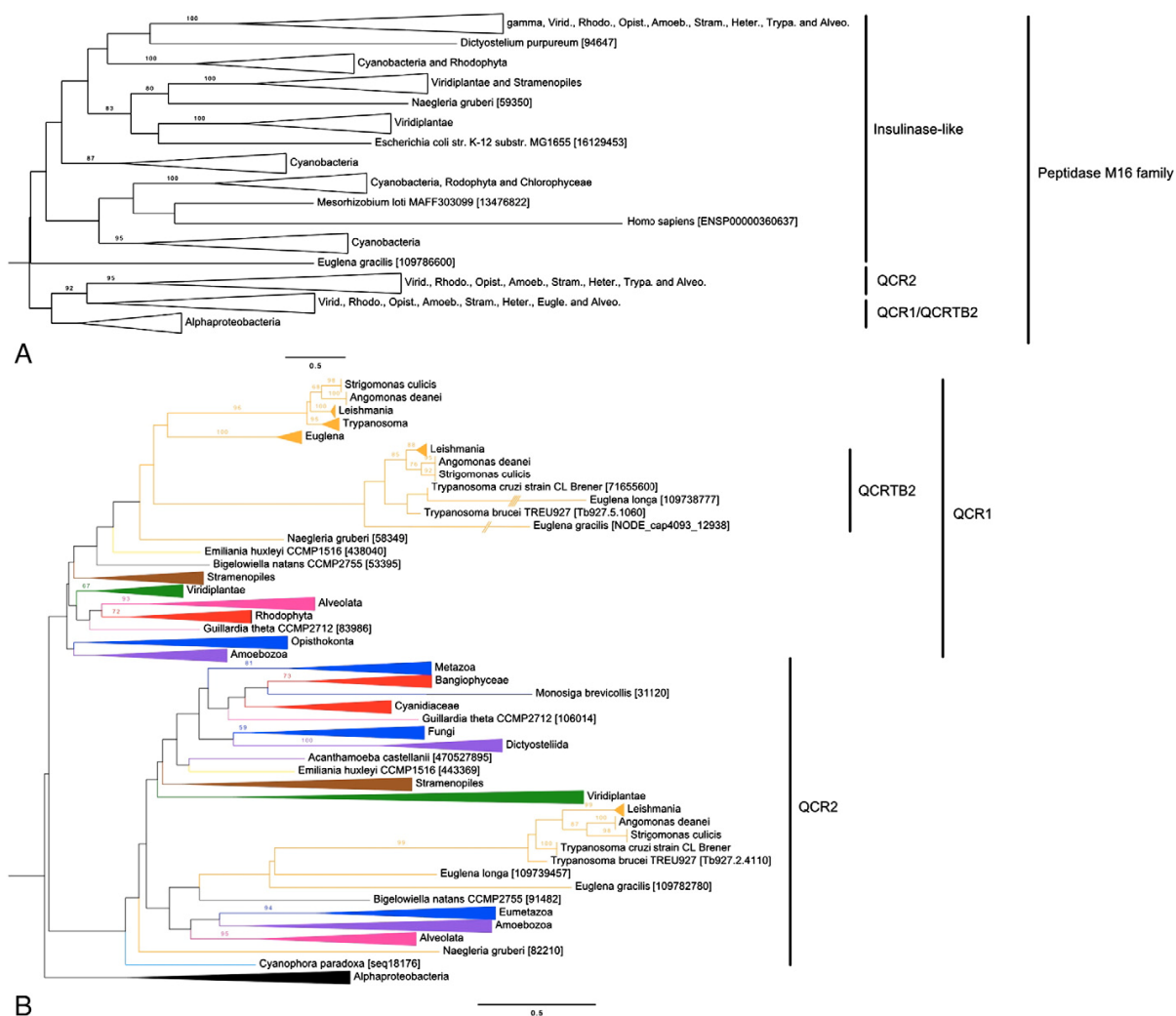
### 3.2. Proteomic analysis of the subunit composition of the respiratory-chain complexes in *E. gracilis*

We sought to robustly validate our *in silico* predictions by determining whether the proteins identified by data mining were *bona-fide* components of the respiratory-chain complexes in *E. gracilis*. To identify growth conditions where *E. gracilis* accumulated more mitochondria and respiratory complexes, we compared various combinations of light intensity (darkness, low light or medium light) and availability of an exogenous carbon source [absence or presence of acetate (17 mM or 60 mM) or ethanol (20 mM or 200 mM)]. For each culture, dark *in vivo* respiratory rates were then estimated (Supplemental Table 2). Oxygen consumption per cell was greater in the presence of high concentrations of acetate or ethanol, independent of light availability. The maximal value (~1.0–1.5  $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-6}$  cells) was in good accordance with a previous report (Buetow, 1961). Lowest respiration rates (~0.1  $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-6}$  cells) were observed in the absence of exogenous carbon sources.

We next tested the effect of increasing concentrations of classical potent respiratory-complex inhibitors on the *in vivo* respiratory rate. Maximal inhibition ( $I_M$ ; percentage of total respiration) and half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{M}$ ) were determined (Supplemental Fig. 3). Rotenone (CI,  $I_M = 61 \pm 8\%$ ;  $IC_{50} = \sim 20 \mu\text{M}$ ), antimycin A (CIII,  $I_M = 71 \pm 7\%$ ;  $IC_{50} < 1 \mu\text{M}$ ), cyanide (CIV,  $I_M = 89 \pm 4\%$ ;  $IC_{50} = \sim 20 \mu\text{M}$ ) and oligomycin (CV,  $I_M = 62 \pm 5\%$ ;  $IC_{50} = \sim 8 \mu\text{M}$ ) inhibited respiration, suggesting that the corresponding complexes might participate in respiration. In contrast, SHAM and myxothiazol, which classically inhibit AOX and alternative CIII, respectively, did not significantly inhibit respiration. Specific enzyme activities were also measured on crude total membrane fractions using the highest inhibitor concentrations tested *in vivo*. These analyses confirmed that rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase (CI,  $24 \pm 6 \text{ nmol NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ), antimycin A-sensitive succinate:cytochrome c oxidoreductase (CII + CIII,  $9 \pm 5 \text{ nmol cyt c min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ), cyanide-sensitive cytochrome c oxidase (CIV,  $58 \pm 12 \text{ nmol cyt c min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ) and oligomycin-sensitive ATP synthase (CV,  $90 \pm 40 \text{ nmol ATP min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ) were all present in *E. gracilis*.

To analyse the composition of respiratory-chain complexes, we solubilised membrane complexes in their native form and separated them by BN-PAGE. The effect of increasing concentrations of two mild



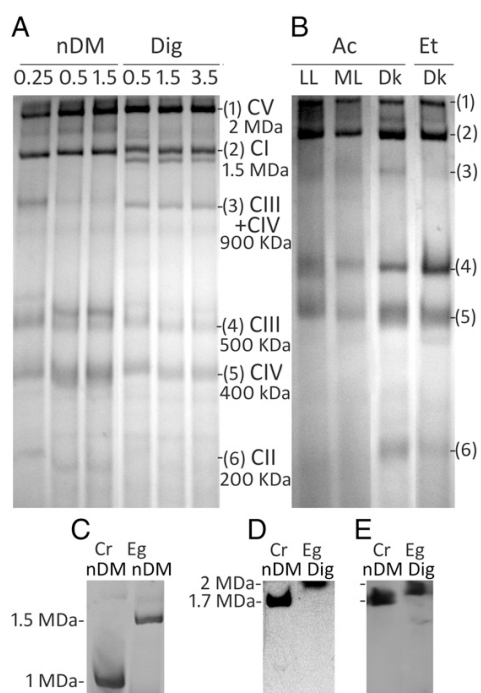


**Fig. 3.** Phylogenetic relationships between QCR1, QCR2 and QCR2B2. A. Maximum-likelihood tree (LG + F +  $\Gamma_4$  model) of the MCL group obtained with  $I = 1.1$  for the QCR1, QCR2 and QCR2B2 reference sequences (169 sequences  $\times$  207 amino acid positions). Gamma:  $\gamma$ -proteobacteria, Virid.: Viridiplantae, Rhodo.: Rhodophyta, Opist.: Opisthokonta, Amoeb.: Amoebozoa, Stram.: Stramenopiles, Heter.: Heterolobosea, Trypa.: Trypanosomatidae, Eugle.: Euglenozoa, and Alveo.: Alveolata. B. Phylogenetic tree showing the paralogy between QCR1, QCR2 and QCR2B2. Black:  $\alpha$ -proteobacteria, green: Viridiplantae, red: Rhodophyta, blue: Opisthokonta, violet: Amoebozoa, brown: Stramenopiles, orange: Excavates, deep pink: Alveolata, yellow: Haptophyceae, grey: Rhizaria, azure: Glaucocystophyceae and pink: Cryptophyta. Branches marked by // and //// were reduced to one half and one quarter of their length, respectively. Bootstrap support values  $\geq 50\%$  are shown above the corresponding nodes.

non-ionic detergents (n-dodecyl maltoside and digitonin) on protein solubilisation was evaluated. For cells grown in the dark in the presence of high concentrations of acetate, six major bands ranging from ~200 kDa to ~2 MDa could be visualised (Fig. 4A). Bands 2 (~1.5 MDa) and 4 (~500 kDa) sometimes appeared as doublets. While band 3 (~900 kDa) was recovered in higher abundance with digitonin, bands 4, 5 (~400 kDa) and 6 (~200 kDa) were more abundant with n-dodecyl maltoside. We then compared the distribution of these bands in mitochondrial extracts of cells cultivated in the growth conditions yielding the highest respiratory rates (i.e., high concentrations of acetate or ethanol in the dark or in the light). However, light + ethanol conditions were avoided since they led to the well-known phenomenon of cell bleaching due to catabolite repression of chloroplast development in *E. gracilis* (Monroy and Schwartzbach, 1984). Bands 1, 2, 4, and 5 were present in every condition, while all six bands were more abundant in extracts of dark-grown cells (Fig. 4B). Further, in-gel staining aimed at

highlighting ATPase and NADH dehydrogenase activities allowed us to hypothesise that band 1 comprised ATP synthase (CV) and band 2, CI (Fig. 4C, D). Immunodetection on western blot with antibodies against the  $\beta$  subunit confirmed the presence of this CV subunit in band 1 (Fig. 4E).

The subunits of each complex separated by BN-PAGE were then tentatively resolved by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. The starting material was a purified mitochondrial fraction from cells grown in the dark in the presence of 200 mM ethanol. As shown in Fig. 5A, at least 18, 22, 8, and 10 protein bands could be visualised for bands 1, 2, 4 and 5, respectively. The same pattern of spots was also obtained for a crude membrane extract of cells grown under low light in the presence of 60 mM acetate (data not shown). The most prominent spots were excised out of the gel and analysed by tandem mass spectrometry (MS/MS). The anonymous fragmented proteins of *E. gracilis* obtained in MS analyses were annotated using BLASTP queries against



**Fig. 4.** Coomassie-Blue stained images of respiratory-chain complexes from *Euglena gracilis* separated by BN-PAGE. A. 100  $\mu$ g of protein from crude membrane fraction of cells grown in the dark in the presence of 60 mM acetate was solubilised by treatment with n-dodecyl-maltoside (nDM) or digitonin (Dig). Detergent concentrations are given in % (w/v) above the lane. B. Crude mitochondrial fraction solubilised by treatment with 1% (w/v) nDM. Ac, 60 mM acetate; Et: 200 mM ethanol; Dk: dark; LL: low light; ML: medium light. The different complexes are identified by coloration and/or mass spectrometry analysis of their constituents. C, D, and E. Proteins from crude membrane fraction of *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr) and *Euglena gracilis* (Eg) cells grown in low light in the presence of 60 mM acetate. 1.5% (w/v) detergent. Upper part of BN gels stained for NADH dehydrogenase activity using NBT as an electron acceptor (C), for ATPase activity (D) or immunoblotted with ATP synthase  $\beta$  subunit antibody (E).

GenBank (nr) and our own protein predictions (Fig. 1). Forty-seven of the 58 analysed protein spots matched a protein in our database and 30 corresponded to an annotated protein in GenBank (Fig. 5A, Supplemental Table 3). In band 1, six of the classical eukaryotic ATP synthase subunits were found ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and OSCP), in addition to four of the subunits described in *T. brucei* (ATPTB1/4/12 and p18). In band 2, we found 5 canonical CI subunits (NDUFS2/3, NDUFV1, NDUFA12/13, and 2 gamma carbonic anhydrases CAG1/2) and 3 subunits described in *T. brucei* CI (NDTB2/12/17). Two additional proteins, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD) and chaperone protein HSP40 (DNAJ), were also identified. Band 4 corresponded to CIII with 4 identified subunits (QCR1/7, RIP1, QCR1B1) and band 5 to CIV with 4 known subunits (COX3/6B, COXTB4/5). Band 6 could unfortunately not be resolved into well-defined spots. A partial subunit pattern (7 bands) of band 3 was obtained from a different experiment (Fig. 5B). Interestingly, this corresponded to a mixture of CIII (500 kDa) and CIV (400 kDa), which are probably associated *in vivo* in a supercomplex (900 kDa).

In a second approach, bands 2–6 from BN-PAGE were directly excised and each band was analysed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC–MS) to identify possible additional subunits (see Supplemental File 8). Additional subunits could be identified for CI (band 2; NDUFS1/7/8, NDUFA8/9 and NDTB5/29), CIII (bands 3 and 4; CYT1, COB, QCR9), CIV (bands 3 and 5; COX1/2, COXTB2) and CII (band 6; SDH1 and SDH2N/C, SDHTC3 and SDHTC9). Surprisingly, the NDUFA8 subunit was found by proteomics but not by *in silico* analysis. This is explained by the observation that the orthologous group that annotated the protein

fragment was composed only of euglenozoan sequences, for which the first BLASTP hit was the NDUFA8 subunit of *Ciona intestinalis*, but with a high (thus not significant) E-value (0.053). In accordance with this observation, a multiple alignment built from reference NDUFA8 sequences (from *A. thaliana*, *H. sapiens* and *C. intestinalis*) showed that the NDUFA8 subunits of Euglenozoa were poorly conserved, while retaining the majority of the characteristic cysteine residues (Fig. 6). As for the NDUFA8 subunit, the QCR9 subunit was only found by proteomics. This protein was previously identified by N-terminal sequencing as a peculiar component of CIII in *E. gracilis* (Cui et al., 1994). We could not identify any similar sequences in other eukaryotes. Thus, we propose that the *Euglena* QCR9 does not exhibit any conserved domain and does not correspond to the canonical QCR9 subunit described in other species.

A summary of the proteins identified in this study is given in Fig. 2.

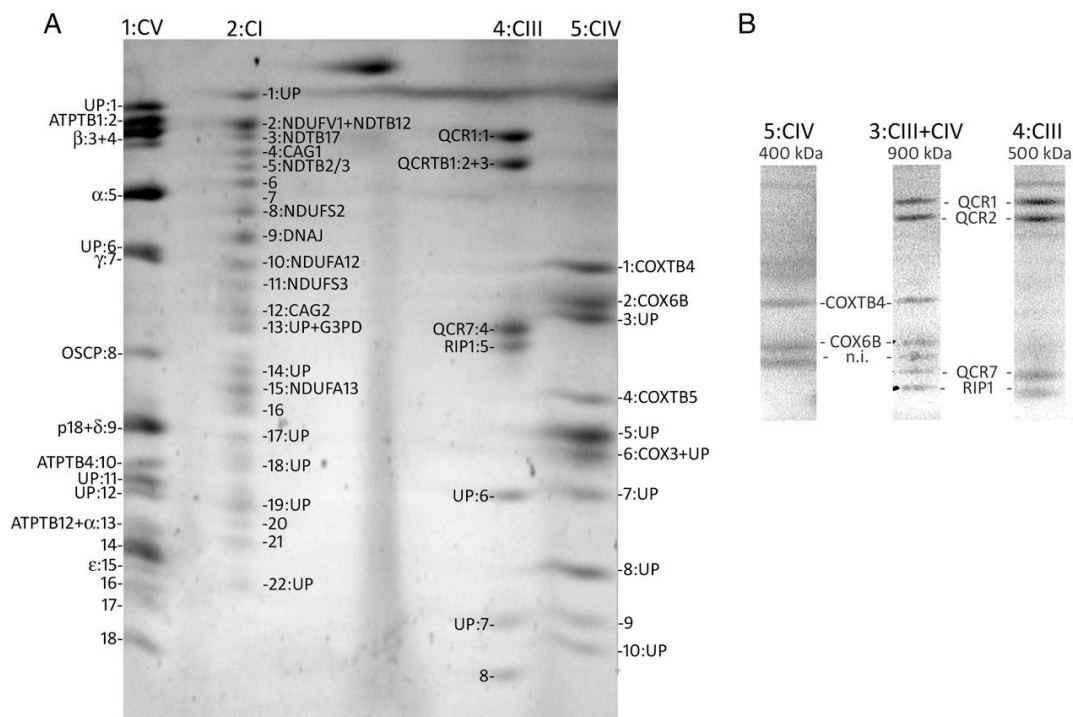
#### 4. Discussion

##### 4.1. Similar subunit composition of respiratory-chain complexes in kinetoplastids and euglenids

Respiratory-chain complexes have a dual genetic origin, most subunits being encoded in the nucleus, while a few subunits of prokaryotic origin remain encoded by the mitochondrial genome (Gabaldon and Huynen, 2005; Saccone et al., 2006). Compared to their prokaryotic counterparts, mitochondrial respiratory-chain complexes have acquired additional subunits, although most of these are not directly involved in the catalytic activity of the enzyme complexes. During the last decade, many studies have highlighted the peculiarities of respiratory-chain complexes in trypanosomes (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009; Panigrahi et al., 2008; Zikova et al., 2008, 2009), in which the majority of the identified subunits are apparently unrelated to those described in green plants, mammals or fungi. Trypanosomes are part of Euglenozoa, a eukaryotic phylum first described three decades ago and grouping kinetoplastids and euglenids (Cavalier-Smith, 1981). At the same time, a secondary symbiotic origin of euglenids chloroplast was proposed (Gibbs, 1981). More recently, Euglenozoa were extended to also include diplomonids (Simpson, 1997). The mitochondrial respiratory chain of *E. gracilis* is well studied (Bronstrup and Hachtel, 1989; Buetow, 1961; Castro-Guerrero et al., 2004, 2005; Moreno-Sánchez et al., 2000; Sharpless and Butow, 1970a,b; Wilson and Danforth, 1958) but the protein composition of its complexes has only been investigated in a couple of studies (Bronstrup and Hachtel, 1989; Cui et al., 1994). In the present work, we addressed this gap by combining a conservative phylogenetic pipeline for *in silico* data mining of complete proteomes with proteomic analyses performed under multiple conditions. It is worth noting that some low molecular mass subunits may probably not be visualised by the Coomassie-Blue staining, and that some hydrophobic subunits may have been lost during the second electrophoresis step. Moreover, such proteins contain only few tryptic cleavage sites, thus generating a limited number of peptides in the mass range suitable for MS analysis. In particular, none of the seven hydrophobic core subunits, which are usually mitochondrially encoded (ND1–6, ND4L), could be detected, and which suggests that despite the multiple and exhaustive analysis presented here that the complete composition of the *E. gracilis* respiratory apparatus remains to be achieved. Nonetheless, at this stage, the respiratory-chain complexes I–V of *E. gracilis* consist of at least 92 different proteins, 79 of which are shared with trypanosomes and 34 of which, according to our analyses, appear to be restricted to Euglenozoa.

From these data, we can draw three main conclusions: (i) the peculiar subunit composition of the respiratory-chain complexes described in trypanosomes originated in the common ancestor that they share with euglenids and, for a few subunits, in the common ancestor of Discoba, since some were also identified in the heterolobosean *N. gruberi*; (ii) these data reinforce the idea that the additional subunits found in trypanosomes are genuine components of respiratory complexes of





**Fig. 5.** Two-dimensional resolution of the mitochondrial protein complexes from *Euglena gracilis*. A. BN gel lane loaded with 500 µg of protein was cut out and placed horizontally for subsequent resolution of the protein complexes into their respective components on Tricine-SDS-PAGE. The main complexes on the first dimension BN-PAGE (Fig. 4A, B) are indicated at the top of the gel. Coomassie Blue-stained image. The numbered spots correspond to polypeptides that were subject to MS/MS analysis. The corresponding sequences are given in Supplemental File 8 and Supplemental Table 3. UP, database match to an unknown protein; n.i., no annotation due to the lack of a significant score in MS analysis. B. Comparison of partial spot pattern of CIII (band 4), CIV (band 5) and supercomplex III + IV (band 3).

these parasites, and; (iii) contrarily to recent suggestions (Panigrahi et al., 2008), the additional subunits shared with euglenids are unlikely to play any specific role in the parasitic lifestyle of trypanosomes. Thus, besides canonical subunits shared by all eukaryotic groups, respiratory complexes I–V in Euglenozoa also possess specific subunits that either have diverged beyond recognition or have been recruited early in the evolution of the lineage. Two scenarios may account for the recruitment of new subunits: (i) acquisition of xenologous genes by lateral gene transfer, either of

bacterial or eukaryotic origin, or (ii) retargeting of cytosolic proteins to the mitochondria, possibly after duplication of the corresponding genes. In both cases, these novel subunits would have assembled to form a new scaffold around the canonical core of respiratory complexes. From our *in silico* analyses, it is not possible to differentiate between these two models, as we generally failed to identify homologues (neither paralogues or orthologues) for Euglenozoa-specific genes, even after thorough HMM searches against the 68-species database built for

<i>Euglena gracilis</i>	71 PNEQTKKEHEGIFGMGIPENVLFSFGHWYRMSQPLEKAREEYLVC	KHNAPKRAAPTECLE	130
<i>Trypanosoma brucei</i>	1 -MDQFTKPLEGIFRDGIPAPVLR	AFAPLYQALPSLQDAVSA	SRDCYY--WRANPKC
<i>Leishmania major</i>	1 -MEQFVQPLEGIFRDGIPAPVLR	AFAPLYQALPSLQERVEAS	SRDCYY--WRANPKC
<i>Ciona intestinalis</i>	35 - - - -GILKDIKRGD	LGVPSHVLKASAFQYAN	- - -ECNEVNKEFML
<i>Homo sapiens</i>	8 - - - -PTLEELKVDEVK	ISSAVLKA	AHHYGA--QCDKPNKEFML
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1 - - - -MSSAVDATGNPI	PTSAVLTASA	KHIGM--RCMPENVAFLK
			* * *
<i>Euglena gracilis</i>	131 EAKNMFNLYLHMSEIPFRT	CPKQSADYTYCVETQ	GHRKPGMDYGARSFTSFVRY
<i>Trypanosoma brucei</i>	57 EDVQTVTSFMOASEAS	FRLCPQOSATLLK	CHMTTEPA-----RALFF
<i>Leishmania major</i>	57 EDIDTVTGFMQACEAS	FRLCPQOSATLLK	CHMTTEPA-----RAVYF
<i>Ciona intestinalis</i>	86 YNIKVSDCAENFR	KMTTACADEIVAFGK	CLERDHK-----RSFVY
<i>Homo sapiens</i>	59 EGKLVNKCALDF	FRQIKRHC	AEPTTEYWT
<i>Arabidopsis thaliana</i>	52 KGRDVTRCVLGLL	KDLHQK	CQKEMDDYVGC
			* * *
<i>Euglena gracilis</i>	191 AFEELGKTYGCKFP	PAHGFQ--YORSA	-----RFTNLP
<i>Trypanosoma brucei</i>	104 EWRTCLMDOTGIR	FWPYANAPIG	-APWSNGGQTE
<i>Leishmania major</i>	104 EWRSCLMDOTGIR	FWPYANAPIG	-APWSNGGQTE
<i>Ciona intestinalis</i>	133 KFDRCMFEKLG	IDKYN	AVELDQTVKTD
<i>Homo sapiens</i>	106 KFDCEVLDKLG	WVRPDL	LGELSKG-----NEFDL
<i>Arabidopsis thaliana</i>	98 AFEKVCPLK	-----	-----

**Fig. 6.** Clustal–Omega alignment between NDUFA8 sequences of *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens* and *Ciona intestinalis* and the potential NDUFA8 sequences of *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* and *Euglena gracilis*. \*: conserved characteristic cysteines of NDUFA8. Alignment formatted with Jalview [version 2.7] (Waterhouse et al., 2009).

studying the evolution of QCR1/QCR2/QCRTB2, as well as against another database of about 400 complete proteomes representative of prokaryotic diversity (data not shown). The exceptions here may be NDTB2/3/4/8/10/11/17/18/22/29, SDHTB2, QCRTB1/2 and COXTB6/16, all of which possess conserved domains (but not full-length architectures) found in other eukaryotic groups. Thus, whatever their ultimate origin, Euglenozoa-specific genes are likely to have undergone extensive evolutionary divergence.

#### 4.2. Peculiar features of respiratory-chain complexes in *E. gracilis*

Our study also highlights some interesting features at the level of individual respiratory-chain complexes in *E. gracilis*.

##### 4.2.1. Complex I

The approximate molecular mass of CI in *E. gracilis* is ~1.5 MDa. In contrast, in all eukaryotes investigated so far, including *T. brucei* (Acestor et al., 2011), the mammal *B. taurus* (Carroll et al., 2006), the yeast *Yarrowia lipolytica* (Angerer et al., 2011), the green alga *C. reinhardtii* (Cardol et al., 2004) and the amoeba *Acanthamoeba castellanii* (Gawryluk et al., 2012), CI has a molecular mass of ~900–1000 kDa. In green plants, mammals and fungi, CI has however been found in association with dimeric CIII and/or CIV, leading to supercomplexes of > 1.5 MDa (Cardol et al., 2008; Dudkina et al., 2005; Schagger and Pfeiffer, 2000). However, in the present study, no evidence for the presence of CIII or CIV subunits could be obtained in the band corresponding to CI in *E. gracilis*. Compared with CI in fungi and mammals, CI in green plants (Cardol et al., 2004; Sunderhaus et al., 2006), amoeba, and presumably other eukaryotes (Gawryluk and Gray, 2010) comprises additional subunits belonging to the  $\gamma$ -carbonic anhydrase (CAG) protein family. Two CAG proteins have also been specifically identified in CI of *E. gracilis*. In green plants, it has been shown that these proteins form a matrix-exposed domain (Sunderhaus et al., 2006), the presence of which does not substantially increase the molecular mass of CI. G3PD and DNAJ enzymes have also been found in association with CI in *E. gracilis*. Interestingly, a DNAJ homologue was recently identified in CI of *T. brucei* (Acestor et al., 2011). DNAJ/HSP40 (heat shock protein 40) primarily stimulates ATPase activity of HSP70 chaperones (Qiu et al., 2006) and these proteins are broadly distributed amongst eukaryotic lineages. Although we cannot completely rule out the possibility that DNAJ/HSP40 and G3PD are non-mitochondrial contaminations of the mitochondrial fraction (see Protein extracts), our study brings evidence of a potential interaction between this cohort of proteins and respiratory CI. We recently proposed that some proteins might use CI as an anchoring point and that these interactions might be rather specific to limited groups or species (Cardol, 2011): acyl carrier protein (NDUFAB1/ACPM) and deoxyribonucleoside kinase-like subunit (NDUFA10/42 kDa) in mammals, galactono-lactone dehydrogenase in land plants (Klodmann et al., 2010), or rhodanese in *Y. lipolytica* (Angerer et al., 2011). Similarly, G3PD and DNAJ could be specifically associated with CI in *E. gracilis*. Thus, the apparent higher molecular mass of *E. gracilis* CI probably does not result from an abnormal molecular mass of the canonical subunits or from association with other respiratory complexes, but might rather be the consequence of interactions with proteins bearing functions that are not directly related to CI activity.

##### 4.2.2. Complex II

CII (succinate dehydrogenase) was found to be more abundant in heterotrophic conditions compared to mixotrophic conditions. This is in good agreement with a previous report (Brown and Preston, 1975). CII usually comprises four subunits (SDH1–4): a flavoprotein (SDH1), an iron-sulphur (Fe-S) protein (SDH2) and two membrane subunits (SDH3/SDH4) providing ligands to heme *b* and a reduction site for ubiquinone. As previously pointed out (Morales et al., 2009), membrane anchor subunits are highly divergent between bacteria, mammals and other eukaryotes, and thus are difficult to identify with standard

BLAST searches (Acestor et al., 2011). Candidates for *T. cruzi* and *T. brucei* SDH3 and SDH4 were proposed based on the presence of quinone/heme-binding motifs, predicted *trans*-membrane domains and similar protein sizes, but a direct comparison with these proteins did not reveal any obvious predicted structural or motif similarity (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009). This further illustrates the difficulty to assess orthology for small hydrophobic membrane proteins [also see Discussion in (Cardol, 2011)]. Additional subunits were also found in trypanosomes (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009), some of them also present in *E. gracilis*. However, recruitment of taxon-specific subunits is not limited to Euglenozoa, since unrelated additional subunits have also been described in *A. thaliana* (Millar et al., 2004).

##### 4.2.3. Complex III

Unlike the four other complexes involved in the electron transfer chain, CIII of trypanosomes has a very small set of additional subunits (QCRTB1, QCRTB2 and QCRTB3), one of which (QCRTB2) is a paralogue of the QCR1 core subunit. In *E. gracilis*, seven of the ten classical CIII subunits were found (QCR1/2/6/7, RIP1, COB, and CYT1), along with two of the three subunits described in trypanosomes (QCRTB1/2). It is tempting to speculate that the switch from antimycin A-sensitive CIII activity to myxothiazol-sensitive CIII activity (the so-called *bc1*-bypass) (Moreno-Sánchez et al., 2000; Sharpless and Butow, 1970b) could be due to the differential expression of core 1 paralogues in *E. gracilis* whose presence would modify the affinity of cytochrome *b* Qo and Qi sites for myxothiazol and antimycin A, respectively.

##### 4.2.4. Complex IV

A preliminary analysis of CIV subunit composition suggested an atypical subunit composition of the enzyme, when compared to mammalian cytochrome *c* oxidase (Bronstrup and Hachtel, 1989). In the present work, the presence of four classical subunits (COX1/2/3/6B) was confirmed, along with at least three subunits described in *T. brucei* (COXTB2/4/5). These additional subunits probably constitute a different scaffold compared to the one described in mammals (Tsukihara et al., 1996); this may explain why *E. gracilis* cytochrome *c* oxidase activity was low with heterologous bovine cytochrome *c*550 and 35-fold higher with the homologous *E. gracilis* cytochrome *c*558 (Bronstrup and Hachtel, 1989). Euglena CIII and CIV were also found to form a supercomplex of ~900 kDa that is stabilised in the presence of the mild non-ionic detergent digitonin. This association of CIII and CIV has been previously described in *S. cerevisiae* and *B. taurus* (Cruciat et al., 2000; Schagger and Pfeiffer, 2000).

##### 4.2.5. Complex V

ATP synthase of *E. gracilis* also exhibited an unusually large molecular mass (>2 MDa). The dimeric nature of ATP synthase is now largely acknowledged in many organisms, and in mammals and yeasts, the dimer has a molecular mass of ~1.2 MDa and is thought also to be responsible for shaping mitochondrial cristae (Davies et al., 2012; Velours and Arselin, 2000; Walker et al., 1991). Beyond mammals, fungi and flowering plants, the first organism where an unusual structure and subunit composition of the mitochondrial ATP synthase was found was the green alga *C. reinhardtii* and its colourless relative *Polytomella* sp. (~1.6–1.7 MDa) (Dudkina et al., 2006; Vazquez-Acevedo et al., 2006). More recently, unusual subunit composition for the ATP synthase was also reported in the ciliate (alveolates) *T. thermophila* (Balabaskaran Nina et al., 2010), and in *T. brucei* (Zikova et al., 2009). In these species, as in *E. gracilis*, only canonical subunits involved in the F<sub>1</sub> catalytic head ( $\alpha$ ,  $\beta$ , OSCP), the rotor (a, c ring) and the central axis ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ) have been found. In contrast, subunits involved in the peripheral stator (b/ATP4, d, e, f, g, etc.) are missing and have been replaced by new sets of subunits that have no counterparts in other lineages. In *E. gracilis*, we identified seven of the 14 new subunits discovered in *T. brucei*, for which no homologues could be identified outside Euglenozoa. This strongly suggests



that, as we earlier proposed in the case of mitochondrial ATP synthase from chlorophycean green algae (see Discussion in Lapaille et al., 2010), the recruitment of new subunits might be concomitant to the loss of mitochondrial genes for ATP synthase proteins (including subunit b/ATP4 gene) in the course of mitochondrial gene relocation into the nucleus.

In conclusion, our study of the mitochondrial respiratory chain in *E. gracilis* provides evidence that the additional subunits of the different complexes described in trypanosomes are not specific to kinetoplastids, but rather are at least shared with other Euglenozoa. Consequently, their presence cannot be explained by the parasitic lifestyle of Trypanosomatidae, as many Euglenozoa are non-parasitic (e.g. photosynthetic euglenids and free-living diplomonads). However, since many of these subunits are not found beyond Euglenozoa (or Discoba), these differences may explain the biochemical peculiarities observed for the respiratory-chain complexes of kinetoplastids and euglenids.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.02.001>.

**Acknowledgements**

We thank M. Radoux and G. Gain for their technical help. This work was supported by the University of Liège (SFRD-11/05 to P.C. and SFRD-12/04 to D.B.), the Fonds National de la Recherche Scientifique (an Incentive Grant for Scientific Research MIS F.4520; FRFC 2.4597.11; FRFC 2.4567.11; CDR J.0138.13) and the FRS-FNRS/CONACyT B330/123/11 (Belgium–Mexico). E.P. is supported by the Belgian FRIA FRS-FNRS. P.C. is a research associate of FRS-FNRS.

**References**

Acestor, N., Zikova, A., Dalley, R.A., Anupama, A., Panigrahi, A.K., Stuart, K.D., 2011. *Trypanosoma brucei* mitochondrial respiratorome: composition and organization in procyclic form. *Mol. Cell. Proteomics* 10 (M110), 006908.

Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, R.S., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493.

Angerer, H., Zwicker, K., Wumaier, Z., Sokolova, L., Heide, H., Steger, M., Kaiser, S., Nubel, E., Brutschy, B., Radermacher, M., Brandt, U., Zickermann, V., 2011. A scaffold of accessory subunits links the peripheral arm and the distal proton-pumping module of mitochondrial complex I. *Biochem. J.* 437, 279–288.

Balabaskaran Nina, P., Dudkina, N.V., Kane, L.A., van Eyk, J.E., Boekema, E.J., Mather, M.W., Vaidya, A.B., 2010. Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS Biol.* 8, e1000418.

Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36–D42.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Bronstrup, U., Hachtel, W., 1989. Cytochrome c oxidase of *Euglena gracilis*: purification, characterization, and identification of mitochondrially synthesized subunits. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21, 359–373.

Brown, G.E., Preston, J.F., 1975. Changes in mitochondrial density and succinic dehydrogenase activity in *Euglena gracilis* as a function of the dependency on light for growth. *Arch. Microbiol.* 104, 233–236.

Buetow, D.E., 1961. Ethanol stimulation of oxidative metabolism in *Euglena gracilis*. *Nature* 190, 1196–1196.

Burger, G., Gray, M.W., Forget, L., Lang, B.F., 2013. Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout Jakobid protists. *Genome Biol. Evol.* 5, 418–438.

Cardol, P., 2011. Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in eukaryotes: a highly conserved subunit composition highlighted by mining of protein databases. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 1390–1397.

Cardol, P., Matagne, R.F., Remacle, C., 2002. Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J. Mol. Biol.* 319, 1211–1221.

Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R.F., Remacle, C., 2004. Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 212–224.

Cardol, P., Boutaffala, L., Memmi, S., Devreese, B., Matagne, R.F., Remacle, C., 2008. In *Chlamydomonas*, the loss of ND5 subunit prevents the assembly of whole mitochondrial complex I and leads to the formation of a low abundant 700 kDa subcomplex. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 388–396.

Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E., 2006. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J. Biol. Chem.* 281, 32724–32727.

Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552.

Castro-Guerrero, N.A., Krab, K., Moreno-Sánchez, R., 2004. The alternative respiratory pathway of *Euglena* mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 459–469.

Castro-Guerrero, N.A., Jasso-Chavez, R., Moreno-Sánchez, R., 2005. Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1710, 113–121.

Cavalier-Smith, T., 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14, 461–481.

Chaudhuri, M., Ott, R.D., Hill, G.C., 2006. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* 22, 484–491.

Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E., Walker, J.E., 1994. Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry* 33, 7971–7978.

Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., Stuart, R.A., 2000. The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275, 18093–18098.

Cui, J.Y., Mukai, K., Saeki, K., Matsubara, H., 1994. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding subunits I, II, and IX of *Euglena gracilis* mitochondrial complex III. *J. Biochem.* 115, 98–107.

Davies, K.M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J.D., Kuhlbrandt, W., 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13602–13607.

Duby, F., Matagne, R.F., 1999. Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking cob, nd4, and the 3' end of nd5. *Plant Cell* 11, 115–125.

Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., Braun, H.P., 2005. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3225–3229.

Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Braun, H.P., Boekema, E.J., 2006. Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* 580, 3427–3432.

Dyall, S.D., Brown, M.T., Johnson, P.J., 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304, 253–257.

Ebersberger, I., Strauss, S., von Haeseler, A., 2009. HaMStR: profile hidden Markov model based search for orthologs in ESTs. *BMC Evol. Biol.* 9, 157.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.

Fang, J., Beattie, D.S., 2002. Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: isolation and characterization. *Biochemistry* 41, 3065–3072.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 783–791.

Field, D., Tiwari, B., Booth, T., Houten, S., Swan, D., Bertrand, N., Thurston, M., 2006. Open software for biologists: from famine to feast. *Nat. Biotechnol.* 24, 801–803.

Fischer, S., Brunk, B.P., Chen, F., Gao, X., Harb, O.S., Iodice, J.B., Shanmugam, D., Roos, D.S., Stoeckert Jr., C.J., 2011. Using OrthoMCL to assign proteins to OrthoMCL-DB groups or to cluster proteomes into new ortholog groups. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 12, 11–19 (Chapter 6, Unit 6).

Gabaldon, T., Huynen, M.A., 2005. Lineage-specific gene loss following mitochondrial endosymbiosis and its potential for function prediction in eukaryotes. *Bioinformatics* 21 (Suppl. 2), iii44–iii50.

Gabaldon, T., Koonin, E.V., 2013. Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nat. Rev. Genet.* 14, 360–366.

Gawryluk, R.M., Gray, M.W., 2009. A split and rearranged nuclear gene encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial succinate dehydrogenase in Euglenozoa. *BMC Res. Notes* 2, 16.

Gawryluk, R.M., Gray, M.W., 2010. Evidence for an early evolutionary emergence of gamma-type carbonic anhydrases as components of mitochondrial respiratory complex I. *BMC Evol. Biol.* 10, 176.

Gawryluk, R.M., Chisholm, K.A., Pinto, D.M., Gray, M.W., 2012. Composition of the mitochondrial electron transport chain in *Acanthamoeba castellanii*: structural and evolutionary insights. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 2027–2037.

Gibbs, S.P., 1981. The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 361, 193–208.

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.

Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F., 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476–1481.

Gray, M.W., Lang, B.F., Burger, G., 2004. Mitochondria of protists. *Annu. Rev. Genet.* 38, 477–524.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.

Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G., Roger, A.J., 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3859–3864.

Harris, E.H., 1989. *The Chlamydomonas* Sourcebook. Academic Press, San Diego.

Heazlewood, J.L., Whelan, J., Millar, A.H., 2003. The products of the mitochondrial orf25 and orfB genes are FO components in the plant F1FO ATP synthase. *FEBS Lett.* 540, 201–205.

Huang, X., Madan, A., 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9, 868–877.

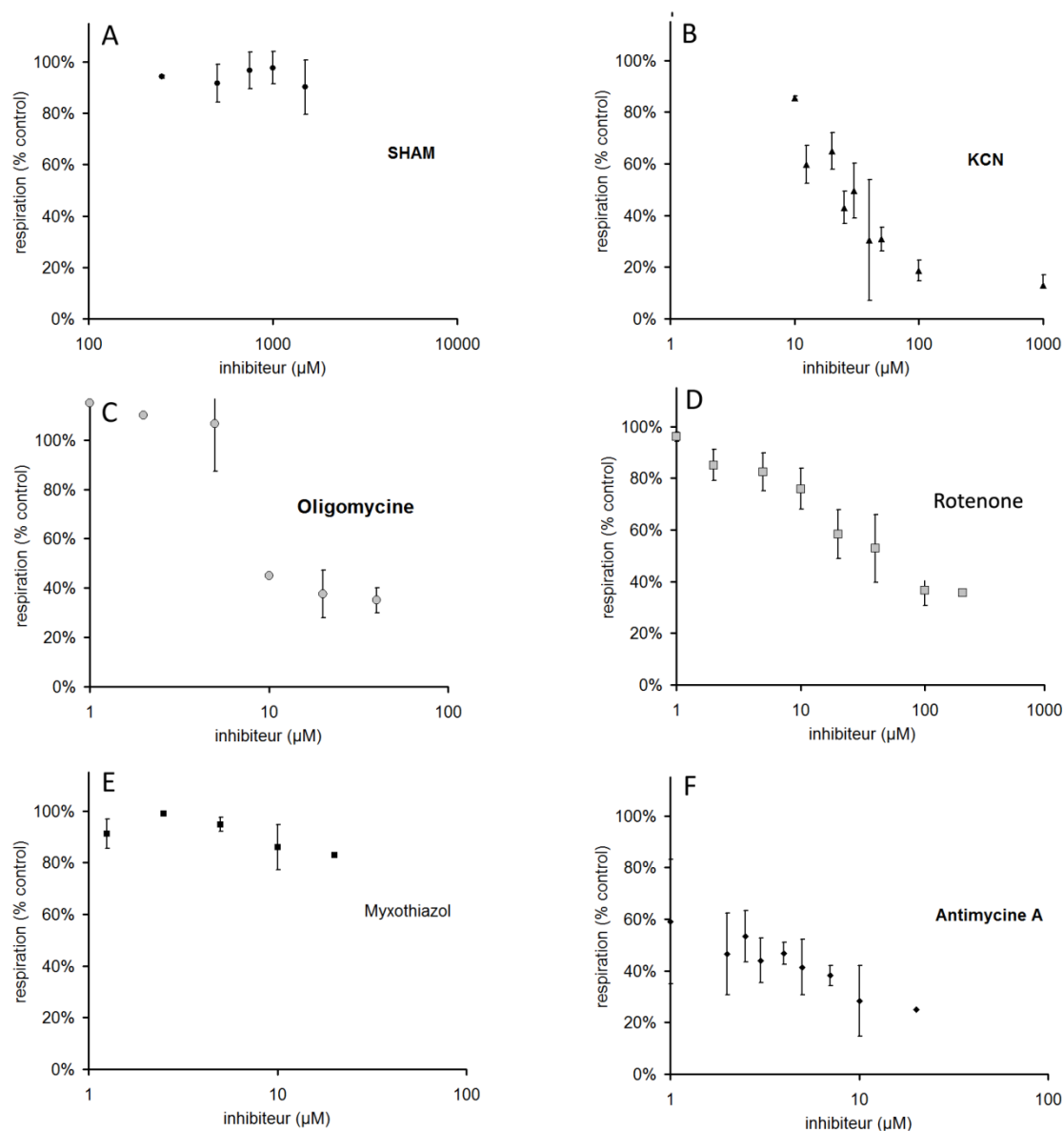
Huynen, M.A., de Hollander, M., Szklarczyk, R., 2009. Mitochondrial proteome evolution and genetic disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 1122–1129.

- Kadenbach, B., Jarausch, J., Hartmann, R., Merle, P., 1983. Separation of mammalian cytochrome *c* oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal. Biochem.* 129, 517–521.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nitz, M., Jansch, L., Braun, H.P., 2010. Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22, 797–810.
- Koski, L.B., Golding, G.B., 2001. The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. *J. Mol. Evol.* 52, 540–542.
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Gray, M.W., 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387, 493–497.
- Lapaille, M., Escobar-Ramirez, A., Degand, H., Baurain, D., Rodriguez-Salinas, E., Coosemans, N., Boutry, M., Gonzalez-Halphen, D., Remacle, C., Cardol, P., 2010. Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme. *Mol. Biol. Evol.* 27, 1630–1644.
- Le, S.Q., Gascuel, O., 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320.
- Li, L., Stoekert Jr., C.J., Roos, D.S., 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 13, 2178–2189.
- Martin, W., Muller, M., 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392, 37–41.
- Mego, J.L., Farb, R.M., 1974. Alcohol dehydrogenases of *Euglena gracilis*, strain Z. *Biochim. Biophys. Acta* 350, 237–239.
- Michalecka, A.M., Svensson, A.S., Johansson, F.I., Agius, S.C., Johanson, U., Brennicke, A., Binder, S., Rasmusson, A.G., 2003. *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)<sup>+</sup>H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol.* 133, 642–652.
- Millar, A.H., Eubel, H., Jansch, L., Kruff, V., Heazlewood, J.L., Braun, H.P., 2004. Mitochondrial cytochrome *c* oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Mol. Biol.* 56, 77–90.
- Monroy, A.F., Schwartzbach, S.D., 1984. Catabolite repression of chloroplast development in *Euglena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2786–2790.
- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Omura, S., Kita, K., 2009. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric I<sub>p</sub> subunit. *J. Biol. Chem.* 284, 7255–7263.
- Moreno-Sánchez, R., Raya, J.C., 1987. Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication. *Plant Sci.* 48, 151–157.
- Moreno-Sánchez, R., Covan, R., Jasso-Chavez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Pacheco-Moises, F., Torres-Marquez, M.E., 2000. Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta* 1457, 200–210.
- Panigrahi, A.K., Zikova, A., Dalley, R.A., Acestor, N., Ogata, Y., Anupama, A., Myler, P.J., Stuart, K.D., 2008. Mitochondrial complexes in *Trypanosoma brucei*: a novel complex and a unique oxidoreductase complex. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 534–545.
- Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A., Racker, E., 1960. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 235, 3322–3329.
- Qiu, X.B., Shao, Y.M., Miao, S., Wang, L., 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2560–2570.
- Remacle, C., Baurain, D., Cardol, P., Matagne, R.F., 2001. Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I: characterization of two mutations affecting the nd1 coding sequence. *Genetics* 158, 1051–1060.
- Saccone, C., Lanave, C., De Grassi, A., 2006. Metazoan OXPHOS gene families: evolutionary forces at the level of mitochondrial and nuclear genomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1171–1178.
- Schagger, H., Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783.
- Schagger, H., von Jagow, G., 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223–231.
- Sharpless, T.K., Butow, R.A., 1970a. An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245, 58–70.
- Sharpless, T.K., Butow, R.A., 1970b. Phosphorylation sites, cytochrome complement, and alternate pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245, 50–57.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Simpson, A.G.B., 1997. The identity and composition of the Euglenozoa. *Arch. Protistenkd.* 148, 10.
- Stajich, J.E., Block, D., Boulez, K., Brenner, S.E., Chervitz, S.A., Dagdigian, C., Fuellen, G., Gilbert, J.G., Korf, I., Lapp, H., Lehvaslaiho, H., Matsalla, C., Mungall, C.J., Osborne, B.I., Pocock, M.R., Schattner, P., Senger, M., Stein, L.D., Stupka, E., Wilkinson, M.D., Birney, E., 2002. The BioPerl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome Res.* 12, 1611–1618.
- Sunderhaus, S., Dudkina, N.V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta, E., Boekema, E.J., Braun, H.P., 2006. Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *J. Biol. Chem.* 281, 6482–6488.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136–1144.
- Turmel, M., Gagnon, M.C., O'Kelly, C.J., Otis, C., Lemieux, C., 2009. The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol. Biol. Evol.* 26, 631–648.
- Van Aken, O., Giraud, E., Clifton, R., Whelan, J., 2009. Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Physiol. Plant.* 137, 354–361.
- Vazquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C., Gonzalez-Halphen, D., 2006. The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 271–282.
- Velours, J., Arselin, G., 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 383–390.
- Villavicencio-Queijeiro, A., Vazquez-Acevedo, M., Cano-Estrada, A., Zarco-Zavala, M., Tuena de Gomez, M., Mignaco, J.A., Freire, M.M., Scofano, H.M., Foguel, D., Cardol, P., Remacle, C., Gonzalez-Halphen, D., 2009. The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 1–13.
- Walker, J.E., Lutter, R., Dupuis, A., Runswick, M.J., 1991. Identification of the subunits of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 30, 5369–5378.
- Walker, G., Dorrell, R.G., Schlacht, A., Dacks, J.B., 2011. Eukaryotic systematics: a user's guide for cell biologists and parasitologists. *Parasitology* 138, 1638–1663.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191.
- Wilson, B.W., Danforth, W.F., 1958. The extent of acetate and ethanol oxidation by *Euglena gracilis*. *J. Gen. Microbiol.* 18, 535–542.
- Yang, Z., 1993. Maximum-likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites. *Mol. Biol. Evol.* 10, 1396–1401.
- Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829.
- Zhao, S., Burki, F., Brate, J., Keeling, P.J., Klaveness, D., Shalchian-Tabrizi, K., 2012. Collodictyon—an ancient lineage in the tree of eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1557–1568.
- Zikova, A., Panigrahi, A.K., Uboldi, A.D., Dalley, R.A., Handman, E., Stuart, K.D., 2008. Structural and functional association of *Trypanosoma brucei* MIX protein with cytochrome *c* oxidase complex. *Eukaryot. Cell* 7, 1994–2003.
- Zikova, A., Schnauffer, A., Dalley, R.A., Panigrahi, A.K., Stuart, K.D., 2009. The F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* 5, e1000436.

## FIGURES SUPPLEMENTAIRES

Respiration ( $\mu\text{moles O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-6}$ cells)		Light		
		DK	LL	ML
Carbon source	none	n.d.	$0.1 \pm 0.03$	$0.1 \pm 0.03$
	Ac17	$0.55 \pm 0.31$	$0.48 \pm 0.23$	$0.36 \pm 0.15$
	Ac60	$1.3 \pm 0.3$	$1.2 \pm 0.2$	n.d.
	Et20	$0.44 \pm 0.25$	$0.43 \pm 0.16$	$0.72 \pm 0.25$
	Et200	$1.1 \pm 0.54$	$0.63 \pm 0.2$	$1.4 \pm 0.28$

**Supplemental table 2 : Dark O<sub>2</sub> consumption by *Euglena gracilis*.** Measurements were reproduced from 2 to 20 times. Ac17; acetate 17 mM; Ac60, acetate 60 mM ; Et20, ethanol 20 mM ; Et200, ethanol 200 mM ; DK, dark ; LL, low light ; ML, medium light



**Supplemental Figure 3 : Sensitivity of oxygen consumption in the dark to classical potent inhibitors of mitochondrial respiration.** Measurements were performed in the presence of salicylhydroxamic acid or SHAM (A), potassium cyanide (B), oligomycin (C), rotenone (D), myxothiazol (E) or antimycin A (F). All measurements were performed in triplicate and data are presented in mean  $\pm$  SD.

Pour les autres figures supplémentaires :  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567724914000154>



## CHAPITRE 3

Analyses protéomique et  
transcriptomique préliminaires du  
métabolisme énergétique chez  
*Euglena gracilis*.



## DISCUSSION GENERALE



# BIBLIOGRAPHIE



## BIBLIOGRAPHIE

1. Darwin, C., *On the origin of species by means of natural selection, or the Preservation of favoured races in the struggle for life*. 1859.
2. Fitch, W.M. and E. Margoliash, *Construction of phylogenetic trees*. Science, 1967. **155**(3760): p. 279-84.
3. Woese, C.R., O. Kandler, and M.L. Wheelis, *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4576-9.
4. Adl, S.M., et al., *The revised classification of eukaryotes*. J Eukaryot Microbiol, 2012. **59**(5): p. 429-93.
5. Walker, G., et al., *Eukaryotic systematics: a user's guide for cell biologists and parasitologists*. Parasitology, 2011. **138**(13): p. 1638-63.
6. Simpson, A.G., Y. Inagaki, and A.J. Roger, *Comprehensive multigene phylogenies of excavate protists reveal the evolutionary positions of "primitive" eukaryotes*. Mol Biol Evol, 2006. **23**(3): p. 615-25.
7. Hampl, V., et al., *Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups"*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3859-64.
8. Muller, M., et al., *Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012. **76**(2): p. 444-95.
9. Lang, B.F., et al., *An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature*. Nature, 1997. **387**(6632): p. 493-7.
10. Gray, M.W., B.F. Lang, and G. Burger, *Mitochondria of protists*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 477-524.
11. Burger, G., et al., *Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists*. Genome Biol Evol, 2013. **5**(2): p. 418-38.
12. Ogbadoyi, E.O., D.R. Robinson, and K. Gull, *A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(5): p. 1769-79.
13. Souza, W.d., *Structures and Organelles in Pathogenic Protists*. Microbiology Monographs, ed. A. Steinbüchel. Vol. 17. 2010: Springer.
14. Liu, B., et al., *Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA*. Trends Parasitol, 2005. **21**(8): p. 363-9.
15. Lukes, J., B.S. Leander, and P.J. Keeling, *Cascades of convergent evolution: the corresponding evolutionary histories of euglenozoans and dinoflagellates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106 Suppl 1**: p. 9963-70.
16. Flegontov, P., et al., *Gene fragmentation: a key to mitochondrial genome evolution in Euglenozoa?* Curr Genet, 2011. **57**(4): p. 225-32.
17. Moreira, S., S. Breton, and G. Burger, *Unscrambling genetic information at the RNA level*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. **2**: p. 16.
18. Kiethega, G.N., et al., *RNA-level unscrambling of fragmented genes in Diplonema mitochondria*. RNA Biol, 2013. **10**(2): p. 301-13.
19. Spencer, D.F. and M.W. Gray, *Ribosomal RNA genes in Euglena gracilis mitochondrial DNA: fragmented genes in a seemingly fragmented genome*. Mol Genet Genomics, 2011. **285**(1): p. 19-31.
20. Martin, W.a.K., K., *Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche'*. European Journal of Phycology, 1999. **34**: p. 9.
21. Wallin, I.E., *Symbiogenesis and the origin of species*. London, UK: Bailliere, Tindall and Cox, 1927.

22. Margulis, L., *Evolutionary criteria in thallophytes: a radical alternative*. Science, 1968. **161**(3845): p. 1020-2.
23. Glockner, G., A. Rosenthal, and K. Valentin, *The structure and gene repertoire of an ancient red algal plastid genome*. J Mol Evol, 2000. **51**(4): p. 382-90.
24. Bogorad, L., *Evolution of organelles and eukaryotic genomes*. Science, 1975. **188**(4191): p. 891-8.
25. Cavalier-Smith, T., *The origin of nuclei and of eukaryotic cells*. Nature, 1975. **256**: p. 6.
26. Giovannoni, S.J., et al., *Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts*. J Bacteriol, 1988. **170**(8): p. 3584-92.
27. Yang, D., et al., *Mitochondrial origins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(13): p. 4443-7.
28. Kleine, T., U.G. Maier, and D. Leister, *DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis*. Annu Rev Plant Biol, 2009. **60**: p. 115-38.
29. Gabaldon, T. and M.A. Huynen, *Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism*. Science, 2003. **301**(5633): p. 609.
30. Allen, J.F., *The function of genomes in bioenergetic organelles*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003. **358**(1429): p. 19-37; discussion 37-8.
31. Dyall, S.D., M.T. Brown, and P.J. Johnson, *Ancient invasions: from endosymbionts to organelles*. Science, 2004. **304**(5668): p. 253-7.
32. Martin, W. and M. Muller, *The hydrogen hypothesis for the first eukaryote*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 37-41.
33. Gupta, R.S. and G.B. Golding, *The origin of the eukaryotic cell*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(5): p. 166-71.
34. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *Mitochondrial evolution*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1476-81.
35. Zimorski, V., et al., *Endosymbiotic theory for organelle origins*. Curr Opin Microbiol, 2014. **22C**: p. 38-48.
36. Lake, J.A., et al., *Eocytes: a new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(12): p. 3786-90.
37. Rivera, M.C. and J.A. Lake, *The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes*. Nature, 2004. **431**(7005): p. 152-5.
38. Williams, T.A. and T.M. Embley, *Archaeal "dark matter" and the origin of eukaryotes*. Genome Biol Evol, 2014. **6**(3): p. 474-81.
39. Williams, T.A., et al., *An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life*. Nature, 2013. **504**(7479): p. 231-6.
40. Cavalier-Smith, T., *The origin of eukaryotic and archaeobacterial cells*. Ann N Y Acad Sci, 1987. **503**: p. 17-54.
41. Sogin, M.L., *Early evolution and the origin of eukaryotes*. Curr Opin Genet Dev, 1991. **1**(4): p. 457-63.
42. Tucci, S., et al., *Variability of wax ester fermentation in natural and bleached Euglena gracilis Strains in response to oxygen and the elongase inhibitor flufenacet*. J Eukaryot Microbiol, 2010. **57**(1): p. 63-9.
43. Boxma, B., et al., *An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 74-9.
44. Lindmark, D.G. and M. Muller, *Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate Trichomonas foetus, and its role in pyruvate metabolism*. J Biol Chem, 1973. **248**(22): p. 7724-8.
45. Bui, E.T., P.J. Bradley, and P.J. Johnson, *A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9651-6.
46. Embley, T.M. and W. Martin, *Eukaryotic evolution, changes and challenges*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 623-30.
47. Gibbs, S.P., *The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae*. Ann N Y Acad Sci, 1981. **361**: p. 193-208.



48. Ishida, K., et al., *The origin of chlorarachniophyte plastids, as inferred from phylogenetic comparisons of amino acid sequences of EF-Tu*. J Mol Evol, 1997. **45**(6): p. 682-7.
49. Felsner, G., et al., *ERAD components in organisms with complex red plastids suggest recruitment of a preexisting protein transport pathway for the periplastid membrane*. Genome Biol Evol, 2011. **3**: p. 140-50.
50. Baurain, D., et al., *Phylogenomic evidence for separate acquisition of plastids in cryptophytes, haptophytes, and stramenopiles*. Mol Biol Evol, 2010. **27**(7): p. 1698-709.
51. Petersen, J., et al., *Chromera velia, endosymbioses and the rhodoplex hypothesis--plastid evolution in cryptophytes, alveolates, stramenopiles, and haptophytes (CASH lineages)*. Genome Biol Evol, 2014. **6**(3): p. 666-84.
52. Cavalier-Smith, T., *Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree*. J Eukaryot Microbiol, 1999. **46**(4): p. 347-66.
53. Cavalier-Smith, T., *Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae)*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003. **358**(1429): p. 109-33; discussion 133-4.
54. Turmel, M., et al., *The chloroplast genomes of the green algae Pyramimonas, Monomastix, and Pycnococcus shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids*. Mol Biol Evol, 2009. **26**(3): p. 631-48.
55. Yamaguchi, A., N. Yubuki, and B.S. Leander, *Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of Rapaza viridis n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida)*. BMC Evol Biol, 2012. **12**: p. 29.
56. Plancke, C., et al., *Lack of isocitrate lyase in Chlamydomonas leads to changes in carbon metabolism and in the response to oxidative stress under mixotrophic growth*. Plant J, 2014. **77**(3): p. 404-17.
57. Krebs, H.A. and W.A. Johnson, *Acetopyruvic acid (alphagamma-diketovaleric acid) as an intermediate metabolite in animal tissues*. Biochem J, 1937. **31**(5): p. 772-9.
58. Krebs, H.A. and W.A. Johnson, *Metabolism of ketonic acids in animal tissues*. Biochem J, 1937. **31**(4): p. 645-60.
59. Akram, M., *Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism*. Cell Biochem Biophys, 2014. **68**(3): p. 475-8.
60. Kornberg, H.L. and H.A. Krebs, *Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle*. Nature, 1957. **179**(4568): p. 988-91.
61. Beevers, H., *The role of the glyoxylate cycle.*, in *The Biochemistry of Plants*, P.K. Stumpf, ed., Editor. 1980. p. 117-130.
62. Rasmusson, A.G., et al., *Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1364**(2): p. 101-11.
63. Vega, R.B., J.L. Horton, and D.P. Kelly, *Maintaining Ancient Organelles: Mitochondrial Biogenesis and Maturation*. Circ Res, 2015. **116**(11): p. 1820-1834.
64. Cardol, P., et al., *The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of Chlamydomonas reinhardtii deduced from the Genome Sequencing Project*. Plant Physiol, 2005. **137**(2): p. 447-59.
65. Radermacher, M., et al., *The three-dimensional structure of complex I from Yarrowia lipolytica: a highly dynamic enzyme*. J Struct Biol, 2006. **154**(3): p. 269-79.
66. Hunte, C., V. Zickermann, and U. Brandt, *Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I*. Science, 2010. **329**(5990): p. 448-51.
67. Zickermann, V., et al., *Structural biology. Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I*. Science, 2015. **347**(6217): p. 44-9.
68. Carroll, J., et al., *Bovine complex I is a complex of 45 different subunits*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32724-7.
69. Marques, I., et al., *Composition of complex I from Neurospora crassa and disruption of two "accessory" subunits*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1707**(2-3): p. 211-20.

70. Abdrakhmanova, A., et al., *Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast Yarrowia lipolytica*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1658**(1-2): p. 148-56.
71. Angerer, H., et al., *A scaffold of accessory subunits links the peripheral arm and the distal proton-pumping module of mitochondrial complex I*. Biochem J, 2011. **437**(2): p. 279-88.
72. Bridges, H.R., I.M. Fearnley, and J. Hirst, *The subunit composition of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from Pichia pastoris*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(10): p. 2318-26.
73. Klodmann, J., et al., *Internal architecture of mitochondrial complex I from Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 2010. **22**(3): p. 797-810.
74. Cardol, P., et al., *Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from Chlamydomonas reinhardtii: 31 conserved components among eukaryotes*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1658**(3): p. 212-24.
75. Acestor, N., et al., *Trypanosoma brucei mitochondrial respiratome: composition and organization in procyclic form*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(9): p. M110 006908.
76. Panigrahi, A.K., et al., *Mitochondrial complexes in Trypanosoma brucei: a novel complex and a unique oxidoreductase complex*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(3): p. 534-45.
77. Dupuis, A., et al., *The complex I from Rhodobacter capsulatus*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1364**(2): p. 147-65.
78. Gabaldon, T., D. Rainey, and M.A. Huynen, *Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I)*. J Mol Biol, 2005. **348**(4): p. 857-70.
79. Cardol, P., *Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in eukaryotes: a highly conserved subunit composition highlighted by mining of protein databases*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(11): p. 1390-7.
80. Cecchini, G., *Function and structure of complex II of the respiratory chain*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 77-109.
81. Morales, J., et al., *Novel mitochondrial complex II isolated from Trypanosoma cruzi is composed of 12 peptides including a heterodimeric lp subunit*. J Biol Chem, 2009. **284**(11): p. 7255-63.
82. Eubel, H., L. Jansch, and H.P. Braun, *New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II*. Plant Physiol, 2003. **133**(1): p. 274-86.
83. Millar, A.H., et al., *Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits*. Plant Mol Biol, 2004. **56**(1): p. 77-90.
84. van Lis, R., et al., *Identification of novel mitochondrial protein components of Chlamydomonas reinhardtii. A proteomic approach*. Plant Physiol, 2003. **132**(1): p. 318-30.
85. Iwata, S., et al., *Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex*. Science, 1998. **281**(5373): p. 64-71.
86. Yang, X.H. and B.L. Trumpower, *Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex from Paracoccus denitrificans*. J Biol Chem, 1986. **261**(26): p. 12282-9.
87. Braun, H.P., et al., *The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain*. EMBO J, 1992. **11**(9): p. 3219-27.
88. Taanman, J.W. and R.A. Capaldi, *Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22481-5.
89. Van Kuilenburg, A.B., et al., *Isoforms of human cytochrome-c oxidase. Subunit composition and steady-state kinetic properties*. Eur J Biochem, 1991. **199**(3): p. 615-22.
90. Kadenbach, B., et al., *Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure*. Anal Biochem, 1983. **129**(2): p. 517-21.
91. Speijer, D., et al., *Purification and characterization of cytochrome c oxidase from the insect trypanosomatid Crithidia fasciculata*. Mol Biochem Parasitol, 1996. **79**(1): p. 47-59.

92. Zikova, A., et al., *Structural and functional association of Trypanosoma brucei MIX protein with cytochrome c oxidase complex*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(11): p. 1994-2003.
93. Belevich, I. and M.I. Verkhovsky, *Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(1): p. 1-29.
94. Haltia, T., A. Puustinen, and M. Finel, *The Paracoccus denitrificans cytochrome aa3 has a third subunit*. Eur J Biochem, 1988. **172**(3): p. 543-6.
95. Pereira, M.M., M. Santana, and M. Teixeira, *A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1505**(2-3): p. 185-208.
96. Collinson, I.R., et al., *Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase*. Biochemistry, 1994. **33**(25): p. 7971-8.
97. Velours, J. and G. Arselin, *The Saccharomyces cerevisiae ATP synthase*. J Bioenerg Biomembr, 2000. **32**(4): p. 383-90.
98. Lapaille, M., et al., *Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F1FO-ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme*. Mol Biol Evol, 2010. **27**(7): p. 1630-44.
99. Zikova, A., et al., *The F(0)F(1)-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic Trypanosoma brucei*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000436.
100. Noji, H., et al., *Direct observation of the rotation of F1-ATPase*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 299-302.
101. Abrahams, J.P., et al., *Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria*. Nature, 1994. **370**(6491): p. 621-8.
102. Nakamoto, R.K., J.A. Baylis Scanlon, and M.K. Al-Shawi, *The rotary mechanism of the ATP synthase*. Arch Biochem Biophys, 2008. **476**(1): p. 43-50.
103. Michalecka, A.M., et al., *Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light*. Plant Physiol, 2003. **133**(2): p. 642-52.
104. Fang, J. and D.S. Beattie, *Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from Trypanosoma brucei mitochondria: isolation and characterization*. Biochemistry, 2002. **41**(9): p. 3065-72.
105. McDonald, A.E., G.C. Vanlerberghe, and J.F. Staples, *Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution*. J Exp Biol, 2009. **212**(Pt 16): p. 2627-34.
106. Van Aken, O., et al., *Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses*. Physiol Plant, 2009. **137**(4): p. 354-61.
107. Chaudhuri, M., R.D. Ott, and G.C. Hill, *Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function*. Trends Parasitol, 2006. **22**(10): p. 484-91.
108. Sluse, F.E., et al., *Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(5-6): p. 480-5.
109. Allahverdiyeva, Y., et al., *Photoprotection of photosystems in fluctuating light intensities*. J Exp Bot, 2015. **66**(9): p. 2427-2436.
110. Wollman, F.A., *State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus*. EMBO J, 2001. **20**(14): p. 3623-30.
111. Muller, P., X.P. Li, and K.K. Niyogi, *Non-photochemical quenching. A response to excess light energy*. Plant Physiol, 2001. **125**(4): p. 1558-66.
112. Asada, K., *THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999. **50**: p. 601-639.
113. Badger, M.R., et al., *Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2000. **355**(1402): p. 1433-46.
114. Cardol, P., et al., *An original adaptation of photosynthesis in the marine green alga Ostreococcus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7881-6.

115. Cardol, P., G. Forti, and G. Finazzi, *Regulation of electron transport in microalgae*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(8): p. 912-8.
116. Barber, J., *Photosystem II: its function, structure, and implications for artificial photosynthesis*. Biochemistry (Mosc), 2014. **79**(3): p. 185-96.
117. Baniulis, D., et al., *Structure-function of the cytochrome b6f complex*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(6): p. 1349-58.
118. Busch, A. and M. Hippler, *The structure and function of eukaryotic photosystem I*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(8): p. 864-77.
119. Vacula, R., et al., *Plastid state- and light-dependent regulation of the expression of nucleus-encoded genes for chloroplast proteins in the flagellate Euglena gracilis*. Folia Microbiol (Praha), 2001. **46**(5): p. 433-41.
120. Junge, W. and N. Nelson, *ATP Synthase*. Annu Rev Biochem, 2015.
121. Benson, A. and M. Calvin, *The Dark Reductions of Photosynthesis*. Science, 1947. **105**(2738): p. 648-9.
122. Raines, C.A., *The Calvin cycle revisited*. Photosynth Res, 2003. **75**(1): p. 1-10.
123. Kresge, N., R.D. Simoni, and R.L. Hill, *Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. e3.
124. Vertommen, D., et al., *Differential expression of glycosomal and mitochondrial proteins in the two major life-cycle stages of Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol, 2008. **158**(2): p. 189-201.
125. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. 2002: Garland Science.
126. Gunsalus, I.C., B.L. Horecker, and W.A. Wood, *Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms*. Bacteriol Rev, 1955. **19**(2): p. 79-128.
127. Keller, M.A., A.V. Turchyn, and M. Ralser, *Non-enzymatic glycolysis and pentose phosphate pathway-like reactions in a plausible Archean ocean*. Mol Syst Biol, 2014. **10**: p. 725.
128. Stincone, A., et al., *The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2014.
129. Houten, S.M. and R.J. Wanders, *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation*. J Inherit Metab Dis, 2010. **33**(5): p. 469-77.
130. Wanders, R.J., et al., *The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results*. J Inherit Metab Dis, 2010. **33**(5): p. 479-94.
131. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. 5th ed. 2002: W H Freeman.
132. Ford, B.J., *The van Leeuwenhoek specimens*. Notes Rec R Soc Lond, 1981. **36**(1): p. 37-59.
133. Gockel, G., et al., *Genes for components of the chloroplast translational apparatus are conserved in the reduced 73-kb plastid DNA of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate Astasia longa*. Curr Genet, 1994. **26**(3): p. 256-62.
134. Buetow, D., *The Biology of Euglena*. 1982, Academic Press, New York.
135. Wolken, J.J., *Euglena: an experimental organism for biochemical and biophysical studies*. 1961.
136. Cramer, M. and J. Myers, *Growth and Photosynthetic Characteristics of Euglena gracilis*. Arch. Mikrobiol., 1952. **17**: p. 19.
137. Wilson, B.W. and W.F. Danforth, *The extent of acetate and ethanol oxidation by Euglena gracilis*. J Gen Microbiol, 1958. **18**(3): p. 535-42.
138. Mego, J.L. and R.M. Farb, *Alcohol dehydrogenases of Euglena gracilis, strain Z*. Biochim Biophys Acta, 1974. **350**(1): p. 237-9.
139. Buetow, D.E., *Ethanol Stimulation of Oxidative Metabolism in Euglena gracilis*. Nature, 1961. **190**: p. 1.
140. Sharpless, T.K. and R.A. Butow, *An inducible alternate terminal oxidase in Euglena gracilis mitochondria*. J Biol Chem, 1970. **245**(1): p. 58-70.
141. Calvayrac, R. and R.A. Butow, *Action de l'antimycine A sur la respiration et la structure des mitochondries d'Euglena gracilis Z*. Arch Mikrobiol, 1971. **80**: p. 8.

142. Yoval-Sanchez, B., et al., *Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of Euglena gracilis*. J Bioenerg Biomembr, 2011. **43**(5): p. 519-30.
143. App, A.A. and A.T. Jagendorf, *Repression of Chloroplast Development in Euglena gracilis by Substrates\**. The Journal of Protozoology, 1963. **10**(3): p. 340-343.
144. Buetow, D.E., *Acetate repression of chlorophyll synthesis in Euglena gracilis*. Nature, 1967. **213**(5081): p. 1127-8.
145. Vannini, G.L., *Degeneration and regeneration of chloroplasts in Euglena gracilis grown in the presence of acetate: ultrastructural evidence*. J Cell Sci, 1983. **61**: p. 413-22.
146. Lonergan, T.A., *Regulation of Cell Shape in Euglena gracilis: I. Involvement of the Biological Clock, Respiration, Photosynthesis, and Cytoskeleton*. Plant Physiol, 1983. **71**(4): p. 719-30.
147. Leander, B.S., H.J. Esson, and S.A. Breglia, *Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids*. Bioessays, 2007. **29**(10): p. 987-1000.
148. Moreno-Sanchez, R., et al., *Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from Euglena*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1457**(3): p. 200-10.
149. Castro-Guerrero, N.A., K. Krab, and R. Moreno-Sanchez, *The alternative respiratory pathway of Euglena mitochondria*. J Bioenerg Biomembr, 2004. **36**(5): p. 459-69.
150. Sharpless, T.K. and R.A. Butow, *Phosphorylation sites, cytochrome complement, and alternate pathways of coupled electron transport in Euglena gracilis mitochondria*. J Biol Chem, 1970. **245**(1): p. 50-7.
151. Castro-Guerrero, N.A., R. Jasso-Chavez, and R. Moreno-Sanchez, *Physiological role of rhodoquinone in Euglena gracilis mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1710**(2-3): p. 113-21.
152. Bronstrup, U. and W. Hachtel, *Cytochrome c oxidase of Euglena gracilis: purification, characterization, and identification of mitochondrially synthesized subunits*. J Bioenerg Biomembr, 1989. **21**(3): p. 359-73.
153. Nakazawa, M., et al., *Molecular characterization of a bifunctional glyoxylate cycle enzyme, malate synthase/isocitrate lyase, in Euglena gracilis*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2005. **141**(4): p. 445-52.
154. Ono, K., et al., *Presence of glyoxylate cycle enzymes in the mitochondria of Euglena gracilis*. J Eukaryot Microbiol, 2003. **50**(2): p. 92-6.
155. Nakazawa, M., et al., *Characterization of a bifunctional glyoxylate cycle enzyme, malate synthase/isocitrate lyase, of Euglena gracilis*. J Eukaryot Microbiol, 2011. **58**(2): p. 128-33.
156. Liu, F., et al., *Bifunctional glyoxylate cycle protein of Caenorhabditis elegans: a developmentally regulated protein of intestine and muscle*. Dev Biol, 1995. **169**(2): p. 399-414.
157. Shigeoka, S., et al., *Occurrence of thiamin pyrophosphate-dependent 2-oxoglutarate decarboxylase in mitochondria of Euglena gracilis*. FEBS Lett, 1986. **195**: p. 43-47.
158. Shigeoka, S. and Y. Nakano, *Characterization and molecular properties of 2-oxoglutarate decarboxylase from Euglena gracilis*. Arch Biochem Biophys, 1991. **288**(1): p. 22-8.
159. Green, L.S., et al., *Catabolism of alpha-ketoglutarate by a sucA mutant of Bradyrhizobium japonicum: evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle*. J Bacteriol, 2000. **182**(10): p. 2838-44.
160. Inui, H., et al., *Purification and characterization of pyruvate:NADP+ oxidoreductase in Euglena gracilis*. J Biol Chem, 1987. **262**(19): p. 9130-5.
161. Inui, H., et al., *Occurrence of oxygen-sensitive, NADP+-dependent pyruvate dehydrogenase in mitochondria of Euglena gracilis*. J Biochem, 1984. **96**(3): p. 931-4.
162. Inui, H., et al., *Pyruvate:NADP+ oxidoreductase from Euglena gracilis: mechanism of O<sub>2</sub>-inactivation of the enzyme and its stability in the aerobic*. Arch Biochem Biophys, 1990. **280**(2): p. 292-8.
163. Hoffmeister, M., et al., *Euglena gracilis rhodoquinone:ubiquinone ratio and mitochondrial proteome differ under aerobic and anaerobic conditions*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22422-9.



# ANNEXES





