

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX SEGALÉN

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Microbiologie - Immunologie

Présentée et soutenue publiquement
Le 16 décembre 2013

Par Yoann MILLERIOUX

Etude fonctionnelle du métabolisme de l'acétyl-CoA chez *Trypanosoma brucei*

Membres du Jury

Pr. Michel Rigoulet	Président
Pr. Paul Michels	Rapporteur
Dr. Henri Vial.....	Rapporteur
Dr. Paola Minoprio.....	Examinateur
Dr. Emmanuel Tétaud	Examinateur
Dr. Frédéric Bringaud	Directeur de thèse
Pr. Jean-Michel Franconi	Membre invité

LISTE DES PUBLICATIONS DANS LE CADRE DU DOCTORAT

ATP synthesis-coupled and -uncoupled acetate production from acetyl-CoA by the mitochondrial acetate:succinate CoA-transferase and acetyl-CoA thioesterase in *Trypanosoma*. Yoann Millerioux[#], Pauline Morand[#], Marc Biran, Muriel Mazet, Patrick Moreau, Marion Wagnies, Charles Ebikeme, Kamel Deramchia, Lara Gales, Jean-Charles Portais, Michael Boshart, Jean-Michel Franconi, Frédéric Bringaud. *The Journal of Biological Chemistry* (2012) 287(21): 17186-17197.

The threonine degradation pathway of the *Trypanosoma brucei* procyclic form: the main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control. Yoann Millerioux[#], Charles Ebikeme[#], Marc Biran, Pauline Morand, Guillaume Bouyssou, Isabel M. Vincent, Muriel Mazet, Loïc Riviere, Jean-Michel Franconi, Richard J. S. Burchmore, Patrick Moreau, Michael P. Barrett et Frédéric Bringaud. *Molecular Microbiology* (2013) 90(1), 114–129

#co-auteurs

SOMMAIRE

Préambule.....	4
I - INTRODUCTION.....	5
1.1 Trypanosomes et trypanosomiase humaine africaine (THA)	6
1.1.1 Taxonomie.....	6
1.1.2 Découverte du parasite et de son vecteur	6
1.1.3 La trypanosomiase humaine africaine	7
1.1.3.1 Les différents stades de la maladie.....	8
1.1.3.2 La lutte contre la HAT	8
1.1.3.3 Diagnostic.....	9
1.1.3.4 Traitement	10
1.1.4 La mouche tsétsé	10
1.1.4.1 Cycle de vie de la mouche.....	10
1.1.4.2 Le repas sanguin.....	10
1.1.4.3 Interaction vecteur-parasite	11
1.1.5 Cycle parasitaire.....	11
1.2 Caractéristiques cellulaires des trypanosomes africains.....	12
1.2.1 Le modèle <i>Trypanosoma brucei</i>.....	12
1.2.2 Architecture cellulaire	14
1.2.3 Le génome.....	15
1.2.3.1 Génome mitochondrial et édition d'ARN.....	15
1.2.3.2 Génome nucléaire	16
1.2.3.3 Régulation de l'expression génétique	17
1.2.4 La variation antigénique.....	18
1.2.5 L'ARN interférence.....	19
1.2.5.1 Découverte de l'ARN interférence	19
1.2.5.2 Fonctions et applications de l'ARN interférence	20
1.2.5.3 Mécanisme général.....	20
1.2.5.4 L'ARNi chez <i>Trypanosoma brucei</i>	21
1.2.6 Initiation de la différenciation formes sanguines/procyclique	23
1.3 Le métabolisme intermédiaire de <i>Trypanosoma brucei</i>	23
1.3.1 Métabolisme énergétique de la forme procyclique.....	23
1.3.1.1 Métabolisme de la proline.....	24
1.3.1.2 Métabolisme de la thréonine.....	25
1.3.1.3 Métabolisme glucidique	25

1.3.1.4 La voie des pentoses phosphates	27
1.3.1.5 La chaîne respiratoire	27
1.3.1.6 La production d'ATP	28
1.3.2 Métabolisme énergétique des formes sanguines	29
1.3.2.1 La glycolyse.....	29
1.3.2.2 La voie des pentoses phosphates	31
1.3.2.3 Métabolisme mitochondrial	31
1.3.2.4 Métabolisme de la thréonine.....	32
1.4 Métabolisme de l'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA).....	32
1.4.1 Production d'acétyl-CoA à partir du glucose	33
1.4.1.1 Le complexe PDH : structure.....	33
1.4.1.2 Le complexe PDH : réactions enzymatiques.....	34
1.4.1.3 Le complexe PDH de <i>T. brucei</i>	34
1.4.2 Production d'acétyl-CoA à partir de la thréonine	35
1.5 Métabolisme de l'acétate	36
1.5.1 Généralités	36
1.5.2 La production d'acétate chez <i>T. brucei</i>.....	37
1.5.3 Les autres voies de production d'acétate à partir d'acétyl-CoA	38
1.5.3.1 Le système acétyl-CoA:phosphate acétyltransférase/ ATP:acétate phosphotransférase	38
1.5.3.2 L'acétyl-CoA thioestérase	39
1.5.3.3 Acétyl-CoA synthétase « ADP-forming »	39
1.5.3.4 L'acétyl-CoA synthétase « AMP-forming »	40
1.5.4 La navette acétate chez les trypanosomes.....	40
1.6 Biosynthèse lipidique	41
1.6.1 Les principaux types de lipides	41
1.6.1.1 Les acides gras.....	41
1.6.1.2 Les glycérophospholipides	41
1.6.1.3 Les stérols.....	42
1.6.2 La biosynthèse <i>de novo</i> des lipides chez <i>T. brucei</i>.....	42
1.6.2.1 Composition lipidique de <i>T. brucei</i>	42
1.6.2.2 Biosynthèse <i>de novo</i> des acides gras	43
1.6.2.3 Biosynthèse <i>de novo</i> des stérols	46
II - RESULTATS.....	48

2.1 Article I : ATP synthesis-coupled and -uncoupled acetate production from acetyl-CoA by the mitochondrial acetate:succinate CoA-transferase and acetyl-CoA thioesterase in <i>Trypanosoma</i>	51
2.1.1 Résumé de l'article	51
2.1.2 Article	52
2.2 Article II : The threonine degradation pathway of the <i>Trypanosoma brucei</i> procyclic form: the main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control	68
2.2.1 Résumé de l'article	68
2.2.2 Article	70
2.3 Production d'acétate et production d'ATP : vers un <i>channeling</i> métabolique .	91
2.4 Analyse de la biosynthèse <i>de novo</i> des acides gras et des stérols à partir du glucose et de la thréonine	99
2.5 Biosynthèse du butyryl-CoA	102
2.5.1 La voie de biosynthèse	102
2.5.2 L'isovaléryl-CoA déshydrogénase.....	103
2.5.3 Localisation de l'IVDH chez <i>T.brucei</i>	103
2.5.4 Expression hétérologue de l'IVDH dans <i>E. coli</i>	104
2.5.5 Analyse de la croissance du mutant ^{ARNi} IVDH	105
2.5.6 Test d'activité IVDH	106
2.5.7 Effet de l'inhibition de l'expression de l'IVDH sur la biosynthèse des acides gras et des stérols	107
2.5.8 Conclusion	108
III - DISCUSSION GENERALE	110
3.1 Rôles de la production d'acétate dans la mitochondrie des trypanosomes	111
3.1.1 Forme procyclique.....	111
3.1.1 Formes sanguines	113
3.2 Channeling mitochondrial ?	115
3.3 Les sources d'acétyl-CoA	118
3.4 Le précurseur de la biosynthèse des acides gras de la voie des élongases	120
IV - BIBLIOGRAPHIE	123

Préambule

Trypanosoma brucei est le parasite responsable de la maladie du sommeil ou trypanosomiase humaine africaine. Cette maladie est mortelle si elle n'est pas traitée. A l'heure actuelle il n'existe pas de vaccin et les traitements existants ne sont pas satisfaisants. Ce constat, ainsi que les nombreuses particularités de ce parasite, en font un modèle d'étude privilégié.

Mon travail de thèse a consisté à étudier le métabolisme intermédiaire de la forme procyclique de *Trypanosoma brucei*, forme retrouvée chez l'insecte vecteur (mouche tsé-tsé). Je me suis notamment intéressé au métabolisme de l'acétyl-CoA et de l'acétate qui sont des éléments clés du métabolisme de ce parasite.

Dans la première partie de l'introduction, je présente les généralités sur la maladie, le parasite et son vecteur.

La seconde partie présente les caractéristiques cellulaires de *T. brucei* et les particularités du modèle.

Dans la troisième partie de cette introduction, je présente l'état actuel des connaissances sur le métabolisme intermédiaire de la forme procyclique, retrouvée chez l'insecte vecteur, et des formes sanguines, présentes chez l'hôte mammifère. Comme nous le verrons, depuis 2005, le génome complet de *T. brucei* a été séquencé, ce qui constitue un outil précieux pour l'étude du métabolisme du parasite, permettant ainsi de faire évoluer considérablement les connaissances et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans cette partie, je détaille particulièrement le métabolisme de l'acétyl-CoA et de l'acétate auxquels je me suis intéressé pendant ma thèse. La production d'ATP au sein de la mitochondrie ainsi que la biosynthèse des lipides dont l'acétyl-CoA est le précurseur et l'acétate un intermédiaire particulier, seront également détaillées.

I - INTRODUCTION

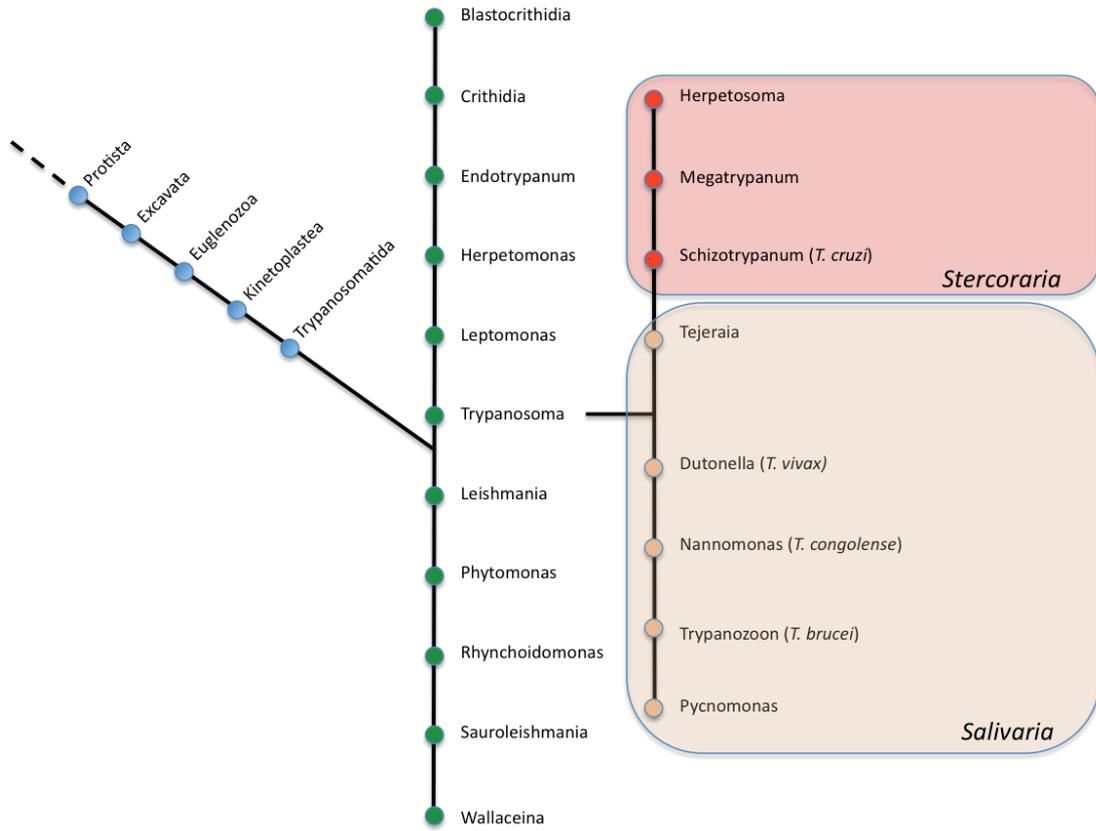


Figure 1 : Classification des trypanosomatidés

1.1 Trypanosomes et trypanosomiase humaine africaine (THA)

1.1.1 Taxonomie

Le règne des protistes rassemble des organismes eucaryotes unicellulaires. Ce règne est divisé en 3 groupes les mycétozoaires, les protophytes et les protozoaires parmi lesquels on retrouve les trypanosomes.

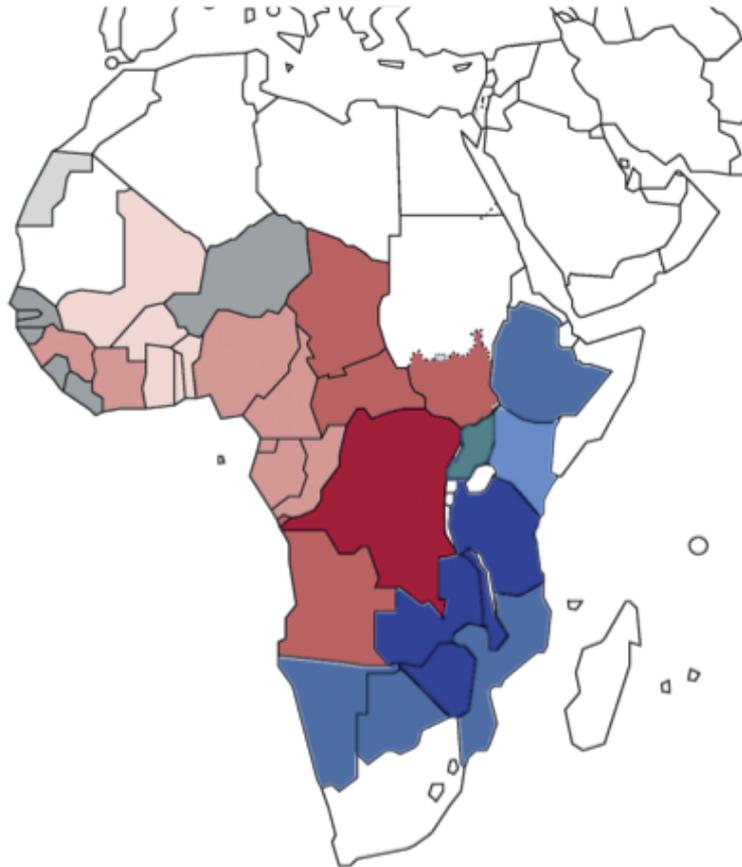
Les trypanosomes appartiennent à la classe des Kinetoplastea, caractérisés par une unique mitochondrie de grande taille et la présence d'un « kinétoplaste », terme donné par Alexeieff en 1917 (Alexeieff 1917) pour identifier une structure composée de granules basophiles près de la base du flagelle du parasite. En 1969, Vickerman montre par microscopie électronique qu'il s'agit d'une importante masse d'ADN mitochondrial (Vickerman and Preston 1976).

La classe des Kinetoplastea est divisée en deux sous-classes : les Prokinetoplastina (dont le seul ordre est les Prokinetoplastida) et les Matakinetoplastina. Cette dernière sous-classe est divisée en 4 ordres : les Neobodonida, les Parabodonida, les Eubodonida, et les Trypanosomatida. Ces derniers, dans lesquels on retrouve le genre *Trypanosoma*, regroupent des parasites possédant un unique flagelle et un petit kinétoplaste (Fig. 1). Parmi les trypanosomatidés, trois sont responsables de maladies chez l'Homme : *Leishmania* spp. (responsable des leishmanioses), *Trypanosoma cruzi* (responsable de la maladie de Chagas ou trypanosomiase humaine américaine) et *Trypanosoma brucei* (responsable de la maladie du sommeil ou trypanosomiase humaine africaine). Certaines espèces de *T. brucei* sont également responsables de maladies chez le bétail (*T. brucei brucei*, agent de la Nagana).

Le genre *Trypanosoma* est divisé en deux sections selon leur mode de transmission : les *Salivaria*, qui se transmettent par la salive du vecteur (c'est le cas des trypanosomes africains) et les *Stercoraria*, transmis par les fèces du vecteur (trypanosomes sud-américains) (Moreira, López-García et al. 2004, Adl, Simpson et al. 2005, Simpson, Stevens et al. 2006).

1.1.2 Découverte du parasite et de son vecteur

Les premiers écrits évoquant des symptômes de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA, ou maladie du sommeil) datent du Moyen-Age, mais l'apparition des trypanosomes remonte à des millions d'années. Le géographe arabe Abu Abdallah Yaqut (1179-1229) raconte que lors de ses voyages en Afrique, il découvrit un village où les habitants n'avaient « que la peau sur les os et étaient endormis ». Au XIV^e siècle, l'historien arabe Ibn Khaldun décrit la mort de Mari Diata II, sultan du Mali, en 1374, dont les circonstances font penser à la THA.



Nombre de nouveaux cas rapportés en 2011 par pays

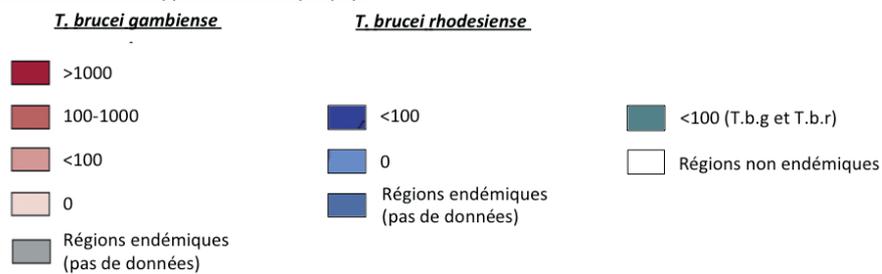


Figure 2 : Distribution globale de la trypanosomiase humaine Africaine

(D'après *Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases*

- *Second WHO report on Neglected Diseases*. OMS, 2013)

Au XVe et XVIe siècle, les explorateurs font état de certaines zones en Afrique où le bétail et les chevaux ne survivent pas. Au XVIIe, de nombreux cas de maladie du sommeil sont identifiés parmi les esclaves. En 1742, John Atkins, chirurgien de la marine anglaise, décrit les symptômes de la maladie à partir d'observations effectuées sur la côte guinéenne. Entre 1768 et 1773, Jacques Bruce, explorateur écossais rencontre une mouche « redoutable » en Nubie et Abyssinie, appelée Zimb par les arabes et Tsaltsalya par les éthiopiens, dont la description et le dessin font penser au genre *Glossina*. C'est en 1842 qu'apparaît le terme trypanosome. Du grec ancien *trypanon* (tarière) et *soma* (corps), ce nom a été donné par le docteur David Gruby pour décrire la forme et le déplacement d'un parasite de batraciens (*Trypanosoma sanguinis*). Le mot "tsé-tsé", utilisé par les Africains des populations Matabélé du fait de leur bruit en vol, fut adopté par le chasseur A. Gordon Cumming en 1846 pour désigner une mouche qui décimait en Afrique australe les chevaux et les bœufs de son expédition. Toujours en 1846, Cotton Oswell et Frank Vardon montent une expédition de chasse dans la même région que Cumming. Ils capturent des glossines près du Limpopo qui serviront à Westwood pour décrire *Glossina morsitans* en 1850. David Livingstone, médecin et explorateur écossais, est le premier en 1857 à pressentir que la piqûre de la glossine entraînerait un empoisonnement du sang dont le germe serait déposé par la trompe de l'insecte. Ce n'est qu'en 1902 que la relation parasite-vecteur-maladie est mise en évidence par David Bruce, un microbiologiste écossais: il transmet la maladie à des singes en les faisant piquer par des glossines précédemment nourries sur des sommeilleux (Steveding 2008).

1.1.3 La trypanosomiase humaine africaine

La trypanosomiase humaine africaine (THA) connue aussi sous le nom de maladie du sommeil, est une parasitose transmise par un insecte vecteur : la glossine ou mouche « tsé-tsé » (Fig. 5A). On estime qu'actuellement le nombre de cas est de 30 000 et que la population à risque est de 70 millions de personnes. On retrouve la maladie dans les zones où la mouche est présente, en Afrique sub-saharienne. Cependant, certaines régions sont épargnées par la maladie bien que la glossine soit présente. L'agent responsable de la maladie est *T. brucei*. Deux sous-espèces sont capables d'infecter l'Homme :

- *T. brucei gambiense*, retrouvé dans 95% des HAT et présent en Afrique centrale et de l'Ouest. On trouve ce parasite chez le porc et le chien mais l'Homme reste le principal réservoir ;
- *T. brucei rhodesiense*, rencontré en Afrique orientale et australe, qui a pour réservoir le bétail et les animaux sauvages (Bovins, antilopes, phacochères, etc.) (Fig. 2)

A



B

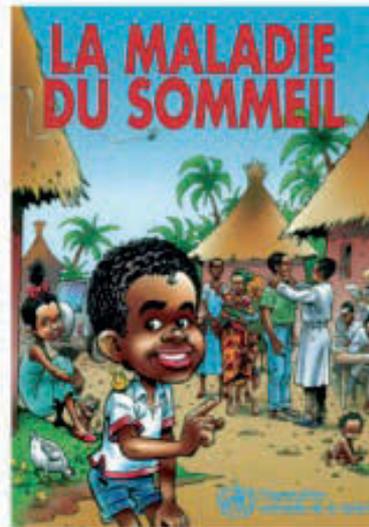


Figure 3: Lutte contre la trypanosomiase humaine Africaine

A, pièges à glossines (Programme Against African Trypanosomosis (PAAT))

B, campagne d'information destinée aux enfants (OMS)

Le premier mode de contamination est la piqûre par la glossine. Cependant des cas de transmissions mère-enfant ont été rapportés (le parasite peut passer la barrière placentaire), d'autres insectes hématophages sont capables de transmettre le parasite et des infections en laboratoire par des aiguilles contaminées sont possibles.

La maladie du sommeil est mortelle si elle n'est pas traitée. Il n'existe pas de vaccin et les traitements existants présentent des effets secondaires sévères.

1.1.3.1 Les différents stades de la maladie

Lors d'une infection par *T. brucei gambiense*, l'apparition des premiers symptômes peut prendre plusieurs mois voire plusieurs années et le système nerveux central est alors souvent déjà atteint. On parle d'infection chronique.

L'apparition des symptômes lors d'une infection par *T. brucei rhodesiense* est beaucoup plus précoce (de quelques semaines à quelques mois). La maladie évolue rapidement vers une atteinte du système nerveux central. On parle d'infection aiguë.

On distingue deux phases dans l'évolution de la maladie. Lors de la première phase, ou phase lymphatico-sanguine, les parasites injectés se multiplient dans le système sanguin, lymphatique et dans les tissus sous-cutanés. Il y a alors apparition chez le sujet atteint de fièvre, céphalées et douleurs articulaires. Lors de la deuxième phase, ou phase neurologique, les parasites franchissent la barrière hémato-encéphalique et colonisent le système nerveux central. Le sujet présente alors des troubles sensoriels, du comportement, de la coordination et du sommeil, d'où le nom qui a été donné à la maladie.

1.1.3.2 La lutte contre la HAT

La maladie avait été contenue vers le début des années 60 (moins d'un nouveau cas pour 10000 habitants) grâce aux campagnes de diagnostic, au traitement de la maladie (malgré les effets secondaires), à la lutte anti-vectorielle et au déploiement d'équipes médicales mobiles. Mais le manque de moyens humains et financiers, les mouvements de populations dus aux crises politiques et économiques ont conduit à une diminution de la vigilance, des diagnostics et de la disponibilité des traitements entraînant la résurgence de la maladie. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) lors de son dernier rapport fixe comme objectif la détection de moins d'un cas pour 10000 habitants dans au moins 90% des régions endémiques, soit moins de 2000 nouveaux cas par an à l'échelle du continent africain à l'horizon 2020. L'objectif de zéro cas recensés dans les régions endémiques est fixé quant à lui pour 2030.

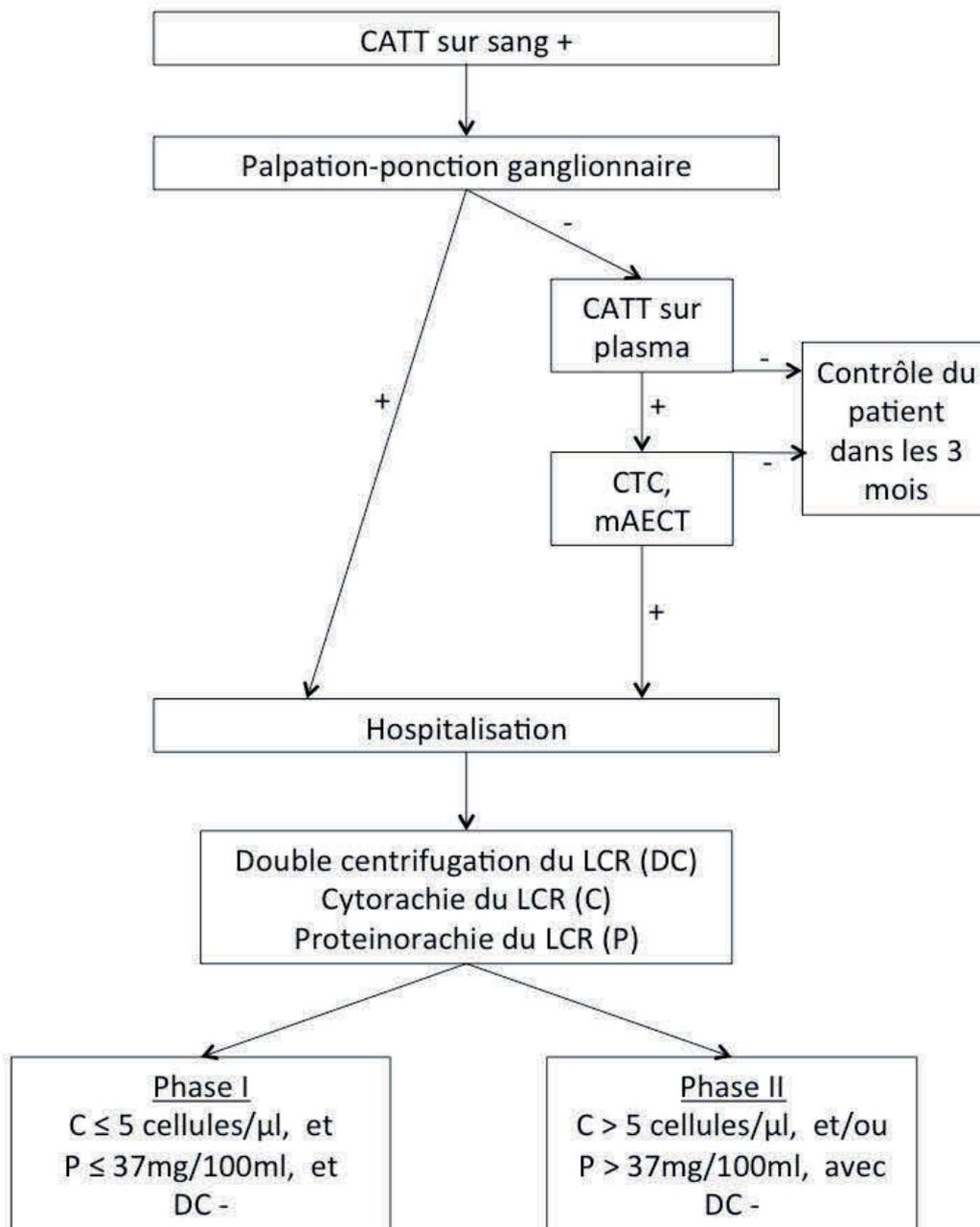


Figure 4 : Schéma décisionnel du diagnostique de la THA

La stratégie de lutte comporte des actions à différents niveaux : le renforcement des capacités humaines, le dépistage et le traitement des cas, la lutte anti-vectorielle (pose de pièges anti tsé-tsé, Fig. 3A), la lutte contre les réservoirs animaux (diagnostic et traitement du bétail), la surveillance (collecte de données épidémiologiques et de pharmacorésistance, cartographie), la promotion de la santé (formation de locaux pour une action de prévention communautaire, Fig. 3B) et la recherche opérationnelle (recherche thérapeutique, socioéconomique et sociologique afin de connaître les attitudes des communautés). Les outils de contrôle et les stratégies mis en place depuis le début des années 2000 ont prouvé leur efficacité puisque le nombre de nouveaux cas annuels a chuté de 75% en 12 ans.

1.1.3.3 Diagnostic

Le diagnostic de la THA se déroule en deux temps : le diagnostic de la maladie puis le diagnostic de phase permettant de définir la stratégie thérapeutique à adopter en cas d'infection avérée.

Lors des campagnes de dépistage, l'utilisation de tests sérologiques permet d'effectuer une première sélection au sein d'une population. La technique la plus utilisée est le test d'agglutination sur carte CATT (Card agglutination trypanosomiasis test) qui va permettre la détection d'anticorps dans le sang total : il est basé sur la reconnaissance des VSG (variant surface glycoprotein) de trypanosomes par les anticorps. Ce test n'a qu'une valeur d'orientation car les anticorps persistent 3 ans après traitement et des réactions croisées peuvent exister. Le diagnostic se poursuit par la recherche de ganglions suspects : la ponction et l'observation au microscope peuvent permettre la mise en évidence du parasite. Si tel est le cas, le patient est hospitalisé pour un diagnostic de phase. Si l'analyse du suc ganglionnaire n'a pas révélé la présence de trypanosomes, un CATT sur plasma est réalisé. En cas de résultat négatif, le diagnostic s'arrête et le patient sera contrôlé dans les mois qui suivent. Si le test est positif, la recherche de parasite dans le sang se fera par centrifugation en tube capillaire (CTC) ou mini colonne échangeuse d'ions (mAECT pour mini anion exchange centrifugation technique). Si ces tests révèlent la présence de trypanosomes, le patient est hospitalisé. La deuxième partie du diagnostic consiste à déterminer la phase de la maladie. Elle repose sur l'analyse du LCR (liquide céphalo-rachidien). La recherche de trypanosomes se fait par double centrifugation différentielle (DC). Cette technique étant peu sensible, des critères comme l'augmentation de la protéinorachie (dosage des protéines, P) et de la cytorachie (nombre de leucocytes, C) sont pris en compte (Fig. 4) (Louis, Buscher et al. 2001, Aubry 2010).

Médicament	Molécule	Première utilisation	Indication	Mode d'action possible	Effets indésirables
<i>Médicaments pour le traitement du premier stade de la maladie</i>					
Suramine	Naphtylamine polysulphonés	1922	Infection par <i>T.b.r</i>	Perturbation de récepteurs et/ou de signaux de transduction	Toxicité cutanée, neurologique et rénale
Pentamidine	Diamidine aromatique	1937	Infection par <i>T.b.g</i>	Biosynthèse des polyamines ; Inhibition sélective d'une ATPase de la membrane plasmique et du transport du Ca_2^+	Nausées, hypoglycémies, hypotension, toxicité rénale, pancréatique et hématologique
<i>Médicaments pour le traitement du second stade de la maladie</i>					
Mélarsozol	Dérivé arsenical	1949	Infection par <i>T.b.g</i> et <i>T.b.r</i>	Métabolisme du trypanothion	Effets secondaires neurologiques graves
Eflornithine	DL- α -difluorométhyl ornithine	1981	Infection par <i>T.b.g</i>	Biosynthèse des polyamines	Insomnie, diarrhées, convulsions, hallucinations Toxicité inférieure au Mélarsozol
Nifurtimox	5'-nitrofurane	1977	Infection par <i>T.b.g</i> . Uniquement en association Avec l'eflornithine	Métabolisme du trypanothion	Anorexie, perte de poids, effets neurologiques, coma, insomnie, hallucinations, déficits moteurs, effets digestifs

Tableau 1: Traitements contre la maladie du sommeil recommandés par l'OMS
(WHO 18th Model List of Essential Medicines, avril 2013)

1.1.3.4 Traitement

Les premiers traitements contre la THA apparaissent au début du XXème siècle, avec l'atoxyl, un dérivé arsenical (Ollivier and Legros 2001). L'apparition de résistances et la volonté de réduire la toxicité des médicaments utilisés pour le traitement ont encouragé la recherche de nouvelles molécules ou de nouveaux protocoles, comme l'association de plusieurs molécules.

Les différents médicaments utilisés actuellement dans le traitement contre la maladie du sommeil sont répertoriés dans le tableau 1. La stratégie thérapeutique dépend du stade de la maladie et de l'espèce responsable de l'infection. Depuis 2009, l'OMS recommande la combinaison d'éflornithine et nifurtimox dans le traitement du second stade de la maladie lors d'une infection par *T. brucei gambiense*. Deux nouveaux médicaments, le Fexinidazole et l'Oxaborole sont actuellement en essai clinique pour déterminer leur efficacité dans les deux stades de la maladie. Ils ne devraient être disponibles qu'en 2017-2018.

1.1.4 La mouche tsétsé

1.1.4.1 Cycle de vie de la mouche

La femelle adulte va produire un unique œuf tous les 9-10 jours. Cet œuf va évoluer en un premier stade larvaire dans l'utérus de la femelle. Après une période de mue et de développement d'environ 9 jours, le troisième stade larvaire est déposé sur le sol, va s'enterrer et devenir pupa. La mouche sort du puparium 30 jours après. Durant toute sa vie, la femelle Glossine ne s'accouple qu'une fois : le sperme est alors stocké dans un spermatophore et sera utilisé pour la fécondation des futurs œufs.

Le cycle de vie étant relativement long (environ 50 jours entre l'émergence d'une femelle adulte et l'éclosion d'une mouche « fille »), le taux de reproduction de la mouche tsé-tsé est assez faible.

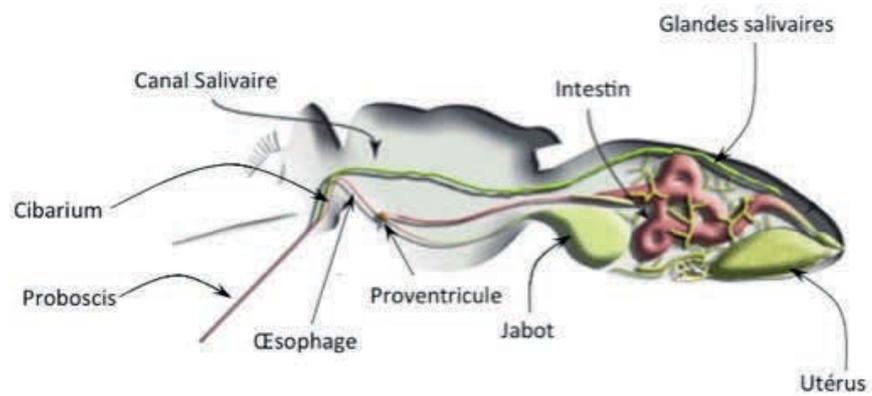
1.1.4.2 Le repas sanguin

Lors d'un repas sanguin, le proboscis (organe permettant la piqûre et la succion), va se séparer des palpes maxillaires. Il se compose du labium, du labre et de l'hypopharynx (Fig. 5B et C). L'extrémité du labium possède de petites dents (labelles) qui permettent d'inciser la peau de l'hôte. Ces dents labellaires vont alors couper les capillaires sanguins, ce qui crée une micro-hémorragie sous-cutanée. L'insecte va ingérer son repas sanguin grâce au canal formé par le labre et le labium. Le sang est aspiré par l'action de la pompe cibariale, située au niveau du pharynx.

A



B



C

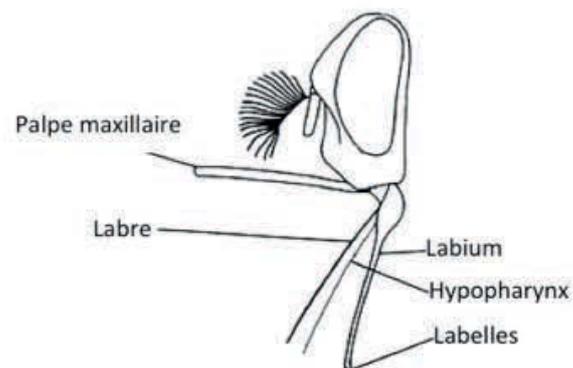


Figure 5 : La glossine ou mouche tsé-tsé

A, photographie de *Glossina fuscipes* (IRD / Cirad J. Janelle)

B, anatomie interne de la glossine (Aksoy Laboratory EPH, Yale School of Medicine)

C, tête de glossine en vue latérale (FAO)

Pendant ce processus, de la salive s'écoule par l'hypopharynx. Cette salive a des propriétés anticoagulantes et vasodilatatrices. Le sang passe ensuite par l'œsophage et rejoint le jabot où il sera stocké. Le repas sanguin est ensuite dirigé vers le proventricule pour rejoindre l'intestin moyen. Le proventricule est un organe musculaire qui fabrique un manchon (membrane péritrophique) qui va envelopper le sang tout au long de l'intestin (Fig. 5B). Formée à chaque repas sanguin, cette membrane chitineuse offre une protection à l'intestin et a un rôle de sélection puisqu'elle laisse passer les enzymes digestives, sécrétées par l'épithélium intestinal, et les produits de digestion, mais retient les déchets solides qui seront éliminés.

Le volume et la fréquence des repas sanguins varient en fonction de nombreux facteurs (espèce de glossine, température, etc.) (Leak 1998, Leak 1999).

1.1.4.3 Interaction vecteur-parasite

Si la glossine prend son repas sanguin chez un hôte infecté par des trypanosomes, elle va ingérer des parasites. Le taux d'infection chez l'insecte est relativement faible et va dépendre de nombreux paramètres : des facteurs endogènes à l'insecte (espèce de la mouche, sexe, âge, etc.), facteurs écologiques (conditions climatiques) et facteurs liés à l'hôte (espèce de trypanosome, parasitémie, etc.). L'importance d'endosymbiontes, les RLO (Rickettsia-Like Organisms), dans l'établissement d'une infection chez l'insecte a été mise en évidence (Maudlin, 1985). Ces organismes, maternellement transmis à la larve et retrouvés au niveau du mycétome (amas de cellules géantes dans la partie antérieure de l'intestin moyen) produisent une endochitinase qui va générer du glucosamine. Ce glucosamine va inhiber l'activité trypanosomicide des lectines de l'intestin moyen et favoriser ainsi le développement des parasites.

Bien que leurs rôles soient mal connus, on attribue également aux RLO des fonctions de nutrition de l'insecte, notamment dans la sécrétion de vitamines (Wink 1979, Nogge 1981), mais aussi dans la reproduction puisque le traitement antibiotique entraîne une stérilité chez la femelle et une mortalité prématurée de la progéniture (Nogge 1976, Aksoy, Gibson et al. 2003).

1.1.5 Cycle parasitaire

Lors d'un repas sanguin sur un hôte mammifère, la mouche tsé-tsé infectée va injecter les formes métacycliques du parasite, forme infectieuse. Ces parasites vont se différencier en formes sanguines trypomastigotes longues et mobiles (long slender) et se multiplier dans les différents fluides (sang, lymphe, liquide céphalo-rachidien).

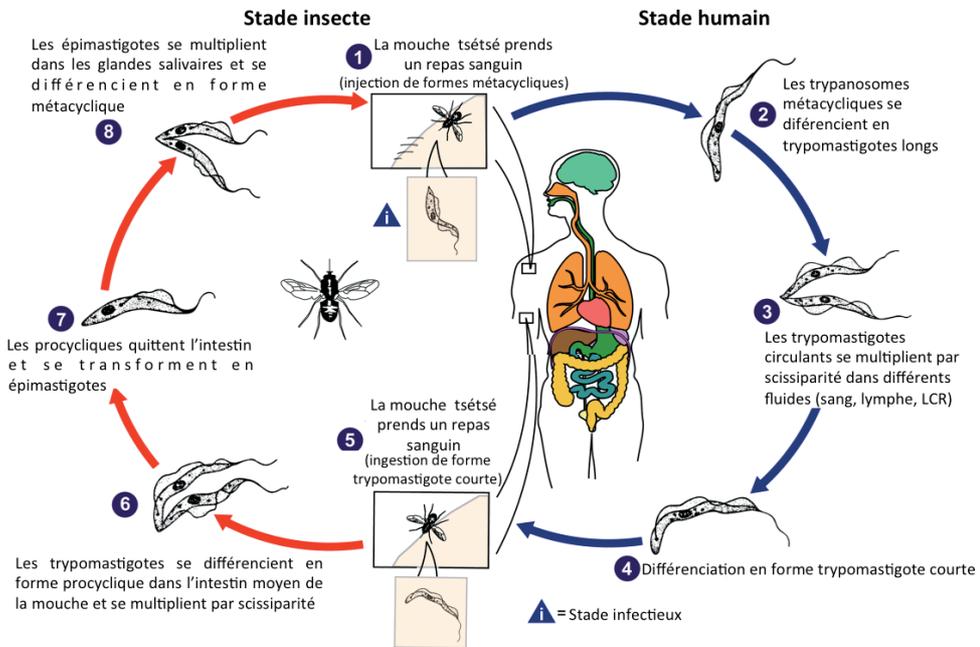


Figure 6 A : Cycle de vie des trypanosomes Africains (*T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*)
(D'après *Center of Disease Control and Prevention*)

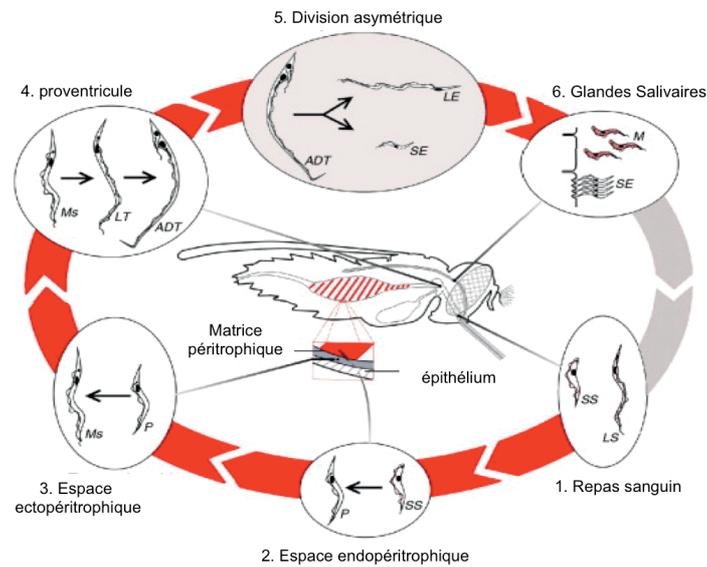


Figure 6 B : Différenciations de *T. brucei* chez la mouche tsé-tsé
D'après Walshe et al., 2009

Les flèches rouges désignent les étapes du stade insecte et les flèches grises celles du stade humain

Les trypomastigotes circulants se différencient ensuite en trypomastigotes courts et trapus (stumpy), ne se divisant plus, qui pourront être ingérés par une glossine lors d'un repas sanguin (Fig. 6A). Les modifications d'environnement que vont rencontrer les parasites lors du passage de l'hôte au vecteur requièrent des adaptations. Les trypanosomes ingérés par la mouche vont se différencier en forme procyclique (P) mobile dans l'intestin moyen et se multiplier. Les trypanosomes vont ensuite traverser la membrane péritrophique pour rejoindre l'espace ectopéritrophique, se multiplier et se différencier en forme mésocyclique (Ms). Les parasites traversent à nouveau la membrane péritrophique, migrent vers la partie antérieure du proventricule et se différencient en trypomastigotes longs (LT) puis en trypomastigotes à division asymétrique (ADT). Une partie des ADT se différencie en épimastigotes longs (LE), alors que l'autre partie se différencie en épimastigotes courts (SE). Les SE migrent vers les glandes salivaires, s'attachent à l'épithélium de ces glandes, se multiplient et se différencient à nouveau : les parasites deviennent à nouveau libres et ne se divisent plus, c'est la forme métacyclique, forme infectieuse, qui pourra être injectée avec la salive lors d'un repas sanguin (Fig. 6A et B). La forme métacyclique, comme les formes sanguines, possède un manteau de VSG (Variable Surface Glycoprotein) (Walshe, Ooi et al. 2009).

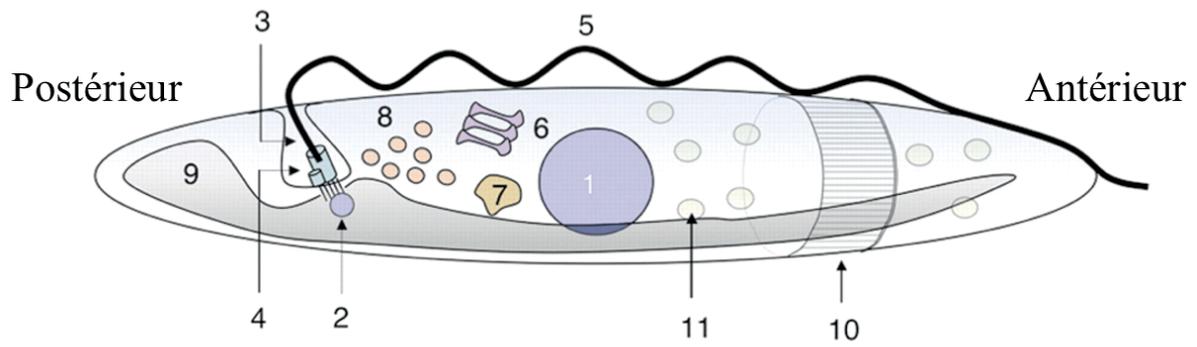
1.2 Caractéristiques cellulaires des trypanosomes africains

1.2.1 Le modèle *Trypanosoma brucei*

Depuis 2005, le génome complet de *T. brucei* a été séquencé, permettant ainsi d'étudier les voies métaboliques de ce parasite (Berriman, Ghedin et al. 2005). Les différents génomes des Trypanosomatidae qui ont été séquencés sont disponibles dans la base de données TriTrypDB (<http://TriTrypDB.org>) depuis 2009. Cette base de données, issue de la collaboration de l'EuPathDB (Eukaryotic Pathogen Bioinformatics Resource Center) des universités de Pennsylvanie et Géorgie, le groupe GeneDB de l'institut Wellcome Trust Sanger et des chercheurs de l'institut de Recherche Biomédicale de Seattle, permet d'intégrer les données d'annotation des génomes, les données de protéomique, etc. (Aslett, Aurrecochea et al. 2010). Ces parasites peuvent être efficacement transfectés par électroporation, ce qui a permis le développement d'outils de génétique inverse permettant, entre autres, l'étude du métabolisme de *T. brucei*. Ainsi, l'ARN interférence (ARNi) est devenu une technique majeure pour générer des mutants (cette approche n'est applicable ni chez *T. cruzi* ni chez les leishmanies de l'ancien monde) et la délétion de gènes par recombinaison homologue ou « knockout » est également très utilisée.

Cinq marqueurs de sélection sont disponibles, ce qui permet de générer des simples, doubles, voir triples mutants (ten Asbroek, Mol et al. 1993, Tschudi, Djikeng et al. 2003). Par ailleurs, la culture *in vitro* des formes sanguines et de la forme procyclique est relativement facile et il est possible de réaliser des cycles complets chez l'insecte et le mammifère.

En laboratoire, l'espèce la plus étudiée est *T. brucei brucei*. Pathogène des animaux mais pas de l'homme, son génome est quasiment identique aux espèces responsables d'infections humaines, à l'exception notamment du gène codant pour la protéine de résistance au sérum humain (SRA, serum resistance-associated protein) exprimé par *T. brucei rhodesiense* (Xong, Vanhamme et al. 1998) et du gène codant pour la glycoprotéine spécifique de *T. b. gambiense* (TgsGP, *T. b. gambiense*-specific glycoprotein) (Uzureau, Uzureau et al. 2013). Chez l'homme, l'immunité contre les trypanosomes africains est due à deux complexes présents dans le sérum, TLF-1 et TLF-2 (Trypanolytic Factors). Les deux TLF possèdent les deux protéines HPR (haptoglobin-related protein) et APO-L1 (apolipoprotein LI). L'HPR est capable de fixer l'hémoglobine (Hb) ce qui permet l'entrée de TLF-1 dans les trypanosomes *via* l'interaction avec le récepteur TbHpHbR du parasite. L'entrée du TLF-2 est indépendante de ce récepteur (Uzureau, Uzureau et al. 2013). L'APO-L1 génère des pores dans la membrane lysosomale, entraînant l'entrée d'ions chlorure et d'eau dans le lysosome depuis le cytosol. Le déficit cytosolique en ion chlorure est compensé par l'import de ces ions depuis le milieu extracellulaire à travers la membrane plasmique. Une fois initié, ce processus conduit irréversiblement à la mort du parasite (Vanhollebeke and Pays 2010). Chez *T. brucei rhodesiense*, la neutralisation de l'APO-L1 résulte de l'interaction de cette protéine avec une protéine apparentée aux VSG, appelée SRA, qui est exprimée dans un site d'expression de VSG (Xong et al., 1998). Chez *T. brucei gambiense* le mécanisme de résistance est différent. Cette résistance implique l'expression de TbgsGP qui inhibe la toxicité de l'APO-LI et permet un renforcement des membranes en interagissant avec les lipides. Une activité protéase à cystéine et la substitution d'une leucine par une sérine en position 210 dans le récepteur TbHpHbR contribuent également à cette résistance à APO-L1 (Uzureau, Uzureau et al. 2013). Toutes ces caractéristiques font de *T. brucei brucei* un modèle privilégié pour l'étude des trypanosomatidés pathogènes pour l'homme, tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué, pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux traitements.



- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Noyau | 7. Lysosome |
| 2. Kinétoplaste | 8. Endosomes |
| 3. Poche flagellaire | 9. Mitochondrie |
| 4. Corps basal | 10. Cytosquelette microtubulaire |
| 5. Axonème et tige paraflagellaire | 11. Glycosomes |
| 6. Golgi | |

Figure 7 : *Architecture de Trypanosoma brucei*

D'après Matthews et al., 2005

1.2.2 Architecture cellulaire

La structure générale des formes sanguines et de la forme procyclique du trypanosome est similaire. La cellule est allongée (15 µm de long sur 2 µm de large pour les formes sanguines ; 20-25 µm de long sur 3-5 µm de large pour la forme procyclique) et possède un cytosquelette microtubulaire hautement polarisé, qui permet de définir sa forme et de conserver son intégrité au cours du cycle cellulaire. Les organelles uniques de la cellule sont précisément positionnés dans ce cytosquelette, entre les parties centrale et postérieure du trypanosome (Robinson, Sherwin et al. 1995).

La mobilité du trypanosome est assurée par un unique flagelle, composé d'un axonème conventionnel (9 microtubules périphériques + 2 centraux) associé à une tige paraflagellaire (Vaughan and Gull 2003). Ce flagelle est attaché au corps cellulaire par un filament et un ensemble de 4 microtubules provenant du corps cellulaire, formant ainsi la zone d'attachement du flagelle (FAZ, *Flagellar Attachment Zone*). Le flagelle s'entoure de manière lévogyre autour de la cellule, entraînant un déplacement de la cellule en « vrille ». L'extrémité distale du flagelle est libre et définit la partie antérieure de la cellule. Le point de sortie du flagelle dans la partie postérieure de la cellule est appelé poche flagellaire. Cette invagination de la membrane plasmique est l'unique site d'endo- et d'exo-cytose (Overath and Engstler 2004). Ce lieu d'échange prend notamment son importance chez les formes sanguines dans le recyclage des VSG, afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

Le flagelle prend son origine au niveau du corps basal, juste sous la poche flagellaire. Ce corps basal est lié au génome mitochondrial contenu dans le kinétoplaste, par un complexe d'attachement composé d'une série de filaments (Ogbadoyi, Robinson et al. 2003). Ces filaments servent de guide pour la ségrégation du génome mitochondrial, la réplication et la ségrégation du corps basal et du flagelle (Gull 2003).

Les trypanosomes possèdent les organites habituellement retrouvés chez les eucaryotes. Le noyau est situé au centre de la cellule. Entre ce noyau et la poche flagellaire se trouve l'unique appareil de Golgi, les endosomes, le lysosome et le réticulum endoplasmique.

Ils possèdent également des compartiments cellulaires particuliers. Ainsi, la plupart des enzymes de la glycolyse sont compartimentalisées dans les glycosomes, organelles apparentés aux peroxysomes (Opperdoes and Borst 1977). Ces organelles sont délimités par une bicouche phospholipidique et ne contiennent pas de génome (Hart, Misset et al. 1984). Les glycosomes renferment également des enzymes de la voie des pentoses phosphates (Heise and Opperdoes 1999), du métabolisme des purines (Berens, Krug et al. 1995), etc. (Colasante, Ellis et al. 2006).

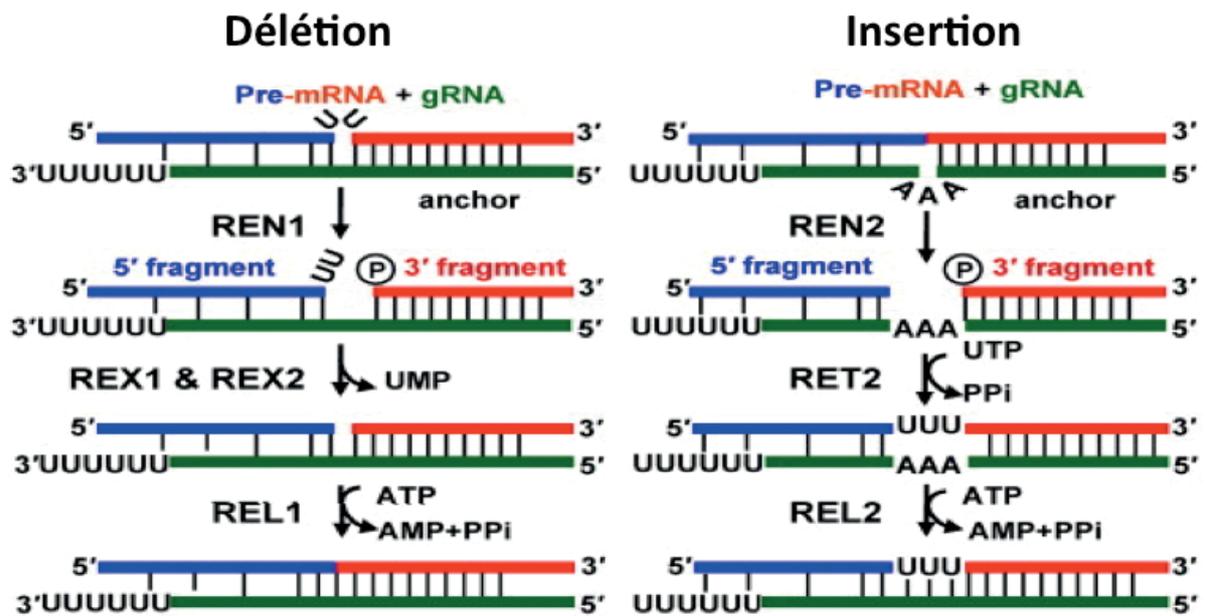


Figure 8 : mécanisme d'édition de l'ARN (ou « RNA editing »)

D'après Aphasizhev et al., 2011

Les acidocalcisomes sont impliqués dans le stockage des cations et du phosphate, la régulation du pH et de l'osmolarité cellulaire (Docampo, de Souza et al. 2005).

L'unique mitochondrie, de forme tubulaire, s'étend de la partie postérieure à la partie antérieure de la cellule. Chez les procycliques, la mitochondrie est très développée et ramifiée avec un métabolisme mitochondrial étant très actif (Fig. 7).

1.2.3 Le génome

1.2.3.1 Génome mitochondrial et édition d'ARN

Le génome mitochondrial kinétoplastique de *T. brucei* est composé de deux types de molécule d'ADN : les minicercles et les maxicercles (Simpson, Neckelmann et al. 1987) représentant 10 à 20% de l'ADN total des trypanosomes. Ce génome contient 30 à 50 maxicercles d'environ 20 kb chacun, codant pour deux ARNr mitochondriaux et 17 protéines mitochondriales, dont la plupart des ARNm subissent des modifications post-transcriptionnelles *via* le mécanisme d'édition des ARN ou « RNA editing » (Stuart, Schnaufer et al. 2005, Hajduk and Ochsenreiter 2010, Aphasizhev and Aphasizheva 2011). Les 5000 à 10000 minicercles d'environ 1 kb chacun, codent pour de petits ARN guides (ARNg) servant de matrice pour l'édition des transcrits provenant des maxicercles (Sturm and Simpson 1990). Le terme « RNA editing » a été introduit par Benne et al. pour décrire l'insertion post transcriptionnelle de quatre uridines dans l'ARNm de la sous unité 2 de la cytochrome c oxydase (Benne, Van den Burg et al. 1986). Les études qui ont suivi ont montré que ce mécanisme impliquait la délétion ou l'insertion de résidus uridine dans les ARNm codés par les maxicercles. Les ARNg permettent de véhiculer les informations entre les minicercles et les maxicercles pour déclencher le mécanisme d'édition (Blum, Bakalara et al. 1990, Sturm and Simpson 1990) (Fig. 8). La réaction est initiée par l'hybridation de l'ARNg sur l'ARN pré-messager (pré-ARNm) correspondant, juste en aval du site à éditer. La reconnaissance s'effectue par un appariement de Watson-Crick. L'édition de l'ARN fait ensuite appel à un complexe protéique, le RECC (RNA editing core complex). Une endonucléase (REN1 ou 2) va cliver le pré-ARNm en amont de la boucle formée par l'ARNg. Les résidus uridine non appariés sont excisés par une exonucléase (REX1 ou REX2). Alternativement, une TUTase (RET2) peut ajouter des résidus uridine. La dernière étape, effectuée par une ligase (REL1 ou 2), consiste à ligaturer les fragments d'ARNm (Panigrahi, Gygi et al. 2001, Panigrahi, Schnaufer et al. 2001, Panigrahi, Schnaufer et al. 2003). L'édition s'effectue progressivement de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' de l'ARNm et requiert plusieurs ARNg (Maslov and Simpson 1992).

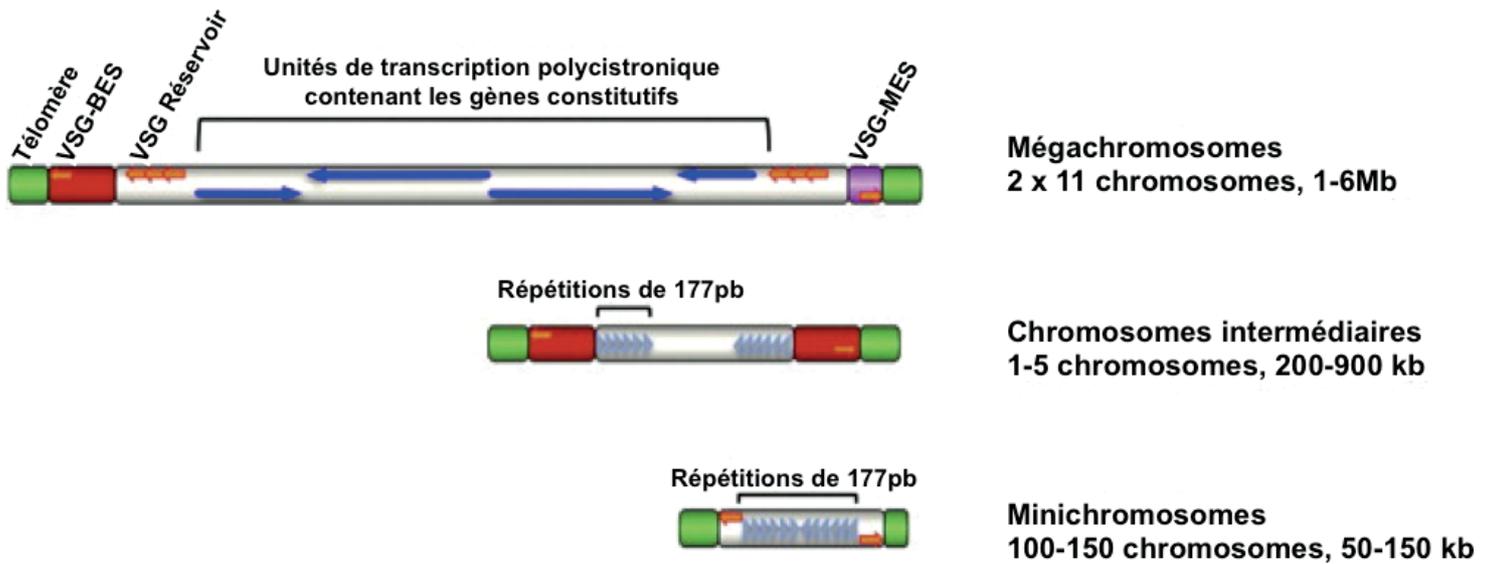


Figure 9: Représentation schématique de l'organisation des chromosomes de *T. brucei*

D'après Ersfeld et al., 2011

Sur le schéma, les flèches oranges représentent les gènes et pseudogènes de VSG silencieux et les flèches bleues représentent les unités de transcription polycistronique contenant les gènes de ménage. Les répétitions hexamériques télomériques (TAAGGG) sont représentées en vert. Abréviations : BES, site d'expression des formes sanguines (rouge); MES, site d'expression de la forme métacyclique (Violet); VSG, variant surface glycoprotein.

Beaucoup de gènes des maxicercles ne possèdent pas de cadre ouvert de lecture (ORF, open reading frame) nécessaire à la production des protéines mitochondriales impliquées dans le transport des électrons et la phosphorylation oxydative. L'éditing permet la formation de codons d'initiation et/ou la création d'ORF complets par des insertions et des délétions de résidus uridine dans les ARNm (Ochsenreiter and Hajduk 2008). De plus, l'éditing permet l'obtention de divers ARNm à partir d'un seul gène (Koslowsky, Bhat et al. 1990, Souza, Myler et al. 1992, Ochsenreiter and Hajduk 2006), permettant ainsi de moduler le métabolisme mitochondrial en fonction du stade de développement du parasite : on parle d'éditing alternatif des ARNm.

1.2.3.2 Génome nucléaire

Le noyau, d'un diamètre de 2,5 μm , contient un seul large nucléole de 0,5 à 1 μm de diamètre (Ersfeld, Melville et al. 1999). Le génome haploïde de *T. brucei* est composé d'environ 35 Mb. Il contient environ 10000 gènes dont un millier codant pour les VSG (El-Sayed, Myler et al. 2005).

Le génome nucléaire de *T. brucei* contient plus d'une centaine de chromosomes (Van der Ploeg, Cornelissen et al. 1984, Ersfeld, Melville et al. 1999) classés en 3 tailles selon leur migration en électrophorèse en champ pulsé (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis) : 11 grands chromosomes diploïdes de 1 à 6 Mb, entre 1 et 5 chromosomes intermédiaires de 200 à 900 kb et une centaine de minichromosomes de 50 à 150 kb (Fig. 9). La ploïdie des chromosomes intermédiaires et des minichromosomes est inconnue. (El-Sayed, Hegde et al. 2000). Les extrémités télomériques de ces 3 types de chromosomes sont composées de séquences hexamériques répétées ('5'-TTAGGG-3') de longueur variable.

Les megachromosomes sont principalement composés d'un domaine central contenant la plupart des gènes constitutifs flanqué de régions sub-télomériques contenant les sites d'expression des VSG. Ces derniers sont précédés par de grandes régions sub-télomériques (jusqu'à plusieurs centaines de kb) contenant principalement des gènes et pseudogènes de VSG, qui constituent le répertoire de VSG utilisés lors de la variation antigénique. Sur les 806 gènes VSG identifiés dans les sub-télomères, seuls 7% sont fonctionnels et 66% sont des pseudogènes (Berriman, Ghedin et al. 2005). Les chromosomes intermédiaires sont composés d'un domaine central entouré de séquences sub-télomériques répétées de 177 pb (Wickstead, Ersfeld et al. 2004). Ils contiennent également des sites d'expression des VSG (Van der Ploeg, Cornelissen et al. 1984). Enfin, les minichromosomes sont composés de séquences répétées de 177 pb à structure palindromique à inversion centrale, représentant 55% de la structure de ces chromosomes.

Des éléments sub-télomériques non répétés sont retrouvés et incluent des pseudogènes VSG (Weiden, Osheim et al. 1991, Zomerdijk, Kieft et al. 1992, Alsford, Wickstead et al. 2001, Wickstead, Ersfeld et al. 2004).

Chez le trypanosome, la plupart des gènes sont transcrits constitutivement par une ARN polymérase II. Les régulations s'effectuent donc au niveau post-transcriptionnel (Horn 2001, Clayton 2002).

1.2.3.3 Régulation de l'expression génétique

1.2.3.3.1 Transcription des gènes

A. Les ARN polymérases

Les cellules eucaryotes possèdent 3 classes d'ARN polymérase. L'ARN polymérase I est impliquée dans la synthèse des ARN ribosomiaux (ARNr). L'ARN polymérase II est spécifique des ARN messagers (ARNm) et l'ARN polymérase III des ARN de transfert (ARNt).

Chez les trypanosomes, la polymérase I ne transcrit pas uniquement les ARNr, elle peut synthétiser les ARNm des VSG et de la procycline (Rudenko, Chung et al. 1991, Zomerdijk, Kieft et al. 1991). Quatre promoteurs peuvent donc recruter l'ARN polymérase I : le promoteur des ARNr, le promoteur du site d'expression des VSG, le promoteur des VSG des formes métacycliques et le promoteur de la procycline (Vanhamme, Pays et al. 1995). Le seul terminateur connu, reconnu par la polymérase I, est celui de la procycline (Berberof, Pays et al. 1996)

L'ARN polymérase II génère des ARNm polycistroniques correspondant à des unités de transcription de grande taille (jusqu'à plusieurs centaines de kb) à partir de promoteurs dont la séquence ou la structure n'est pas connue. Le seul promoteur identifié pour la polymérase II est celui de l'ARN splice leader (voir mécanisme du *trans*-épissage). L'ARN polymérase II transcrit également de petits ARN nucléaires (snRNA, « small nuclear RNA ») (Dunbar, Chen et al. 2000, Xu, Liu et al. 2001).

L'ARN polymérase III transcrit les ARNt et quelques snRNA. Les promoteurs sont similaires à ceux retrouvés chez d'autres eucaryotes (Fantoni, Dare et al. 1994, Xu, Liu et al. 2001).

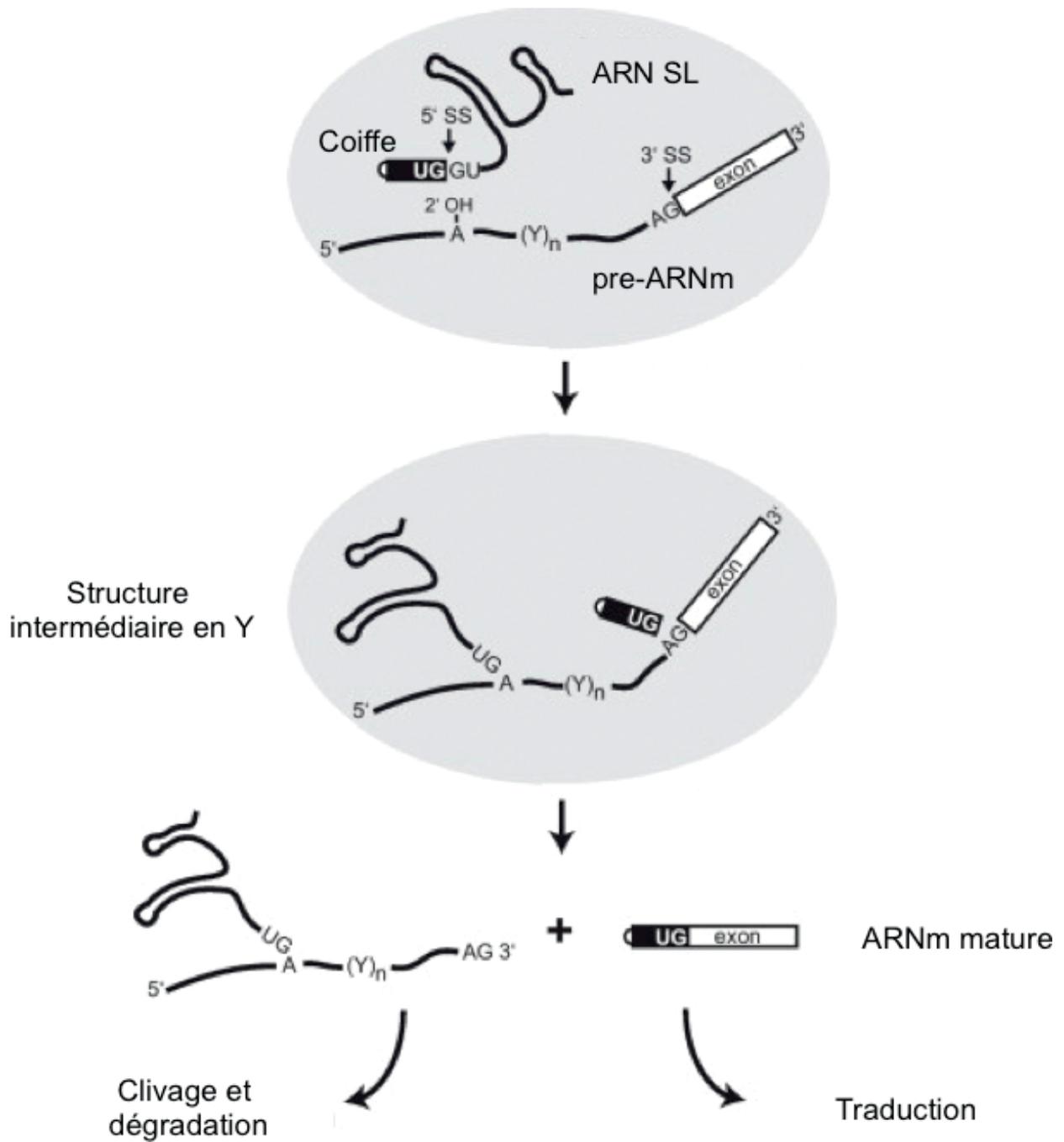


Figure 10 : Mécanisme de trans-épissage des ARNm

D'après Preußer et al., 2012

B. Les histones

Chez les trypanosomes, on retrouve les histones habituellement présentes chez les eucaryotes (H1, H2A, H2B, H3, H4) mais elles sont très différentes de celles des autres organismes. On note ainsi des acétylations et méthylation de lysines sur H4 (da Cunha, Nakayasu et al. 2006, Mandava, Fernandez et al. 2007) et la présence de N-méthylalanine dans les régions N-terminales de H2A, H2B et H4 (Janzen, Fernandez et al. 2006). Ces particularités pourraient générer une modification de la conformation de la chromatine, nécessaire à l'initiation de la transcription (Figueiredo, Cross et al. 2009, Talbert and Henikoff 2009). Une étude a montré que les variants d'histones H3V et H4V, uniquement identifiés chez les trypanosomatidés, sont enrichis aux sites de terminaison de transcription pour l'ARN polymérase II (Siegel, Hekstra et al. 2009).

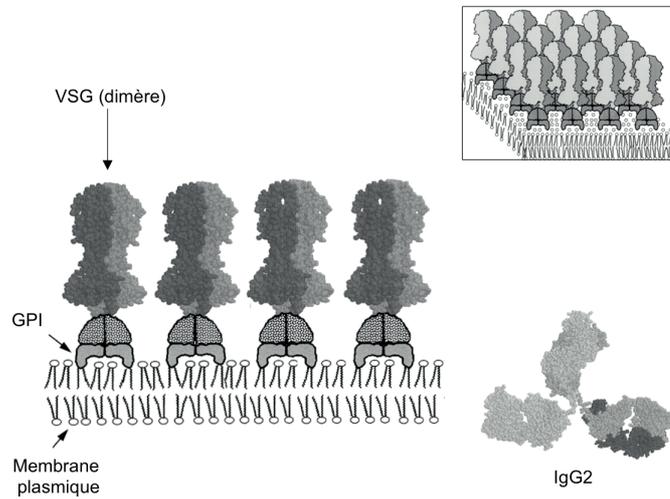
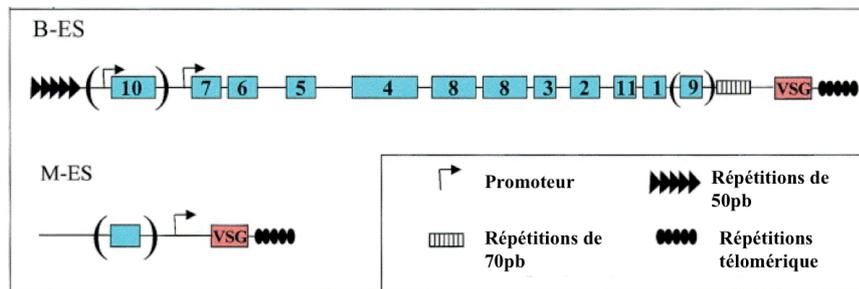
1.2.3.3.2 Régulation post-transcriptionnelle

A. Maturation des ARNm cytosolique : le *trans*-épissage

A l'exception d'un seul gène codant pour une ARN polyA polymérase (Mair, Shi et al. 2000), aucun des gènes codant pour des protéines ne possède d'introns (Schneider, Martin et al. 1994). La maturation des ARNm, à partir des pré-ARNm issue de l'expression polycistronique, s'effectue par un mécanisme de *trans*-épissage décrit pour la première fois chez les trypanosomes (Agabian 1990). Lors de ce processus, une séquence de 39 nucléotides appelée « splice leader » ou « mini-exon » (SL), se terminant par une coiffe composée de 4 résidus guanine méthylés, est ajoutée en 5' du pré-ARNm (Ullu and Tschudi 1991). Simultanément, une queue polyA est ajoutée en 3' pour donner un ARNm mature. La coiffe est impliquée dans des processus de transport des ARN et d'initiation de la traduction (Liang, Liu et al. 2003, Günzl 2010) (Fig. 10).

1.2.4 La variation antigénique

Les formes du parasite retrouvées dans la circulation sanguine (la forme métacyclique injectée lors du repas sanguin et les formes sanguines circulantes) ont une capacité de modifier la nature antigénique de leur surface, par un mécanisme de variation antigénique. La variation antigénique permet aux parasites d'échapper au système immunitaire de l'hôte mammifère en modifiant constamment la composition du manteau constitué d'une glycoprotéine de surface, la VSG (Variable Surface Glycoprotein), protéine de 550 acides aminés attachée à la membrane plasmique par une ancre c-terminale de type GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (Fig. 11A).

A**B****Figure 11**

A, Représentation schématique du manteau de VSG. Les VSG sont attachés à la membrane plasmique grâce à l'ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol) ajoutée à leur extrémité C-terminale. L'encart en haut à droite de la figure est une représentation tridimensionnelle de l'organisation des VSG à la surface de la membrane des trypanosomes. L'espace restreint entre les dimères de VSG permet de masquer les autres protéines membranaires qui ne sont pas accessibles aux anticorps, tel que l'IgG2 représenté en bas à droite. (D'après Borst et al., 1998)

B, Structure des sites d'expression des VSG Les sites d'expression des formes sanguines (BES) sont de longues unités polycistroniques contenant jusqu'à 12 gènes associés au site d'expression (ESAG, expression site associated genes) d'environ 60 kb. Les BES sont télomériques et se terminent par les répétitions hexamériques télomériques. Des répétitions de 50 bp sont également présentes à l'extrémité 5' des BES. Le gène VSG est toujours le dernier gène de l'unité et séparé des ESAG par une série de répétitions de 70 pb. Les gènes entre parenthèses sont uniquement présents dans certains BES. Les sites d'expression des formes métacycliques (MES) sont des unités monocystroniques de quelques kb. (D'après Vanhamme et al., 2001)

Les formes présentes chez l'insecte n'expriment pas la VSG, mais sont recouverts de protéines invariantes, les procyclines, qui leur confèrent une protection contre l'environnement du tube digestif de la glossine (Gruszynski, DeMaster et al. 2003).

La VSG se présente sous forme d'un dimère perpendiculaire à la membrane de la cellule. La partie N-terminale est très variable mais la structure est identique. La partie C-terminale est conservée et très peu accessible au milieu extracellulaire. On estime à 10 millions le nombre de VSG identiques exprimées à la surface de la cellule. Un seul gène *VSG* est exprimé à un instant donné, parmi un répertoire d'un millier (Vanhamme, Pays et al. 1995, Barry 1997). Ces gènes sont localisés à proximité des télomères des 3 types de chromosomes et tout particulièrement dans les régions sub-télomériques des mégachromosomes. Les gènes exprimés sont situés dans des régions proches des télomères appelées VSG-BES (Bloodstream Expression Site) ou VSG-MES (Metacyclic Expression Site), en fonction du stade durant lequel les sites d'expression sont activés. Bien qu'il existe une vingtaine de VSG-MES et au moins une vingtaine de VSG-BES, un seul est actif à la fois (Longacre, Hibner et al. 1983, Navarro and Gull 2001, Pays, Lips et al. 2001) (Fig. 11B). Les mécanismes d'expression des VSG sont résumés dans la figure 12.

1.2.5 L'ARN interférence

1.2.5.1 Découverte de l'ARN interférence

En 1990, Napoli et al observent que des pétunias transgéniques exprimant plusieurs copies du gène codant pour la chalcone synthétase (*chsA*), responsable de la production de pigments pourpres, présentaient une réduction de la pigmentation (Napoli, Lemieux et al. 1990). Une analyse approfondie révéla une diminution dramatique de l'ARNm de *chsA* sans que la transcription ne soit affectée. On parle alors d'extinction post-transcriptionnelle des gènes (« Post-Transcriptional Gene Silencing » ou PTGS).

Plus tard, des études montrèrent que l'initiation du PTGS chez les plantes est due à la formation d'ARNdb résistants aux ribonucléases et provenant du transgène (Metzlaff, O'Dell et al. 1997, Hamilton and Baulcombe 1999, Pandolfini, Molesini et al. 2003). Des phénomènes similaires ont été décrits chez les plantes dans la défense contre des infections virales (Dougherty and Parks 1995) ou encore chez les champignons avec le phénomène de « quelling » (étouffement).

Le principe de l'ARN interférence a été établi en 1998 par Fire. Il découvrit que l'injection d'ARN double brin chez *Caenorhabditis elegans* entraînait l'inhibition de l'expression du gène correspondant de manière systématique et héréditaire (Fire, Xu et al. 1998).

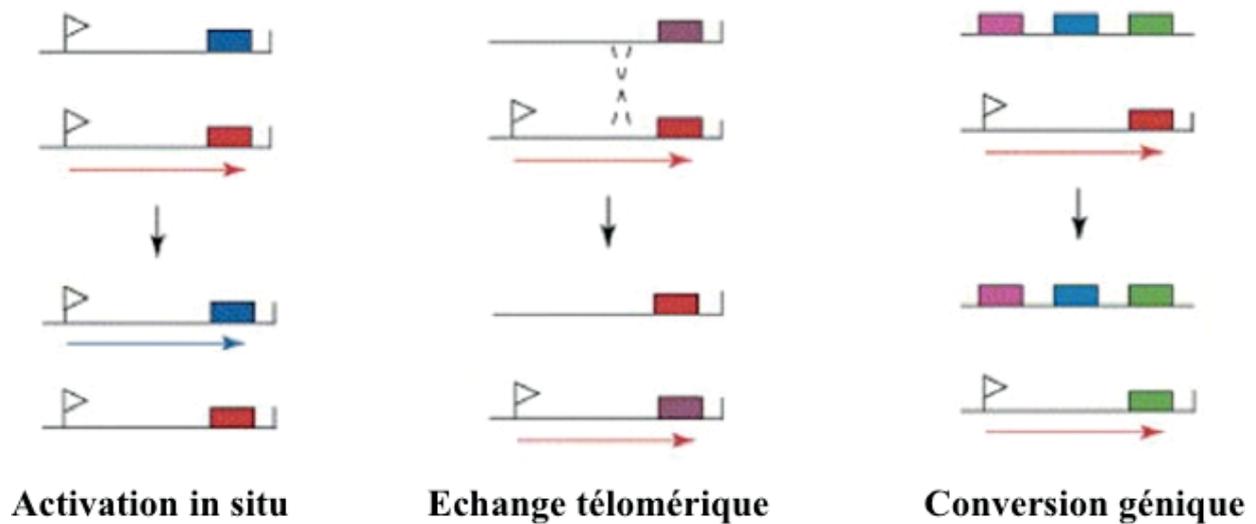


Figure 12 : Régulation de l'expression des gènes VSG

L'activation in situ ne fait pas intervenir de réarrangement dans le site d'expression. Un nouveau site d'expression VSG est activé, l'ancien est désactivé.

L'échange télomérique, rare, fait intervenir un simple « crossing over » entre les régions en amont de deux VSG.

La conversion génique consiste au remplacement d'un gène codant une VSG au sein d'un site d'expression, par un gène codant une autre VSG.

Le drapeau représente un promoteur.

Dans les mois et les années qui suivirent, ce phénomène fut démontré chez d'autres organismes comme *T. brucei* (Ngô, Tschudi et al. 1998), la paramécie (Ruiz, Vayssié et al. 1998, Galvani and Sperling 2001), la drosophile (Kennerdell and Carthew 1998), l'hydre (Lohmann, Endl et al. 1999) et aussi chez des vertébrés tels que le poisson-zèbre (Wargelius, Ellingsen et al. 1999), la souris (Svoboda, Stein et al. 2000, Wianny and Zernicka-Goetz 2000) et l'homme (Elbashir, Harborth et al. 2001).

1.2.5.2 Fonctions et applications de l'ARN interférence

Le phénomène de l'ARNi a de multiples fonctions au niveau cellulaire, notamment dans la protection du génome pour en maintenir l'intégrité, se défendre contre les infections virales et éviter des conséquences néfastes des transpositions d'éléments mobiles (Plasterk 2002, Girard and Hannon 2008, Ketting 2011). D'autre part les miR (microARN), petits ARN double brins non codants retrouvés chez de nombreux organismes, sont impliqués *via* le phénomène d'ARNi dans de nombreux processus : régulation du développement et de la physiologie d'organismes pluricellulaires (Ambros 2004, He and Hannon 2004), temps de floraison et forme des feuilles chez *A. thaliana*, asymétrie neuronale chez *C. elegans*, prolifération des cellules dans le développement chez la drosophile (Ambros 2004, He and Hannon 2004), processus de différenciation hématopoïétique chez les mammifères (Chen, Li et al. 2004), etc. Par ailleurs, le potentiel thérapeutique de l'ARN interférence est l'objet de nombreuses études. Ce processus pourrait notamment être utilisé pour cibler l'expression de gènes impliqués dans certaines maladies. Ainsi, des recherches ont montré que l'injection d'ARNdb chez des souris adultes bloquait efficacement l'expression d'une protéine du virus de l'hépatite C (McCaffrey and Kay 2002) ou du virus de l'hépatite B (McCaffrey, Meuse et al. 2003).

1.2.5.3 Mécanisme général

L'ARN double brin va dans un premier temps être fragmenté par le complexe Dicer (Bernstein, Caudy et al. 2001), une ribonucléase de type III, qui va le cliver en siRNAs (« short interfering RNA »), petits ARN db d'environ 21 paires de bases. Ces siRNAs sont ensuite incorporés sous leur forme simple brin dans le complexe ribonucléoprotéique RISC (RNA induced RNAi Complex). Le brin anti-sens du siRNA sert alors de guide au complexe RISC pour cibler spécifiquement l'ARNm correspondant (Hammond, Bernstein et al. 2000, Elbashir, Martinez et al. 2001). Cet appariement induit la dégradation de l'ARNm par l'activité ribonucléasique de RISC. Parmi les constituants de RISC figure une protéine de la famille argonaute (AGO).

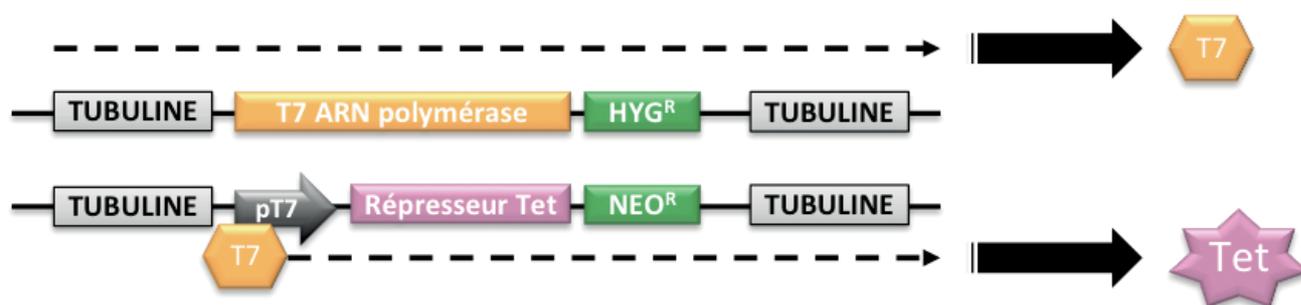


Figure 13 : La souche EATRO1125.T7T

Cette souche a été générée en transfectant la lignée EATRO1125 avec d'une part le plasmide pHD328 contenant le gène de l'ARN polymérase du phage T7 et le gène de résistance à l'HygromycineB (HYG^R); d'autre part, le plasmide pLew114 contenant le gène du répresseur tétracycline et le gène de résistance à la néomycine (NEO^R) sous la dépendance du promoteur de l'ARN polymérase T7 (pT7). Ces « cassettes » sont intégrées dans le locus de la tubuline.

1.2.5.4 L'ARNi chez *Trypanosoma brucei*

Chez *T. brucei*, deux homologues de Dicer ont été identifiés : *TbDCL1* (Shi, Tschudi et al. 2006) et *TbDCL2* (Patrick, Shi et al. 2009). *TbDCL2*, protéine nucléaire, sert de première ligne de défense contre les ARNdb provenant des rétroposons et des séquences répétées, tandis que dans le cytoplasme, *TbDCL1* va prendre en charge les petits ARNdb générés par *TbDCL2* et les ARNdb exogènes.

TbAGO1, protéine de la famille argonaute, est essentielle au mécanisme de RNAi (Durand-Dubief and Bastin 2003). Elle permet le clivage de l'ARNm. Deux autres intervenants ont récemment été identifiés : les RNA Interference Factors 4 et 5 (*TbRIF4* et *TbRIF5*) (Barnes, Shi et al. 2012). *TbRIF4* est une 3' -5' exonucléase et joue un rôle critique dans la conversion double-brins/simple-brin des siRNAs permettant ainsi la formation du complexe AGO1-siRNA. *TbRIF5* est essentielle pour le mécanisme d'ARN interférence cytoplasmique et semble agir comme un cofacteur de DCL1.

L'analyse du génome et les recherches expérimentales menées sur *T. cruzi* (DaRocha, Otsu et al. 2004), *Leishmania major* et *Leishmania donovani* (Robinson and Beverley 2003) ont révélé l'absence de voie fonctionnelle de l'ARNi. En revanche, l'existence de ce phénomène a été mise en évidence chez *L. (Viannia) braziliensis* (Lye, Owens et al. 2010). La connaissance approfondie du mécanisme de l'ARNi chez *T. brucei* pourrait permettre de reconstruire cette voie chez *T. cruzi* et les leishmanies (Kolev, Tschudi et al. 2011).

Deux systèmes plasmidiques permettant une expression conditionnelle d'ARNdb ont été développés chez *T. brucei*. Utilisés dans une souche modifiée exprimant l'ARN polymérase du phage T7 et un répresseur à la tétracycline dont le gène est dépendant d'un promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 (Fig. 13), l'expression d'ARNdb sera conditionnée à l'ajout de tétracycline. En absence de cet antibiotique, le répresseur à la tétracycline se fixe aux opérateurs de la tétracycline situés entre le promoteur de transcription et la séquence d'intérêt (voir Fig. 14) et empêche l'ARN polymérase du phage T7 de transcrire la cassette produisant l'ARNdb (Wirtz, Leal et al. 1999). Lors de l'ajout de tétracycline, le répresseur à la tétracycline ne se fixe plus aux opérateurs et l'ARNdb peut être transcrit. Ces vecteurs linéarisés peuvent s'intégrer par recombinaison homologue de façon stable dans le génome du parasite.

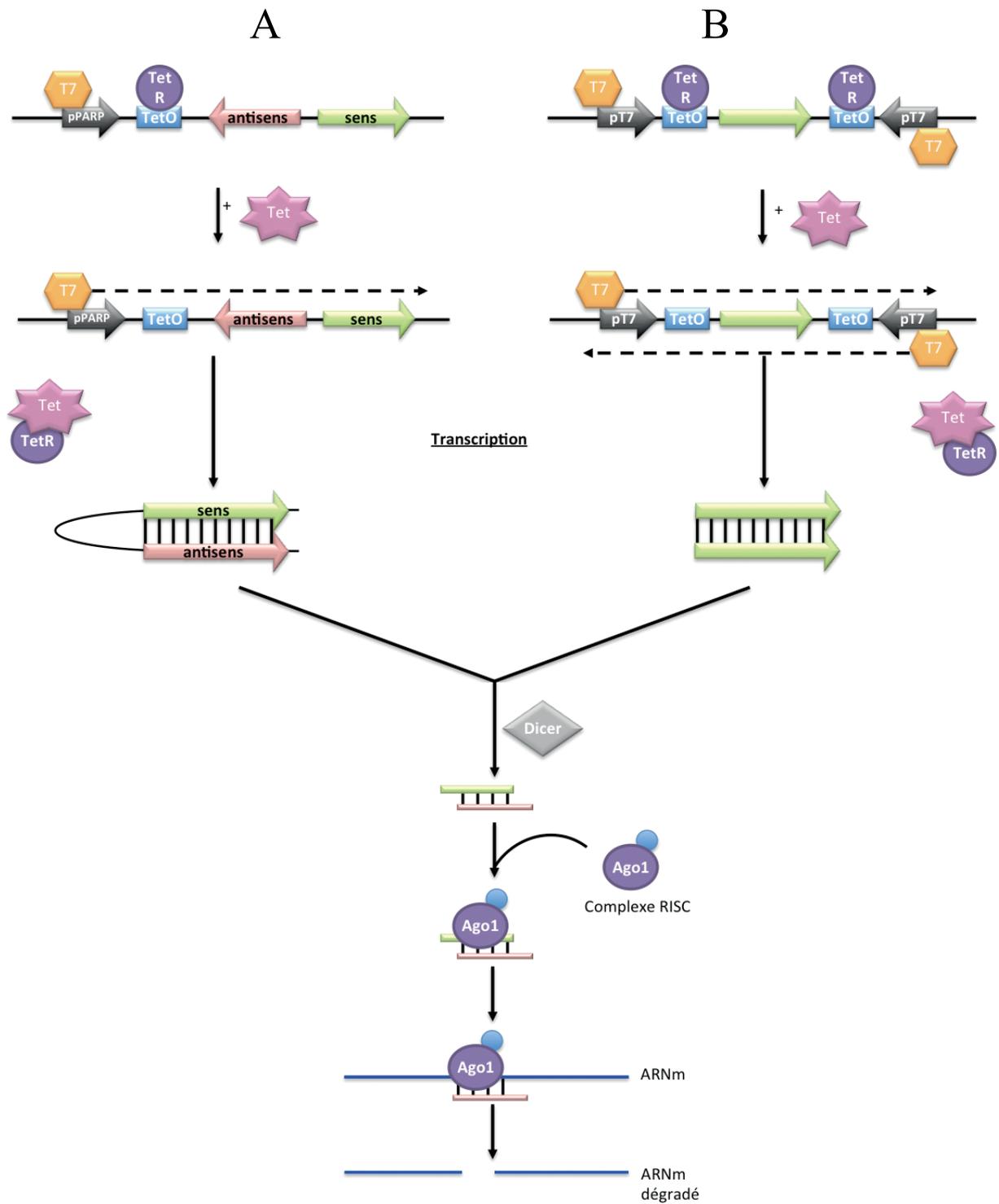


Figure 14 : Principe de l'ARN interférence chez *Trypanosoma brucei*

A, vecteur simple promoteur (pLew100, pHD1336)

B, vecteur double promoteur (p2T7-177)

A Les vecteurs à simple promoteur

Les pLew, pH_D, etc. sont des vecteurs dans lesquels un fragment sens et un fragment anti-sens du gène ciblé, séparés par une cinquantaine de pb, sont insérés en aval d'un promoteur unique.

L'ARN qui sera produit formera un double brin par appariement : cette structure est appelée *tige-boucle* (Fig. 14A).

B Les vecteurs à doubles promoteurs

Les pZJM et p2T7ti, quant à eux, possèdent deux promoteurs de l'ARN polymérase du phage T7 en sens opposés. Entre ces deux promoteurs est inséré un fragment (~500 pb) du gène ciblé. Ainsi, l'ARN polymérase du phage T7 synthétise deux transcrits complémentaires qui formeront l'ARNdb (Fig. 14B). Pour gagner en efficacité, des cassettes sens et anti-sens peuvent également être exprimées dans ces vecteurs, avec cependant une augmentation des risques de fuite (expression de la cassette en absence de tétracycline).

Quelque soit le système utilisé, l'un des problèmes fréquemment rencontré est la « fuite » du promoteur de la cassette d'inhibition. Cela conduit à l'expression d'un ARNdb même en absence de tétracycline. Ce phénomène proviendrait de l'insertion de ces cassettes dans des régions transcriptionnellement actives des mégachromosomes. Ainsi, le vecteur p2T7ti-177 a été développé pour s'intégrer dans les minichromosomes, transcriptionnellement silencieux (Wickstead, Ersfeld et al. 2002).

Le phénomène inverse, à savoir l'absence d'extinction en présence de tétracycline, peut également se présenter. La délétion ou « knock-out » du gène peut permettre de contourner ce problème.

Enfin, il est possible que le gène ciblé soit de nouveau exprimé quelques jours après l'induction à la tétracycline, même si l'antibiotique est toujours présent dans le milieu de culture. Les raisons de ces « réversions » ne sont actuellement pas connues, mais il pourrait s'agir d'une perte de l'insert (Chen, Hung et al. 2003), ou de mutations au niveau des promoteurs et des opérateurs (Ullu, Tschudi et al. 2004). Ce phénomène est fréquemment observé lorsqu'un gène essentiel à la croissance est ciblé.

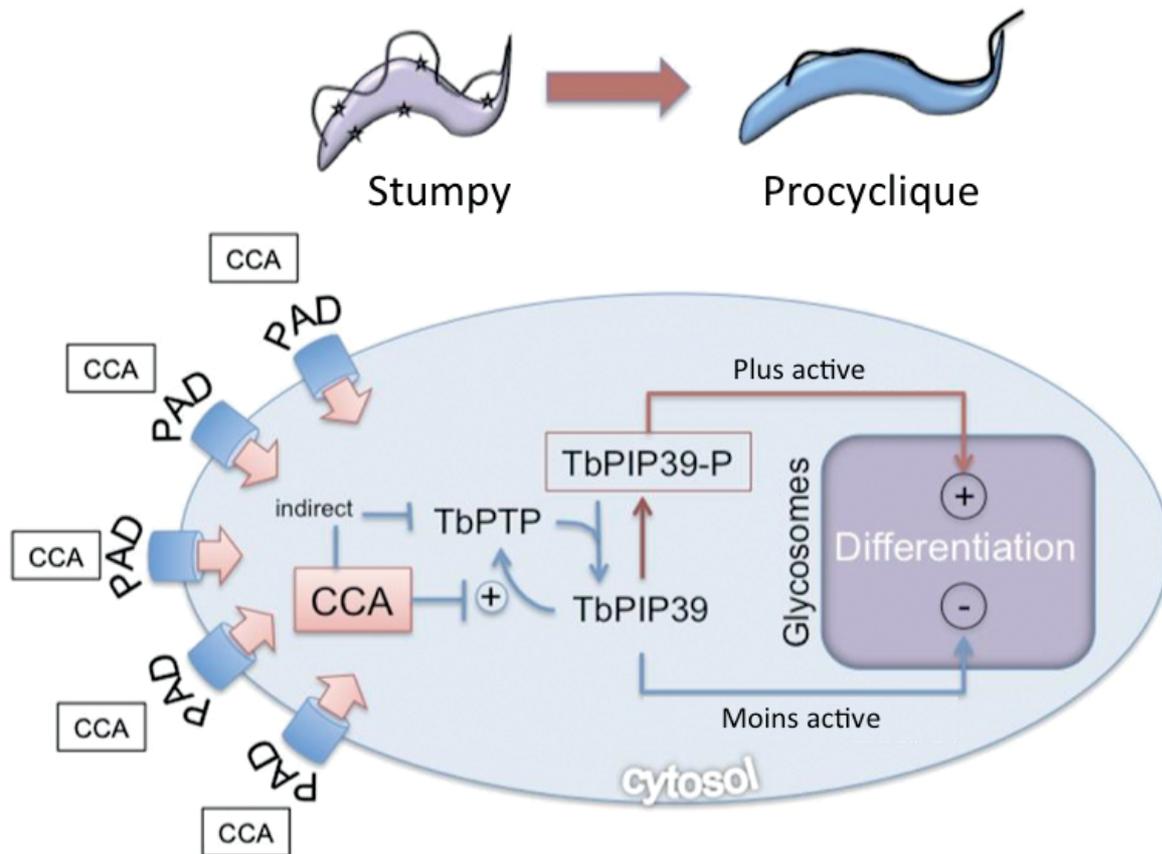


Figure 15 : Modèle d'interaction entre TbPTP1 et TbPIP39 exposés au citrate ou au *cis*-aconitate

D'après Szöör et al., 2010

D'après le modèle basé sur les travaux de Szoor et al., le signal initié par le CCA (Citrate ou *cis*-aconitate) est transduit par les transporteurs PAD, ce qui inhibe l'activation de *TbPTP1* par *TbPIP39*. *TbPTP1* pourrait être inactivée directement par le CCA. Lorsque que *TbPTP1* est inactivée, la forme phosphorylée de *TbPIP39* prédomine et serait transportée vers les glycosomes via son signal C-terminal PTS1, où elle déclencherait les mécanismes de différenciation.

1.2.6 Initiation de la différenciation formes sanguines/procyclique

Les facteurs qui déclenchent la différenciation de la forme sanguine courte et trapue (stumpy) en forme procyclique *in vivo* ne sont pas connus. Néanmoins, *in vitro*, cette transformation est induite par le citrate et le *cis*-aconitate (CCA), deux intermédiaires du cycle de Krebs, en abaissant la température de 37°C à 20°C (Czichos, Nonnengaesser et al. 1986, Engstler and Boshart 2004).

Ce signal est transduit par une famille de transporteurs membranaires, les PAD (Proteins Associated with Differentiation) (Dean, Marchetti et al. 2009).

Récemment, une activité phosphotyrosine phosphatase (*Tb*PTP1) impliquée dans le contrôle de cette différenciation a été identifiée (Szöör, Wilson et al. 2006), associée à l'activité phosphatase de la protéine *Tb*PIP39 (*Tb*PTP1-interacting protein) (Szöör, Ruberto et al. 2010). *Tb*PTP1 inhibe la différenciation des stumpy en forme procyclique (Fig. 15).

1.3 Le métabolisme intermédiaire de *Trypanosoma brucei*

La transition des formes sanguines en forme procyclique de l'insecte s'accompagne d'importantes modifications au niveau du métabolisme énergétique des parasites. Ces derniers doivent ainsi s'adapter au changement d'environnement dans lequel ils se trouvent et aux sources de carbone disponibles. Ne possédant pas de réserves énergétiques, ils sont dépendants des sources carbonées de leurs hôtes.

1.3.1 Métabolisme énergétique de la forme procyclique

Une représentation schématique du métabolisme énergétique de la forme procyclique de *T. brucei* est présentée dans la figure 16.

La proline est l'acide aminé prédominant de l'hémolymphe et des tissus de la glossine. Elle est le principal substrat des muscles du vol chez l'insecte (Bursell, Billing et al. 1973). De ce fait, la proline est considérée comme la principale source de carbone utilisée pour la production d'énergie des formes insectes des trypanosomes (Evans and Brown 1972, Ford and Bowman 1973).

Le milieu axénique semi-synthétique préférentiellement utilisé pour la culture *in vitro* de la forme procyclique est riche en glucose (10 mM) (SDM79, semi defined medium 79) (Brun and Schönenberger 1979).

Dans ces conditions, le glucose devient la principale source de carbone utilisée par la forme procyclique et le métabolisme de la proline est réprimé (Lamour, Rivière et al. 2005,

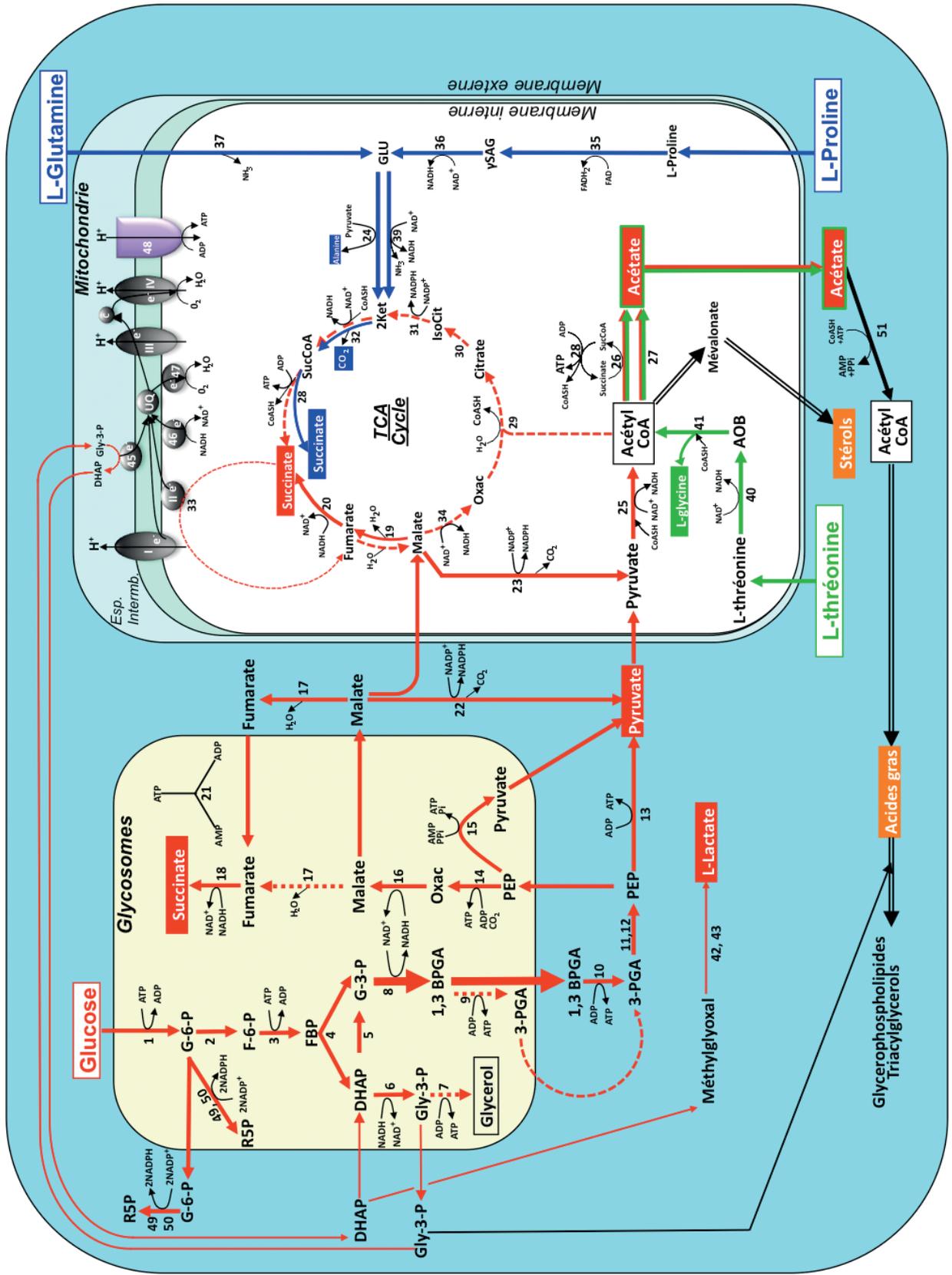


Figure 16: Métabolisme intermédiaire de la forme procyclique de *T. brucei*

Les flèches rouges, vertes et bleues représentent les métabolismes du glucose, de la thréonine et de la proline (et glutamine). Les produits excrétés sont représentés en caractères blancs sur un fond de la couleur correspondant à la source de carbone d'origine. Le glycosome est représenté en jaune. La matrice (en blanc), la membrane interne (en vert), la membrane externe (représentée par une ligne noire) et l'espace intermembranaire (en vert) de la mitochondrie sont représentés. Les flèches en trait plein représentent les étapes enzymatiques. Les flèches pointillées symbolisent les étapes hypothétiques et les flèches en double trait représentent les étapes de la biosynthèse *de novo* des acides gras et des stérols.

Abréviations : 1,3BPGA, 1,3-bisphosphoglycérate; 3-PGA, 3-phosphoglycérate. ADP, adénosine diphosphate; AMP, adénosine monophosphate; AOB amino oxobutyrate ATP, adénosine triphosphate; C, cytochrome c; CoASH, coenzyme A; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; F-6-P, fructose-6-phosphate; FAD, Flavine adénine dinucléotide; FBP, fructose-1,6-bisphosphate; G-3-P, glyceraldehyde-3-phosphate; G-6-P, glucose-6-phosphate; GLU, glutamate; Gly-3-P, glycerol-3-phosphate; IsoCit, isocitrate; 2Ket, 2-cétoglutarate; NAD, Nicotinamide adénine dinucléotide; NADP, Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; Oxac, oxaloacétate; PEP, phosphoenolpyruvate; Pi, inorganic phosphate; P_i, pyrophosphate inorganique; R5P, ribose-5-phosphate; γ SAG, glutamate γ -semialdéhyde; SucCoA, succinyl-CoA; UQ, pool ubiquinone. **Enzymes :** 1, hexokinase; 2, glucose-6-phosphate isomérase; 3, phosphofruktokinase; 4, aldolase; 5, triose-phosphate isomérase; 6, glycérol-3-phosphate déshydrogénase; 7, glycérol kinase; 8, glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase; 9, phosphoglycérate kinase glycosomale; 10, phosphoglycérate kinase cytosolique; 11, phosphoglycérate mutase; 12, énoïase; 13, pyruvate kinase; 14, phosphoenolpyruvate carboxylase; 15, pyruvate phosphate dikinase; 16, malate déshydrogénase glycosomale; 17, fumarase cytosolique (et glycosomale); 18, fumarate réductase NADH-dépendante glycosomale; 19, fumarase mitochondriale; 20, fumarate réductase NADH-dépendante mitochondriale; 21, adénylate kinase glycosomale; 22, enzyme malique cytosolique; 23, enzyme malique mitochondriale. 24, alanine aminotransférase; 25, complexe pyruvate déshydrogénase; 26, acetate:succinate CoA-transférase; 27, enzyme inconnue; 28, succinyl-CoA synthétase; 29, citrate synthase; 30, aconitase; 31, isocitrate déshydrogénase; 32, complexe 2-cétoglutarate déshydrogénase; 33, succinate déshydrogénase (complexe II de la chaîne respiratoire); 34, malate déshydrogénase mitochondriale; 35, L-proline déshydrogénase; 36, pyrroline-5 carboxylate déshydrogénase; 37, L-glutamine désaminase; 39, glutamate déshydrogénase; 40, L-thréonine déshydrogénase; 41, 2-amino-3-céto-butyratase coenzyme A ligase; 42, méthylglyoxal réductase NADPH-dépendante; 43, L-lactaldéhyde déshydrogénase NAD⁺-dépendante; 45, glycerol-3-phosphate déshydrogénase FAD-dépendante; 46, NADH déshydrogénase insensible à la roténone; 47, oxydase alternative; 48, F₀F₁-ATP synthase; 49, glucose-6-phosphate déshydrogénase; 50, 6-phosphogluconate déshydrogénase; 51, acétyl-CoA synthétase; I, II, III, IV, complexes de la chaîne respiratoire (RC).

Bringaud, Rivière et al. 2006). Cependant, quelque soit la quantité de glucose, la proline est essentielle pour la croissance cellulaire (Bringaud, Barrett et al. 2012). Les parasites consomment également de la thréonine et de la glutamine (Cross, Klein et al. 1975, Coustou, Besteiro et al. 2003). Par ailleurs, seule la proline permet un maintien de la croissance cellulaire dans un milieu dépourvu de glucose (Lamour, Rivière et al. 2005).

Lorsque cultivés en présence de glucose, différents produits issus du métabolisme des parasites sont excrétés dans le milieu extérieur par le parasite. Ainsi, la dégradation du glucose aboutit principalement à la formation d'acétate et de succinate, et dans une moindre mesure de lactate, d'alanine, de malate et de pyruvate. La proline et la glutamine sont principalement converties en succinate, acétate et CO₂ (van Weelden, Fast et al. 2003, van Weelden, van Hellemond et al. 2005, Coustou, Biran et al. 2006). Enfin, la thréonine est métabolisée en quantités équimolaires de glycine et d'acétate (Cross, Klein et al. 1975).

1.3.1.1 Métabolisme de la proline

L'incorporation de la L-proline est assurée par un transporteur (L'Hostis, Geindre et al. 1993, Lamour, Rivière et al. 2005), dont le gène n'a pas été caractérisé chez *T. brucei*, contrairement à *Leishmania donovani* (Inbar, Schlisselberg et al. 2013). Comme mentionné précédemment, le glucose est la principale source de carbone utilisée par la forme procyclique dans le milieu de culture SDM79. De ce fait, beaucoup d'études se sont plutôt intéressées au métabolisme glucidique. Le récent développement d'un milieu pauvre en glucose a permis d'étudier l'importance du métabolisme de la proline (Furuya, Kessler et al. 2002, van Weelden, van Hellemond et al. 2005). La dégradation de la proline aboutit à la formation de glutamate par l'action d'une proline déshydrogénase (PRODH, Tb927.7.210) puis d'une pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase NAD-dépendante. Le glutamate est ensuite métabolisé par des enzymes du cycle de Krebs. Dans un milieu riche en glucose, le produit final majoritairement excrété est le succinate. En absence de glucose, l'alanine est le principal produit final issu de la dégradation de la proline. Deux autres produits finaux provenant de la dégradation de la proline sont retrouvés en faible quantité, l'acétate et le β -hydroxybutyrate (Coustou, Biran et al. 2008). La L-glutamine peut également être métabolisée par la forme procyclique du parasite : une L-glutamine déaminase convertirait cet acide aminé en glutamate qui serait lui-même dégradé par les enzymes décrites précédemment (Bringaud, Rivière et al. 2006, Bringaud, Rivière et al. 2006).

1.3.1.2 Métabolisme de la thréonine

Le métabolisme de la thréonine aboutit à la production d'acétate et de glycine (Cross, Klein et al. 1975, Linstead, Klein et al. 1977). Très peu d'études récentes se sont intéressées au métabolisme de cet acide aminé, dont le transporteur est également inconnu. Selon le modèle actuel, l'action successive de deux enzymes aboutirait à la formation en quantités équimolaires de glycine et d'acétyl-CoA (puis d'acétate) à partir de la thréonine. La thréonine pourrait ainsi être la principale source de carbone permettant d'alimenter la biosynthèse des lipides (Klein and Linstead 1976).

1.3.1.3 Métabolisme glucidique

Deux gènes codent pour des transporteurs membranaires d'hexoses qui permettent l'import de glucose dans la cellule: TbHT1 et TbHT2 (*T. brucei* Hexose Transporter, Tb927.10.8450 et Tb927.10.8530), principalement exprimés chez les formes sanguines ou la forme procyclique, respectivement (Barrett, Tetaud et al. 1998). Le glucose entre ensuite dans les glycosomes, organelles apparentés aux peroxysomes, pour y être métabolisé.

Chez la procyclique, les six premières étapes enzymatiques de la glycolyse sont compartimentalisées dans les glycosomes et aboutissent à la formation de 1,3 bisphosphoglycérate (1,3-BPGA). Le 1,3 BPGA est ensuite transféré dans le cytosol où il est converti en 3-phosphoglycérate (3-PGA) par l'action d'une phosphoglycérate kinase (PGK).

Le génome de *T. brucei* contient 3 gènes codant chacun une PGK (PGKA, B ou C ; Tb927.1.720, Tb927.1.710 et Tb927.1.700 respectivement) (Osinga, Swinkels et al. 1985). La PGKA est constitutivement exprimée dans les glycosomes des formes sanguines et de la forme procyclique, mais son activité spécifique est très faible et son rôle n'est à l'heure actuelle pas élucidé (Michels, Bringaud et al. 2006). La PGKB est exprimée uniquement dans le cytosol de la forme procyclique et la PGKC uniquement dans le glycosome des formes sanguines (Misset and Opperdoes 1987, Fung and Clayton 1991, Colasante, Robles et al. 2007). Le 3PG est ensuite converti en phosphoenolpyruvate (PEP) dans le cytosol. Une partie du PEP produit dans le cytosol rentre dans les glycosomes pour être converti en malate par l'action successive d'une phosphoenolpyruvate carboxykinase glycosomale (PEPCK, Tb927.2.4210) et d'une malate déshydrogénase (MDH, Tb927.10.15410) (Anderson, Carter et al. 1998). Ce malate est ensuite métabolisé en fumarate dans le cytosol et la mitochondrie par deux isoformes de la fumarate hydratase (FHc et FHm, Tb927.3.4500 et Tb11.02.2700) (Coustou, Biran et al. 2006).

Le fumarate est enfin réduit en succinate dans la mitochondrie ou dans les glycosomes par deux isoformes de la fumarate réductase : FRDm (Besteiro, Biran et al. 2002) et FRDg (Coustou, Besteiro et al. 2005), respectivement. La majeure partie du succinate provenant de la dégradation du glucose est produite dans les glycosomes, pour maintenir l'équilibre des balances redox et ATP/ADP de ce compartiment cellulaire (Besteiro, Biran et al. 2002). En effet, la consommation d'ATP par la première et la troisième étape de la glycolyse (hexokinase (HXK, Tb927.10.2020) et phosphofructokinase (PFK, Tb927.3.3270), respectivement) est compensée par la production d'ATP de la PEPCK et probablement de la pyruvate phosphate dikinase (PPDK, Tb927.11.6280). La PPDK est une enzyme glycosomale convertissant, probablement de manière réversible, le PEP en pyruvate (Bringaud, Baltz et al. 1998, Bringaud, Rivière et al. 2006). Cependant, le sens de la réaction catalysée par cette enzyme dans des conditions physiologiques n'est pas connu. De même, la MDH et la FRDg permettent de réoxyder le NADH produit par la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) en NAD^+ et ainsi maintenir l'équilibre de la balance redox (Besteiro, Biran et al. 2002).

Une autre partie du PEP est converti dans le cytosol par la pyruvate kinase (PYK, Tb927.10.14140) en pyruvate qui entre dans la mitochondrie grâce à un transporteur dont le gène est actuellement inconnu. Le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) mitochondrial va ensuite convertir ce pyruvate en acétyl-CoA (Fig. 21). Ce complexe est composé de 3 sous unités : E1 (pyruvate déshydrogénase), E2 (dihydrolipoamide transacétylase, Tb927.10.7570) et E3 (dihydrolipoamide déshydrogénase, Tb927.10.2350). E1 est elle même composée de deux sous-unités E1 α (Tb927.10.12700) et E1 β (Tb927.3.1790) (Jackman, Danson et al. 1990, Bochud-Allemann and Schneider 2002). L'acétyl-CoA est transformé en acétate par une activité acétate:succinate CoA transférase ou ASCT (Van Hellemond, Opperdoes et al. 1998), dont le gène a été identifié et caractérisé en 2004 (Riviere, van Weelden et al. 2004) (Tb11.02.0290). Le mutant de cette enzyme ne présente qu'une diminution modérée de la production d'acétate (~20%), impliquant qu'une autre activité enzymatique jusqu'alors non identifiée participe à cette production d'acétate.

La plupart des eucaryotes métabolisent une partie de l'acétyl-CoA produit dans la mitochondrie dans le cycle des acides tricarboxyliques, également appelé cycle de Krebs. La forme procyclique de *T. brucei* exprime toutes les enzymes du cycle de Krebs (Durieux, Schutz et al. 1991). Néanmoins, il a été démontré qu'il ne fonctionne pas en tant que cycle, car l'acétyl-CoA produit dans la mitochondrie est converti en acétate au lieu d'alimenter le cycle de Krebs (van Weelden, Fast et al. 2003).

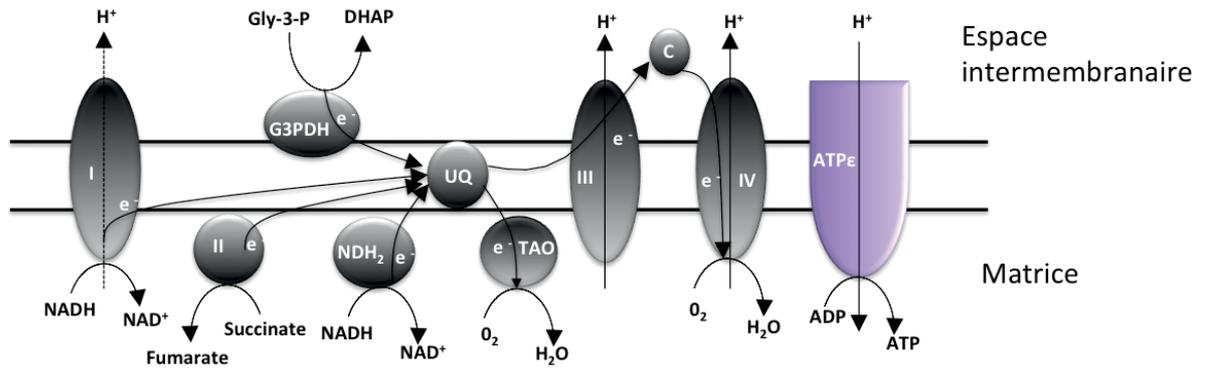


Figure 17 : La chaîne respiratoire chez la forme procyclique de *T. brucei*

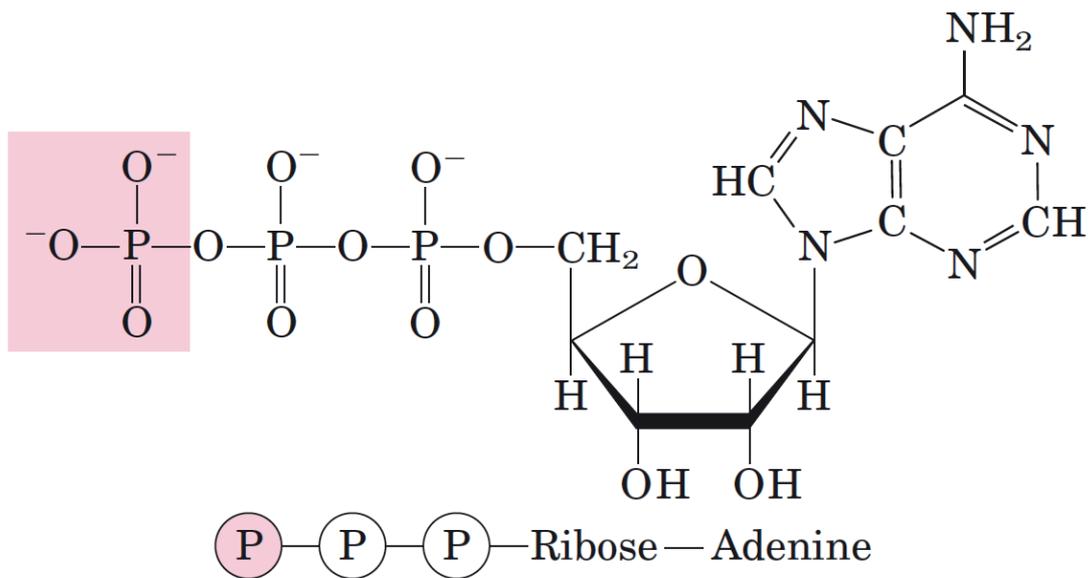


Figure 18: Adénosine triphosphate (ATP)

Daprès Lehninger et al., 2005

Une partie des réactions du cycle de Krebs sont utilisées dans d'autres processus que la dégradation de l'acétyl-CoA, tels que la dégradation de la proline et de la glutamine en succinate par l' α -cétoglutarate déshydrogénase et la succinyl-CoA synthétase (van Weelden, Fast et al. 2003, van Weelden, van Hellemond et al. 2005).

1.3.1.4 La voie des pentoses phosphates

La branche oxydative de la voie des pentoses phosphate (PPP, pentose phosphate pathway) fournit à la cellule du NADPH, impliqué dans la défense contre le stress oxydatif et de nombreuses voies de biosynthèse, et du ribose 5-phosphate utilisé pour la synthèse de nucléotides. Le NADPH est produit par la première et la troisième enzyme de la PPP : la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH, Tb927.10.2490) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH, Tb927.9.12110). Ces deux enzymes ainsi que la deuxième enzyme de la PPP (6-gluconolactonase, Tb927.11.6330) sont localisées à la fois dans les glycosomes et dans le cytosol (Barrett 1997, Heise and Opperdoes 1999, Duffieux, Van Roy et al. 2000, Igoillo-Esteve, Maugeri et al. 2007)

Il a récemment été démontré qu'en absence de glucose, la PPP est alimentée en glucose-6-phosphate par la néoglucogénèse, à partir de la dégradation de la proline (Allmann, Morand et al. 2013).

La branche non oxydative de la PPP comprend une transkétolase (Tb927.8.6170), exprimée dans le cytosol et dans une moindre mesure dans les glycosomes (Stoffel, Alibu et al. 2011), et une transaldolase (Tb927.8.5600) localisée dans le cytosol (Cronín, Nolan et al. 1989).

1.3.1.5 La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire de la forme procyclique de *T. brucei* contient 4 complexes capables de transférer les électrons donnés par les équivalents réducteurs (NADH, FADH) à l'ubiquinone : deux NADH:ubiquinone-oxydoréductase (Complexe I et NDH2, une enzyme insensible à la roténone), le complexe succinate déshydrogénase (complexe II) et une glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Fang and Beattie 2002, Guerra, Decottignies et al. 2006). L'ubiquinol réduit peut être réoxydé en transférant les électrons à l'oxydase alternative (TAO), qui ne transfère pas de protons, ou au complexe cytb-cytc1 (complexe III) puis au complexe cytochrome c oxydase (Complexe IV). Les complexes III et IV sont probablement capables de pomper les protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire permettant ainsi de générer le gradient électrochimique de protons, utilisé pour assurer les fonctions mitochondriales, telles que l'importation des protéines et la production d'ATP par le complexe F_0/F_1 -ATP synthase (phosphorylation oxydative).

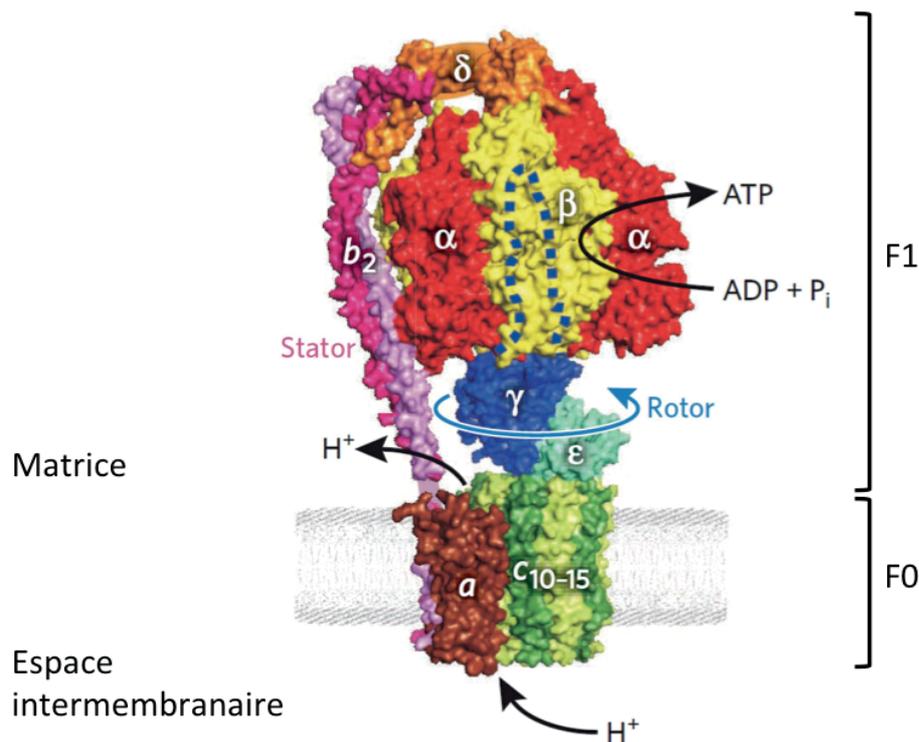


Figure 19 : Structure de la F₀F₁ ATP synthase

Daprès Weber, 2010

L'ATP synthase est composée d'un domaine F₁ périphérique comprenant trois sous-unités α , trois sous unités β , une sous unité δ et une sous unité centrale γ . Le domaine F₀ est composé d'une sous unité a , de deux sous unités b et de multiples sous unités c . Une sous unité β fixe un ADP et un P_i entraînant un changement de sa conformation. Le passage des protons par F₀ induit la rotation du cylindre formé par les sous unités c et de la sous unité γ qui y est fixée. A chaque rotation de 120° , γ entre en contact avec une sous unité β différente, entraînant un nouveau changement de conformation de cette dernière et la libération d'ATP. La structure sphéroïde $\alpha_3\beta_3$ est fixe, maintenue par les sous unités b et δ .

Le complexe I quant à lui ne semble pas impliqué dans le transport des protons, car si toutes les sous-unités de ce complexe participant au transport d'électrons sont codées par le génome, quatre sous-unités impliquées dans le transport de protons sont manquantes. Ce complexe n'est pas essentiel à la croissance du parasite mais contribuerait pour 20% de l'activité NADH:ubiquinone oxydoréductase mitochondriale totale (Opperdoes and Michels 2008, Verner, Cermáková et al. 2011) (Fig. 17).

Différentes drogues permettant d'inhiber spécifiquement les complexes de la chaîne respiratoire sont disponibles. Ainsi, le complexe I est sensible à la roténone, bien que modérément, le complexe II au malonate, le complexe III à l'antimycine, le complexe IV au cyanure, la F_0/F_1 -ATP synthase à l'oligomycine et la TAO au SHAM (acide salicylhydroxamique).

1.3.1.6 La production d'ATP

La principale source d'énergie libre utilisée dans les voies de biosynthèse cellulaire provient de l'hydrolyse des liaisons phosphoanhydride à haut potentiel énergétique de l'adénosine triphosphate (ATP, Fig. 18). L'ATP est composé d'une adénine, d'un ribose et de trois groupements phosphate. Il existe deux moyens de produire de l'ATP dans la cellule : la phosphorylation au niveau du substrat et la phosphorylation oxydative (Lehninger, Nelson et al. 2005).

La biosynthèse d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat se produit lorsqu'un groupement phosphoryle est transféré d'un substrat phosphorylé à une molécule d'ADP (Adénosine diphosphate). C'est notamment le cas de certaines réactions de la glycolyse et du cycle de Krebs (Bittar and Bittar 1996).

En 1948, Eugene Kennedy et Albert Lehninger ont identifié la mitochondrie comme étant le site de la phosphorylation oxydative. Ce processus peut être divisé en deux parties. D'abord, la génération d'équivalents réduits (NADH, $FADH_2$) puis l'oxydation de ces équivalents par le dioxygène *via* la chaîne respiratoire, couplée à la production d'ATP. Les équivalents réduits proviennent de l'oxydation des sucres, des acides gras ou des acides aminés. D'après le modèle chimiosmotique de Peter Mitchell, les protons générés par l'oxydation des équivalents réduits sont transférés de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient électrochimique de protons. Ce dernier est utilisé par le complexe F_0/F_1 -ATP synthase pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) (Bittar and Bittar 1996). Le principe du fonctionnement est présenté dans la figure 19.

Comme nous l'avons vu précédemment, la production d'ATP dans les glycosomes par la PEPCK et éventuellement la PPK compense la consommation d'ATP de l'HXK et de la

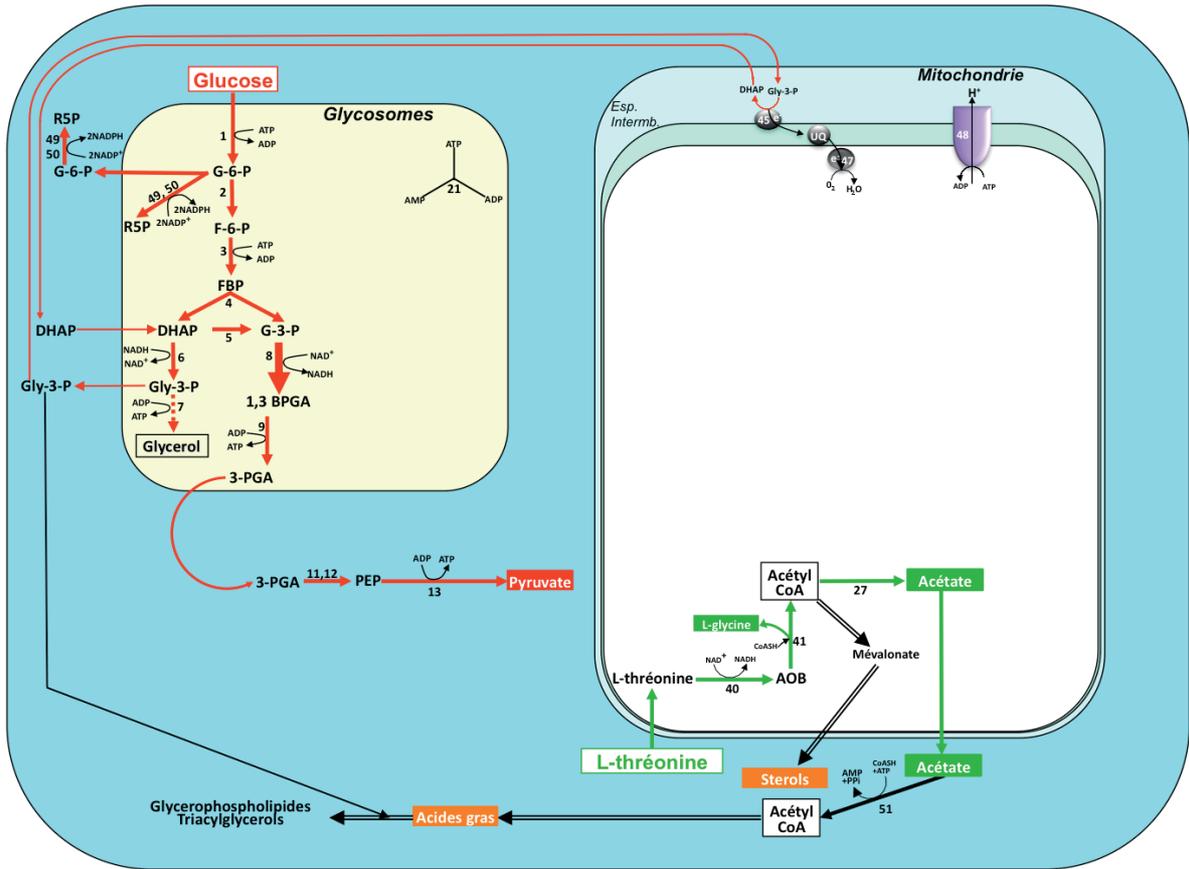


Figure 20: Métabolisme intermédiaire de la forme sanguine de *T. brucei*

Les abréviations, numérotations et représentations schématiques sont identiques à celles utilisées dans la figure 16.

PFK. Cela permet de théoriquement équilibrer la balance ADP/ATP glycosomale. Dans le cytosol, l'ATP est généré par la PYK et la PGKB. Cette biosynthèse cytosolique d'ATP est essentielle à la survie du parasite cultivé en présence de glucose. En effet, le mutant n'exprimant plus la PYK est létal, bien que le pyruvate soit toujours métabolisé. En revanche, une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP a été observée chez ce même mutant (Coustou, Besteiro et al. 2003). Jusqu'au début des années 2000, la production d'ATP était considérée comme dépendante de la phosphorylation oxydative (Durieux, Schutz et al. 1991). Cependant, l'avènement des techniques de génétique inverse a permis de revoir ce modèle. En 2002, Bochud-Allemann et al ont généré un mutant ARNi de la SCoAS présentant une diminution de la concentration intra-mitochondriale d'ATP et un arrêt de croissance (Bochud-Allemann and Schneider 2002). Il est à noter que la SCoAS intervient à la fois dans le métabolisme de la proline et de la glutamine (c'est une enzyme du cycle de l'acide citrique) et dans le cycle avec l'ASCT. Ces résultats suggèrent que la production d'ATP par la SCoAS est essentielle au parasite. Par ailleurs, l'inhibition spécifique de la F_0/F_1 -ATP synthase par l'oligomycine n'a que peu d'effet sur la concentration d'ATP et la croissance du parasite (Coustou, Besteiro et al. 2003). Ces résultats, confirmés par un mutant ARNi de la sous-unité β de la F_0/F_1 -ATP synthase, sont en faveur d'un rôle important de la production d'ATP mitochondrial par phosphorylation au niveau du substrat (Coustou, Biran et al. 2008). Cependant, l'inhibition de l'expression, par ARNi, de la sous-unité α de la F_0/F_1 -ATP synthase montre une réduction importante de la vitesse de croissance d'une autre souche de *T. brucei* (427 au lieu de EATRO1125 utilisée ci-dessus) (Zikova, Schnauffer et al. 2009). Ces résultats contrastés reflètent la complexité des processus cellulaires mis en place pour assurer l'homéostasie de la balance ADP/ATP, qui semblent différer significativement entre les souches de trypanosomes.

1.3.2 Métabolisme énergétique des formes sanguines

Le métabolisme énergétique des formes sanguines de *T. brucei* est plus simple que celui de la forme procyclique. Il est exclusivement dépendant de la glycolyse, le glucose étant la source de carbone abondamment présente dans le sang de l'hôte vertébré (Fig. 20).

1.3.2.1 La glycolyse

Les sept premières étapes enzymatiques de la glycolyse, qui convertissent le glucose en 3-phosphoglycérate, sont compartimentalisées dans les glycosomes. L'étape suivante est cytosolique et aboutit à la production de 2 molécules de pyruvate par molécule de glucose.

Chez la forme sanguine « long-slender », le pyruvate est considéré comme étant le principal, voire le seul, produit final excrété à partir du métabolisme glucidique (Visser and Opperdoes 1980). Cependant, des traces d'autres produits finaux comme le succinate et l'acétate ont été détectées. La production de ces produits a souvent été attribuée à la forme stumpy qui peuvent être présentes, même dans de très faibles proportions, dans les cultures de la forme slender (Haanstra, van Tuijl et al. 2012). En effet, le principal produit final de la glycolyse de la forme stumpy est également le pyruvate mais l'acétate est produit en quantité assez importante (van Grinsven, Van Den Abbeele et al. 2009). Cette production d'acétate de la forme stumpy reflète la préadaptation du métabolisme du parasite à l'environnement intestinal de l'insecte vecteur.

Les balances redox et ATP/ADP sont maintenues dans les glycosomes. En aérobiose, le NADH produit par la GAPDH est réoxydé par la navette G3P/DHAP (glycérol-3-phosphate/dihydroxyacétone phosphate) (Opperdoes and Borst 1977). La glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH, Tb927.8.3530) produit du G3P à partir du DHAP dans les glycosomes permettant de régénérer du NAD⁺. Le G3P, transportant les équivalents réducteurs, est oxydé en DHAP par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase FAD-dépendante (Tb927.11.7380) située au niveau de la membrane mitochondriale (Clarkson, Bienen et al. 1989). Les électrons libérés lors de cette dernière réaction sont transférés à l'ubiquinone. La TAO accepte les électrons de l'ubiquinol pour les donner à l'O₂ permettant ainsi la formation d'H₂O, produit final de cette réaction. Le DHAP rejoint ensuite les glycosomes pour initier un nouveau cycle. L'ATP produit par la PGKC (2 ATP par molécule de glucose consommée) compense la consommation d'ATP de l'HXK et de la PFK.

En conditions d'anaérobiose, une autre voie permet le maintien de la balance redox, car la navette G3P/DHAP ne peut pas être utilisée en absence d'oxygène : le G3P produit par la G3PDH est déphosphorylé en glycérol par la glycérol kinase (GK, Tb927.9.12550) glycosomale. Dans ces conditions, l'ATP consommé par l'HXK et la PFK est régénéré à la fois par la GK et la PGKC. Dans ces conditions, une molécule de pyruvate et une molécule de glycérol sont produites par glucose consommé, avec pour conséquence une seule molécule d'ATP produite dans le cytosol par la PYK, au lieu de 2 en aérobiose. La production d'ATP ne semble pas suffisante puisque ces conditions d'anaérobiose conduisent à la mort cellulaire (Helfert, Estévez et al. 2001).

1.3.2.2 La voie des pentoses phosphates

Chez les formes sanguines de *T. brucei*, le flux de la branche oxydative de la voie des pentoses-phosphates est relativement faible, la majorité du glucose étant pris en charge par la glycolyse. Le flux de la voie des pentoses phosphates est faible comparativement à celui de la glycolyse (Hannaert, Bringaud et al. 2003). Les activités enzymatiques de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et de la 6-phosphogluconolactonase ont été localisées à la fois dans le glycosome et le cytosol (Heise and Opperdoes 1999, Duffieux, Van Roy et al. 2000). Parmi les enzymes intervenant dans la branche non oxydative, seule la transaldolase est exprimée chez les formes sanguines de *T. brucei* (Cronín, Nolan et al. 1989).

1.3.2.3 Métabolisme mitochondrial

Bien que beaucoup de fonctions mitochondriales soient réprimées chez les formes sanguines, les fonctions importantes sont présentes, notamment pour transférer les électrons des substrats oxydés sur l'oxygène. La plupart des enzymes du cycle de Krebs, les cytochromes et les composants classiques de la chaîne respiratoire ne sont pas exprimés dans la mitochondrie des formes sanguines, mais elle contient une oxydase alternative, similaire à celle retrouvée chez les plantes (Chaudhuri, Ajayi et al. 1998). Le NADH produit dans les glycosomes est transféré vers la mitochondrie via la navette G3P/DHAP. La glycérol-3-phosphate déshydrogénase FAD-dépendante transfère les électrons à l'ubiquinone, l'ubiquinol réduit fournit ensuite les électrons à l'oxydase alternative (Tielens and Hill 1985, Chaudhuri, Ajayi et al. 1998). Cette chaîne de transport d'électrons ne fait pas intervenir de translocation de protons et n'est donc pas liée à une production d'ATP.

Les formes sanguines possèdent bien une F_0/F_1 -ATPase (Williams and Frank 1990) qui est essentielle à la survie du parasite (Schnauffer, Clark-Walker et al. 2005). Mais cette dernière fonctionne dans le sens inverse de la forme procyclique : elle utilise l'ATP pour transférer les protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter membranaire mitochondrial et ainsi générer un gradient électrochimique de protons mitochondrial, essentiel au fonctionnement de la mitochondrie. Les complexes III et IV de la chaîne respiratoire ne sont pas exprimés chez les formes sanguines. La présence d'un complexe I est controversée. En effet, la quantité d'ARNm (ARN des gènes mitochondriaux et également nucléaires) codant les sous-unités de ce complexe est augmentée chez les formes sanguines par rapport à la forme procyclique, bien que l'activité NADH:ubiquinone oxidoréductase soit plus faible (Opperdoes and Michels 2008). De plus, les mutants knock-out de différentes sous-unités du complexe I ne présentent pas de phénotype de croissance et l'activité NADH:ubiquinone oxydoréductase n'est pas modifiée (Surve, Heestand et al. 2012).

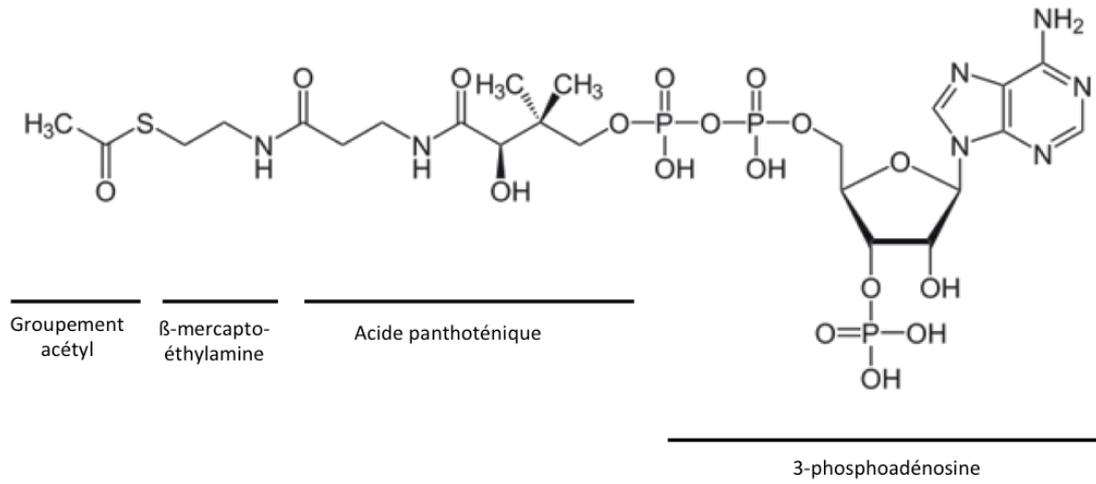


Figure 21 : Structure de l'acétyl-CoA

Il semble qu'une NADH déshydrogénase alternative (NDH2), utilisant le même accepteur d'électron, soit responsable de la majeure partie de cette activité (Fang and Beattie 2002, Surve, Heestand et al. 2012).

1.3.2.4 Métabolisme de la thréonine

Contrairement au glucose, les quantités d'acides aminés libres disponibles dans le sang de l'hôte vertébré sont faibles. De ce fait, peu d'études se sont intéressées au métabolisme des acides aminés chez les formes sanguines. Cependant, Linstead et al. ont montré en 1977 que les formes sanguines étaient capables de métaboliser la thréonine, mais dans une moindre mesure comparé à la forme procyclique (Linstead, Klein et al. 1977).

1.4 Métabolisme de l'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA)

L'acétyl-CoA a un rôle central dans le métabolisme intermédiaire. C'est le produit commun de la dégradation des glucides, des acides aminés et des acides gras (β -oxydation). Cet intermédiaire intervient notamment dans la biosynthèse des lipides, des acides aminés et c'est le précurseur qui alimente le cycle de Krebs. L'acétyl-CoA est un thioester, dont la partie coenzyme A (CoA) est formée d'un groupement β -mercaptoéthylamine lié par une liaison amide à un acide panthothénique, lié à son tour à la 3-phosphoadénosine par l'intermédiaire d'une liaison pyrophosphate (Fig. 21). Le groupement acétyl de l'acétyl-CoA forme une liaison thioester avec le groupement sulfhydryle du β -mercaptoéthylamine.

Chez *T. brucei*, l'acétyl-CoA est principalement produit dans la mitochondrie à partir de la dégradation du glucose et de la L-thréonine. D'autres acides aminés cétogéniques, tels que la proline, la glutamine, mais également la leucine, la valine et l'isoleucine pourraient également contribuer à la production d'acétyl-CoA, car le génome du parasite contient les gènes des voies métaboliques correspondantes. Cependant, les voies de la dégradation en acétyl-CoA de la lysine, du tryptophane, de la phénylalanine et de la tyrosine ne sont pas présentes chez les trypanosomes (Berriman, Ghedin et al. 2005). La β -oxydation des acides gras n'a jamais été décrite chez les trypanosomes bien que les enzymes soient présentes. Enfin l'acétate produit dans la mitochondrie du parasite, mais également provenant du milieu extracellulaire, peut-être converti dans le cytosol en acétyl-CoA par l'acétyl-CoA synthétase AMP-dépendante (AceCS, Tb927.8.2520) (Rivière, Moreau et al. 2009).

1.4.1 Production d'acétyl-CoA à partir du glucose

Chez la forme procyclique de *T. brucei*, le pyruvate issu de la dégradation du glucose est converti en acétyl-CoA dans la mitochondrie par décarboxylation oxydative. Le complexe PDH est responsable de ce processus.

1.4.1.1 Le complexe PDH : structure

Le complexe PDH est composé de trois sous-unités : la sous-unité E1 (pyruvate déshydrogénase), la sous-unité E2 (dihydrolipoamide acétyl-transférase) et la sous-unité E3 (dihydrolipoamide déshydrogénase). Le nombre de copies de chaque enzyme et la taille du complexe varient en fonction de l'organisme. Chez les eucaryotes, le « cœur » du complexe PDH est composé de 60 copies dodécaédriques de E2 pouvant fixer 30 tétramères de E1 et 12 dimères de E3 (le complexe PDH contient 24 copies de E2 chez *Escherichia coli*).

E2 contient trois domaines fonctionnels distincts : le domaine lipoyl, dans lequel le lipoate est attaché à un résidu lysine *via* une liaison amide ; les domaines spécifiques de liaison aux sous-unités E1 et E3 ; des domaines responsables de l'activité acétyl-transférase. Le complexe PDH contient un unique domaine lipoyl chez la levure, deux chez les mammifères et trois chez *E. coli*. Les différents domaines de E2 sont reliés par des séquences de 20 à 30 acides aminés, riches en alanine et proline en alternance avec des résidus chargés. L'attachement du lipoate sur une lysine permet la formation d'un long « bras » flexible permettant de coupler les sites actifs des 3 sous-unités. La structure de base E1-E2-E3 est très conservée.

La sous-unité E1 contient deux sites actifs pouvant fixer le thiamine pyrophosphate (TPP) et des cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Ces sous-unités sont organisées en homodimères (α_2) ou hétérotétramères ($\alpha_2\beta_2$).

La sous-unité E3 est assemblée en homodimères. Elle est composée d'un domaine de liaison au FAD, d'un domaine de liaison au NAD, d'un domaine central et de domaines d'interface, lieu d'interaction entre les deux monomères. Cette enzyme intervient dans trois autres complexes multienzymatiques : la 2-cétoglutarate déshydrogénase (KDH, 2-cétoglutarate déshydrogénase; métabolisme énergétique), le complexe acides cétoniques à chaînes ramifiées déshydrogénase (BCKDH, branched-chain ketoacid dehydrogenase; dégradation des acides aminés à chaîne ramifiée) et le complexe de clivage de la glycine (GCC, glycine cleavage complex).

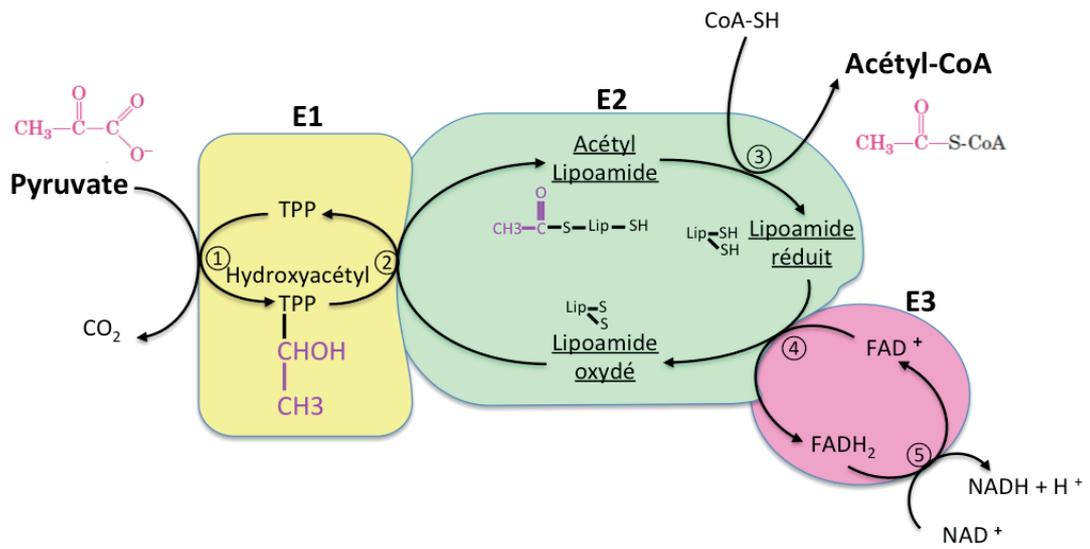


Figure 22 : Les réactions enzymatiques du complexe pyruvate déshydrogénase

1.4.1.2 Le complexe PDH : réactions enzymatiques

La conversion du pyruvate en acétyl-CoA par le complexe PDH se déroule en cinq étapes (Fig. 22). Le pyruvate va tout d'abord être décarboxylé par la pyruvate déshydrogénase (E1) : le C1 du pyruvate va donner du CO₂ et le C2 va s'attacher au thiamine pyrophosphate (TPP) pour donner de l'hydroxyacétyl TPP (①). Le groupement hydroxyacétyl est ensuite oxydé pour libérer les deux électrons qui vont réduire le pont disulfure du lipoamide en deux groupements thiols (②). Le groupement acétyl produit par cette réaction d'oxydo-réduction est estérifié sur un thiol du lipoamide réduit puis trans-estérifié sur le CoA-SH pour donner de l'acétyl-CoA (③). Ces deux dernières étapes sont réalisées par la dihydrolipoamide acétyl-transférase (E2). Enfin, la dihydrolipoamide déshydrogénase (E3) permet le transfert des deux protons et des deux électrons du lipoamide réduit au FAD⁺ (④), puis au NAD⁺, l'accepteur final des électrons, pour produire du NADH (⑤). Le complexe PDH est alors régénéré.

1.4.1.3 Le complexe PDH de *T. brucei*

Ce complexe est composé de 4 protéines formant 3 sous-unités, codées par 4 gènes: les protéines E1 α (Tb927.10.12700) et E1 β (Tb927.3.1790) de la sous-unité E1, les protéines E2 (Tb927.10.7570) et E3 (Tb11.01.8470) (Berriman, Ghedin et al. 2005).

Le complexe PDH est impliqué dans la production d'acétate dans la mitochondrie de la forme procyclique. Ce complexe n'est pas essentiel à la survie du parasite : en effet, les mutants des sous-unités E1 α et E2 sont viables, bien que le mutant de E2 ne produise plus d'acétate à partir du glucose (Bochud-Allemann and Schneider 2002, Coustou, Biran et al. 2008). Ces résultats sont en accord avec les précédentes observations montrant que la glycolyse n'est pas essentielle chez la forme procyclique (Lamour, Rivière et al. 2005, van Weelden, van Hellemond et al. 2005). Le mutant de la sous-unité E3 présente un phénotype de croissance important, probablement pour son implication dans d'autres complexes enzymatiques (Roldan, Comini et al. 2011).

Chez la forme sanguine « long slender » (forme multiplicative), le métabolisme mitochondrial est faiblement actif. Il est admis que le glucose est exclusivement converti en pyruvate (Clarkson and Brohn 1976, Visser and Opperdoes 1980) et donc que cette forme ne produit pas d'acétate à partir de la glycolyse. La sous-unité E3 du complexe PDH est cependant exprimée chez les formes sanguines (Jackman, Danson et al. 1990) et le mutant de cette sous-unité n'est pas viable. Cependant, l'ajout de thymidine restaure la croissance des parasites. Cette enzyme est probablement nécessaire au complexe GCC qui génère du méthylène-tétrahydrofolate essentiel pour la synthèse de dTMP puis d'ADN (Roldán, Comini et al. 2011).

1.4.2 Production d'acétyl-CoA à partir de la thréonine

La thréonine est un acide aminé essentiel pour beaucoup d'organismes. Chez *Escherichia coli*, sa dégradation intervient notamment dans la biosynthèse d'autres acides aminés et dans les voies de régulation (Sawers 1998). Deux voies majeures de dégradation de la thréonine ont été identifiées chez les procaryotes et eucaryotes. La première permet la formation d'ammoniaque et de 2-oxobutanoate par l'action d'une L-thréonine déshydratase (EC 4.3.1.19) (Umbarger and Brown 1957, Leoncini, Pagani et al. 1985, Pagani, Leoncini et al. 1994, Hesslinger, Fairhurst et al. 1998). La dégradation de la thréonine peut également aboutir à la production d'acétyl-CoA par l'action successive de deux enzymes : une thréonine déshydrogénase (TDH, EC 1.1.1.103), qui produit du 2-amino-3-oxobutyrate et du NADH, et une 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase (AKAT, EC 2.3.1.29) qui produit de l'acétyl-CoA et de la glycine. Cette voie est la plus fréquemment rencontrée dans la nature et a notamment été décrite chez les archaea (Machielsen and van der Oost 2006), les bactéries (Potter, Kapoor et al. 1977), les champignons (Kovaleva, Dorozhko et al. 1984), les gallinacés (Yuan and Austic 2001), et les mammifères (Dale 1978).

Une troisième voie a été identifiée chez les bactéries et les champignons. Cette voie fait intervenir une L-thréonine aldolase (EC 4.1.2.5) pour convertir la thréonine en glycine et en acétaldéhyde (Karasek and Greenberg 1957, Morris 1969), lequel est converti en acétyl-CoA par une acétaldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.10)

Chez *T. brucei*, la dégradation de la thréonine aboutit à la production de glycine et d'acétate (et donc d'acétyl-CoA, son précurseur) en quantité équimolaire (Cross, Klein et al. 1975). Linstead et al ont identifié une activité TDH dépendante du NAD⁺ et une activité AKAT dépendante du CoA, à la fois chez les formes sanguines et la forme procyclique de *T. brucei*. De plus, ils ont mis en évidence la présence d'aminoacétone, produit issu de la décarboxylation spontanée du 2-amino-3-oxobutyrate dans des homogénats cellulaires, provenant de la dégradation de la thréonine (Linstead, Klein et al. 1977). Cependant, cette voie n'a jusqu'alors pas été expérimentalement démontrée par les outils de génétique inverse dont nous disposons actuellement, bien que le génome de *T. brucei* contienne les gènes codant une thréonine-3-déshydrogénase (TDH) et une 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase.

1.5 Métabolisme de l'acétate

1.5.1 Généralités

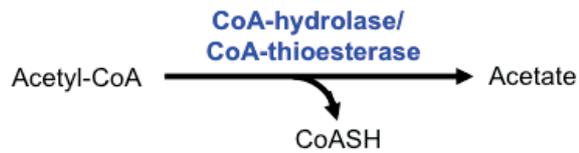
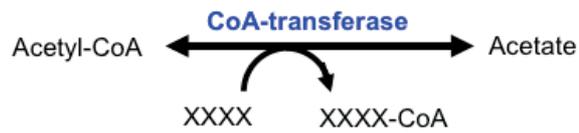
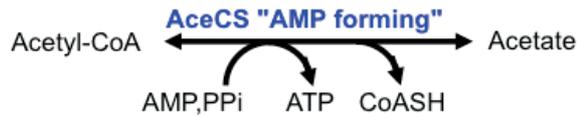
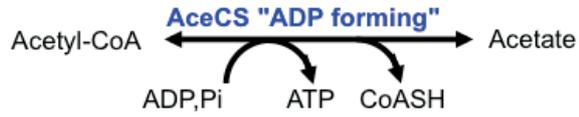
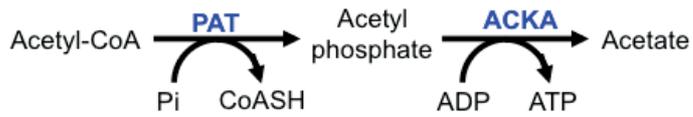
L'acétate est un acide faible, dont la forme protonée peut traverser aisément les membranes cellulaires et agir ainsi comme un découplant de la force protomotrice. En passant à travers la membrane, l'acétate protoné (CH_3COOH) est dissocié en forme anionique (CH_3COO^-) et H^+ (Kihara and Macnab 1981, Booth 1985). Chez les bactéries, le proton acidifie le cytoplasme et l'anion augmente la pression osmotique intracellulaire, ce qui interfère avec le bon déroulement de certaines voies métaboliques (Roe, McLaggan et al. 1998, Roe, O'Byrne et al. 2002). L'acétate pouvant être toxique, les cellules doivent l'éliminer, soit en l'excrétant soit en l'utilisant comme source de carbone.

L'acétogénèse, qui désigne l'excrétion d'acétate dans l'environnement extra cellulaire, est un processus rencontré lorsque le cycle de l'acide tricarboxylique ne fonctionne pas ou quand le flux de carbone dépasse sa capacité (Holms 1996). Ainsi, chez les bactéries, l'excrétion d'acétate se produit en conditions d'anaérobiose lors de la fermentation acide mixte ou en présence d'un excès de source carbonée inhibant la respiration, phénomène appelé « effet Crabtree », durant lequel 15% du glucose peut être excrété sous forme d'acétate (Holms 1986, Holms 1996). Cette excrétion résulte de la nécessité de recycler le coenzyme A nécessaire aux voies métaboliques. Ce pool de coenzyme A est composé d'une part de CoASH non estérifié et de thioesters (acétyl-CoA, succinyl-CoA, malonyl-CoA, etc.). La quantité de CoA dans la cellule est strictement régulée et constante. Cette régulation est notamment dépendante de l'utilisation du pantothénate (précurseur du CoASH) et de la dégradation du CoASH (Jackowski and Rock 1981). Le ratio acétyl-CoA/CoASH est dépendant de la nature des sources de carbone (Chohnan, Izawa et al. 1998).

Les cellules pour survivre doivent s'adapter aux modifications de leur environnement et aux sources de carbone disponibles. Ainsi, certaines bactéries sont capables en absence de glucose d'opérer un « switch acétate » leur permettant de consommer l'acétate qu'elles ont excrété au cours du métabolisme glucidique. Cette commutation métabolique se traduit par le passage d'un état de croissance rapide à un état de croissance ralenti (Wolfe 2005). Un phénomène apparenté a été observé chez les mammifères (Crabtree, Gordon et al. 1990).

1.5.2 La production d'acétate chez *T. brucei*

Chez *T. brucei*, la production d'acétate à partir de l'acétyl-CoA est exclusivement mitochondriale et fait intervenir une acétate:succinate CoA transférase (ASCT) (Van Hellemond, Opperdoes et al. 1998). Le gène codant cette enzyme a été identifié et caractérisé au laboratoire en collaboration avec les équipes de M. Boshart (Munich, Allemagne) et de A. Tielens (Rotterdam, Pays-Bas) (Riviere, van Weelden et al. 2004). L'ASCT est une enzyme qui transfère le groupement CoA de l'acétyl-CoA vers le succinate pour produire de l'acétate et du succinyl-CoA. Cette activité serait couplée à la succinyl-CoA synthétase (SCoAS) qui va régénérer du CoASH libre et du succinate, tout en produisant une molécule d'ATP (Riviere, van Weelden et al. 2004). Cette enzyme est également retrouvée chez d'autres organismes, notamment dans les hydrogénosomes (organelle apparenté aux mitochondries) de trichomonads (comme *Tritrichomonas suis* et *Trichomonas vaginalis* (Steinbuchel and Muller 1986)), chez certains champignons anaérobies (*Neocallimastix sp. LM-2* (Marvin-Sikkema, Pedro Gomes et al. 1993)) ou encore certains helminthes (*Fasciola hepatica* (Barrett, Coles et al. 1978)) et chez la plupart des trypanosomatidés (trypanosomes africains, leishmanies et *Phytomonas* (Van Hellemond, Opperdoes et al. 1998)). Les ASCT identifiées chez les trypanosomatidés *T. brucei*, *T. cruzi* et *L. major* sont des homologues des SCOT (succinyl-CoA:3-oxoacid COA transférase). En général, les SCOT catalysent le transfert du groupement CoA du succinyl-CoA vers un 3-oxoacide pour former du succinate et un 3-oxoacyl-CoA (White and Jencks, 1976). Chez les mammifères, ces SCOT ont un rôle essentiel dans les mitochondries du cerveau et des muscles pour l'utilisation des corps cétoniques (Fukao, Lopaschuk et al. 2004). Elles transfèrent le groupement CoA du succinyl-CoA sur l'acétoacétate pour former de l'acétoacétyl-CoA, qui est ensuite clivé par une thiolase pour donner deux acétyl-CoA. Les SCOT des mammifères sont organisés en homodimères avec deux sites actifs (Bateman, Brownie et al. 2002). Des analyses cinétiques ont montré que le groupement CoA était transféré via un mécanisme «ping-pong» impliquant un intermédiaire thioester entre le CoA et un glutamate du site actif (White and Jencks 1976, Rochet and Bridger 1994). De telles analyses n'ont pas été menées chez les trypanosomatidés. Mais leur forte similarité avec les SCOT de mammifère permet d'envisager un mécanisme similaire. Les SCOT de mammifères sont capable de transférer le CoA du succinyl-CoA sur un grand nombre d'acides carboxyliques (White and Jencks 1976). Aucune analyse de la spécificité de substrat de l'ASCT chez les trypanosomatidés n'a jusqu'alors été publiée.



AceCS (Tb927.8.2520)
 Production d'acétyl-CoA
 Riviere et al., 2009)

ASCT (Tb11.02.0290)
 Production d'acétate
 (Riviere et al., 2004)

Figure 23 : Les différentes voies de production d'acétate à partir d'acétyl-CoA

Bien qu'impliquée dans la production d'acétate, l'ASCT n'est pas la seule enzyme participant à la synthèse de ce métabolite à partir d'acétyl-CoA. En effet, les mutants « knock out » et ARNi de l'ASCT de *T. brucei* produisent toujours de l'acétate (Riviere, van Weelden et al. 2004). L'activité complémentaire responsable de cette production d'acétate n'a pas encore été identifiée. Il est à noter que le mutant RNAi de la sous-unité E2 de la PDH ne produit plus d'acétate à partir du glucose (Coustou, Biran et al, 2008), impliquant que l'activité enzymatique alternative produit l'acétate certainement à partir de l'acétyl-CoA.

1.5.3 Les autres voies de production d'acétate à partir d'acétyl-CoA

Les autres activités enzymatiques impliquées dans la production d'acétate à partir d'acétyl-CoA sont présentées dans la figure 23.

1.5.3.1 Le système acétyl-CoA:phosphate acétyltransférase/ATP:acétate phosphotransférase

Ce système appelé PAT/ACKA permet la production d'acétate à partir d'acétyl-CoA en deux étapes. La première, catalysée par l'acétyl-CoA:phosphate acétyltransférase (PAT ; EC 2.7.1.2), va permettre la formation de l'intermédiaire réactionnel acétylphosphate et de CoASH à partir d'acétyl-CoA et de phosphate inorganique. La deuxième réaction fait intervenir une acétyltransférase/ATP:acétate phosphotransférase (ACKA ; EC 2.3.1.8) pour convertir l'acétylphosphate en acétate et produire une molécule d'ATP. Cette voie réversible a été identifiée chez les eubactéries comme *E. coli* (Rose, Grunberg-Manago et al. 1954) ou *Salmonella typhimurium* (Fox, Meadow et al. 1986), les archaebactéries (*Methanosarcina thermophila* (Aceti and Ferry 1988)) et plus récemment chez la microalgue eucaryote *Chlamydomonas reinhardtii* (Atteia, van Lis et al. 2006). Aucune voie PAT/ACKA fonctionnelle n'a été identifiée chez les parasites. L'acétylphosphate, intermédiaire à haut potentiel énergétique de cette réaction, intervient dans des processus de régulation cellulaire comme l'assimilation d'azote, l'osmorégulation, la biogénèse de flagelle, l'assemblage du pilus bactérien, la biosynthèse de la capsule, le développement de biofilms et la pathogénicité (Tielens, van Grinsven et al. 2010).

1.5.3.2 L'acétyl-CoA thioestérase

L'acétyl-CoA thioestérase ou acétyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1 ; ACH) catalyse l'hydrolyse de la liaison thioester de l'acétyl-CoA pour produire de l'acétate et du CoASH. Elles sont fréquemment identifiées comme étant des acyl-CoA thioestérases/hydrolases dans la littérature. Initialement nommées « hydrolases », la dénomination « thioestérase » est maintenant préférentiellement utilisée pour désigner les enzymes de ce groupe qui clivent une liaison thioester (Hunt, Yamada et al. 2005). Contrairement aux réactions de synthèse d'acétate que nous venons de décrire, la réaction catalysée par l'ACH ne produit pas d'ATP : l'énergie stockée dans la liaison thioester est libérée sous forme de chaleur. Le rôle physiologique de beaucoup d'acyl-thioestérases n'a pas été élucidé. Elles seraient impliquées dans la régulation de la concentration intracellulaire des acyl-CoA, des acides carboxyliques correspondant et du CoASH (Hunt, Ruitter et al. 2005).

Ces enzymes sont aussi retrouvées dans les peroxysomes et participent au métabolisme des lipides. Chez l'homme, beaucoup de ces enzymes ont été caractérisées, dont une spécifique des acyl-CoA à courtes chaînes qui participerait à la production d'acétate via la β -oxydation dans les peroxysomes (Hunt and Alexson 2008). Dans les mitochondries des plantes, une acétyl-CoA thioestérase produit de l'acétate qui peut ensuite diffuser librement à travers les chloroplastes et participer à la biosynthèse des acides gras (Zeiher and Randall 1990). Une activité acétyl-CoA thioestérase a été détectée chez le nématode *Ascaris suum*, mais le gène correspondant à cette activité n'a pas été identifié dans le génome encore incomplet de ce parasite (de Mata, deBruyn et al. 1997).

En 2006, Yamashita et al ont montré qu'une 3-cétoacyl-CoA thiolase retrouvée dans les mitochondries de cellules de foie chez le rat possédait deux types d'activité : 3-cétoacyl-CoA thiolase et acétyl-CoA hydrolase/thioestérase, cette deuxième activité permettant la production d'acétate. Chacune des activités est inhibée par le substrat de l'autre (Yamashita, Itsuki et al. 2006).

1.5.3.3 Acétyl-CoA synthétase « ADP-forming »

L'acétyl-CoA synthétase « ADP-forming » (EC 6.2.1.13; ACS-ADP) permet la conversion directe d'acétyl-CoA en acétate et la formation d'un ATP à partir d'ADP. Cette activité enzymatique produisant de l'acétate a d'abord été décrite chez *Entamoeba histolytica* (Reeves, Warren et al. 1977) puis chez un autre protiste anaérobie *Giardia lamblia* (Lindmark 1980), les archaebactéries (Musfeldt and Schönheit 2002) et chez *Selenomonas ruminantium*, une bactérie aérobie retrouvée dans le rumen des ruminants (Michel and Macy 1990).

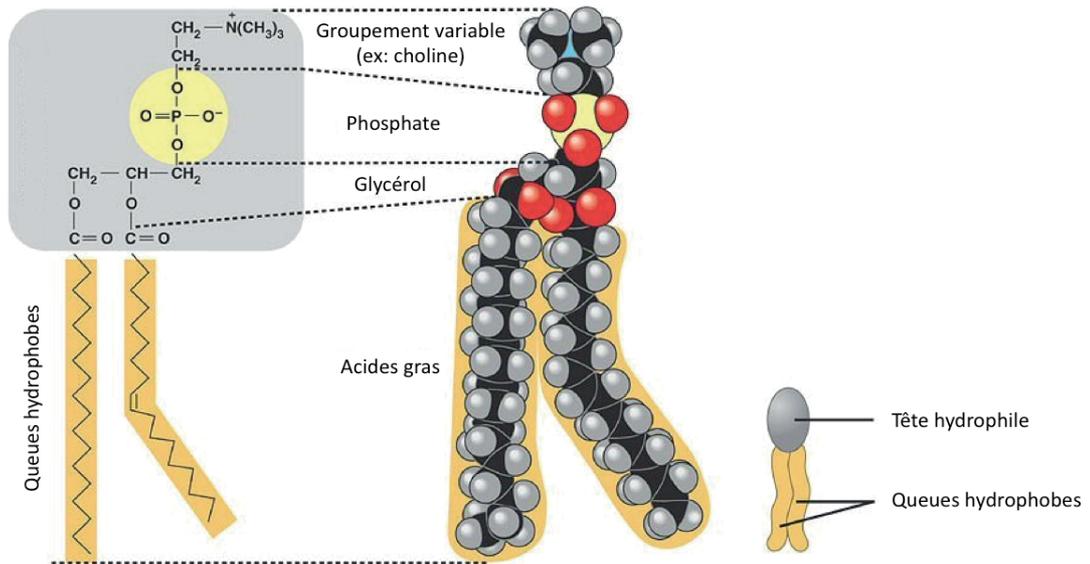
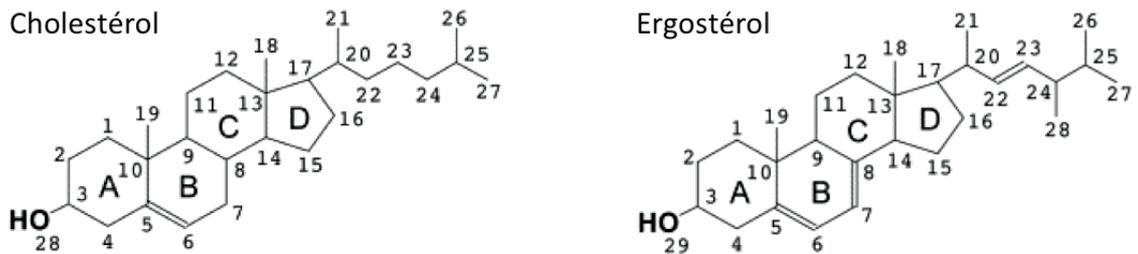
Un homologue du gène de l'ACS-ADP a été identifié dans le génome du parasite *Plasmodium falciparum* (Sánchez, Galperin et al. 2000) et dans une base de données de marqueurs de séquence exprimée (EST, expressed sequence tag) de *Blastocystis hominis* (Stechmann, Hamblin et al. 2008).

1.5.3.4 L'acétyl-CoA synthétase « AMP-forming »

L'acétyl-CoA synthétase (AMP-forming) (EC 6.2.1.1 ; ACS-AMP) a été identifié chez de nombreuses organismes comme les levures (*Saccharomyces cerevisia* (van den Berg, de Jong-Gubbels et al. 1996)), les bactéries (*Escherichia coli* (Kumari, Beatty et al. 2000)) ou les mammifères (souris (Loikkanen, Haghghi et al. 2002)). Bien que la réaction soit réversible, le rôle physiologique de cette enzyme est la production d'acétyl-CoA à partir d'acétate (Starai and Escalante-Semerena 2004). L'ACS-AMP catalyse la synthèse d'acétyl-CoA par un mécanisme ping-pong. Lors de cette réaction, l'enzyme fixe tout d'abord l'ATP, puis l'acétate conduisant à la formation d'un intermédiaire acétyl-AMP et à la libération de pyrophosphate. L'enzyme fixe ensuite du CoA libre, forme de l'acétyl-CoA et libère l'AMP.

1.5.4 La navette acétate chez les trypanosomes

C'est en étudiant l'éventuel rôle de l'acétyl-CoA synthétase "AMP-forming" (AceCS) de *T. brucei* dans la production de l'acétate mitochondrial, que Rivière et al. identifièrent au laboratoire une nouvelle voie métabolique appelée "la navette acétate" (Rivière, Moreau et al. 2009). L'acétyl-CoA produit dans les mitochondries à partir des différentes sources de carbone doit être transféré vers le cytosol pour initier la biosynthèse *de novo* des acides gras. La plupart des eucaryotes utilisent une navette citrate/malate pour effectuer ce transfert : la citrate synthase (CS) du cycle de l'acide tricarboxylique catalyse la réaction de production de citrate à partir d'acétyl-CoA et d'oxaloacétate. Le citrate ainsi produit passe à travers la membrane mitochondriale *via* un transporteur de citrate ou un échangeur citrate/malate et est reconverti en acétyl-CoA par la citrate lyase (CL) cytosolique. Chez la forme procyclique de *T. brucei*, il a été observé que le seul gène présentant une similarité modérée avec la CL n'est pas impliqué dans la biosynthèse des acides gras à partir du glucose, suggérant ainsi que la navette citrate n'existerait pas chez les trypanosomes (Rivière, Moreau et al. 2009). Le transfert de l'acétyl-CoA de la mitochondrie vers le cytosol se fait par l'intermédiaire de la production d'acétate. Dans cette navette acétate, l'acétyl-CoA est converti en acétate dans la mitochondrie par l'ASCT et une autre activité non identifiée. L'acétate traverse la membrane interne de la mitochondrie par simple diffusion ou *via* un transporteur puis est reconverti en acétyl-CoA dans le cytosol par l'AceCS (Rivière, Moreau et al. 2009).

A**B****Figure 24 : Structure des lipides**

A, phospholipide

B, comparaison des structures du cholestérol (à gauche) et de l'ergostérol (à droite)

1.6 Biosynthèse lipidique

Les lipides regroupent divers composés dont la caractéristique commune est d'être insolubles dans l'eau (à l'exception des GIPC, glycosyl-inositol-phosphorylceramides et de certains gangliosides qui peuvent être solubles ou avoir une certaine solubilité en milieux aqueux). Les fonctions biologiques de ces lipides sont diverses. Ce sont les principales sources de stockage d'énergie pour beaucoup d'organismes. Les phospholipides et les stérols sont les composants majeurs des membranes biologiques. D'autres lipides peuvent avoir un rôle de cofacteur, de transporteur d'électrons, de chaperonnes, de messager intracellulaire ou intercellulaire ou encore permettre l'ancrage des protéines aux membranes.

1.6.1 Les principaux types de lipides

1.6.1.1 Les acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques composés d'une chaîne carbonée de 4 à 36 carbones (C4 à C36). Cette chaîne peut être linéaire (acide gras saturé) ou comporter des doubles liaisons (acide gras mono ou polyinsaturé). La chaîne carbonée confère à la molécule son caractère hydrophobe.

1.6.1.2 Les glycérophospholipides

Ces lipides, aussi appelés phosphoglycérides, sont des lipides membranaires dans lesquels deux acides gras sont liés par une liaison ester au premier et second carbone d'une molécule de glycérol. Un groupement polaire ou chargé est lié sur le troisième carbone du glycérol par une liaison phosphodiester. Ce groupement peut être la choline (phosphatidylcholine, PC), la serine (phosphatidylserine, PS), l'éthanolamine (phosphatidyléthanolamine, PE) ou encore l'inositol (phosphatidylinositol, PI). La charge de ces groupements contribue aux propriétés de la surface membranaire. Il existe également des éther-glycérophospholipides dans lesquels la liaison ester du C1 du glycérol est remplacée par une liaison éther. La nature des acides gras liés au glycérol varie, donc deux phospholipides d'un même groupe peuvent avoir une composition en acides gras différente (Fig. 24A).

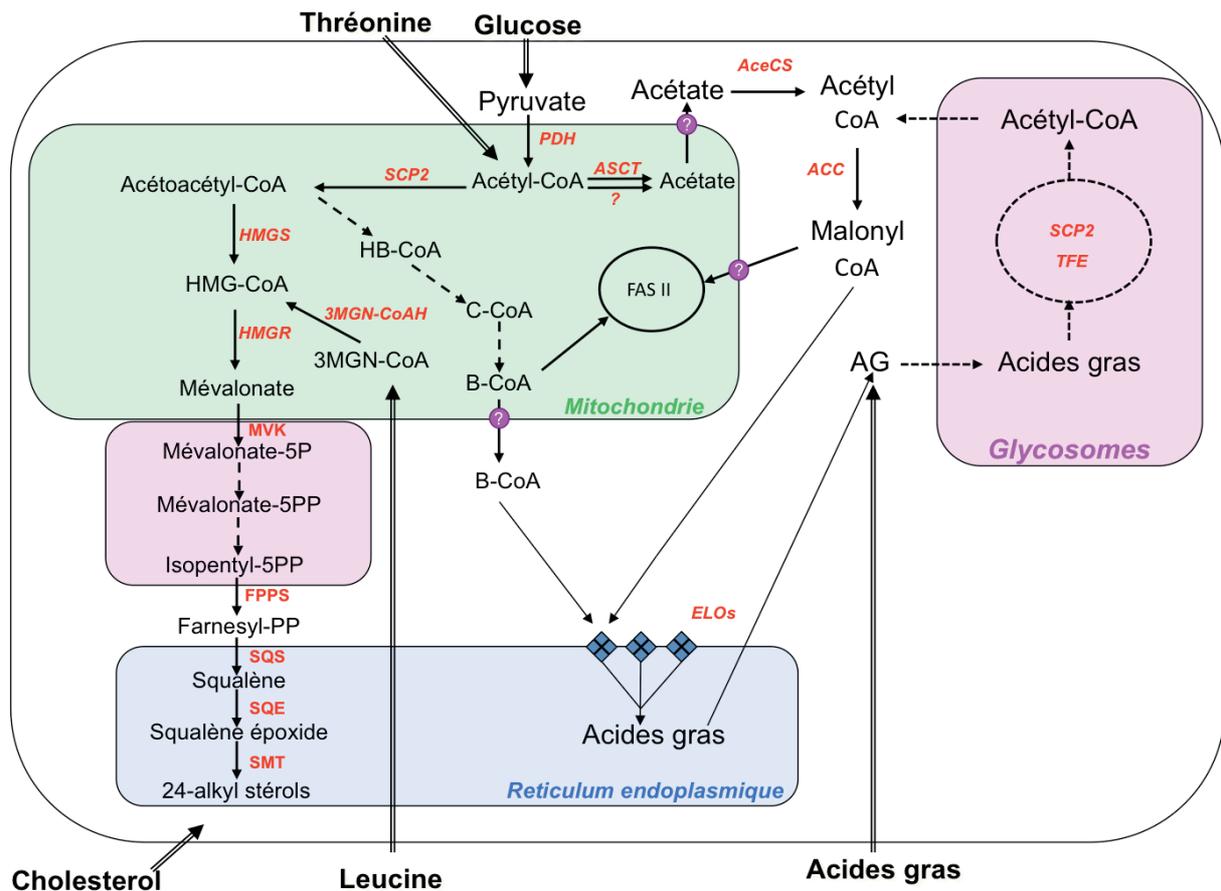


Figure 25 : Représentation schématique des voies de biosynthèses des lipides chez *T. brucei*

Les flèches pleines représentent les étapes enzymatiques connues. Les flèches en pointillées représentent les étapes enzymatiques supposées. Les flèches doubles représentent les sources externes pour la biosynthèse des lipides. Les glycosomes sont représentés en rose, la mitochondrie en vert et le réticulum endoplasmique en bleu. Les cercles violets avec un point d'interrogation représentent d'éventuels transporteurs non identifiés. **Abréviations :** AG, acides gras ; B-CoA, butyryl-CoA ; C-CoA, crotonoyl-CoA ; HB-CoA, hydroxybutyryl-CoA ; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA ; 3MGN-CoA, 3-méthylglutaconyl-CoA. **Enzymes :** ?, enzyme inconnue ; ACC, acétyl-CoA carboxylase ; AceCS, acétyl-CoA synthétase AMP-forming ; ASCT, acétate:succinate-CoA transférase ; FPPS, farnésyl diphosphate synthase ; HMGS, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A synthase ; HMGR, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase ; 3MGN-CoAH, 3-méthylglutaconyl-CoA hydratase ; MVK, mévalonate kinase ; PDH, complexe pyruvate déshydrogénase ; SCP2,sterol carrier protein type-2 thiolase ; SMT, stérol 24-méthyl transférase ; SQS, squalène synthase ; SQT, squalène époxidase ; TFE, trifunctional enzyme

1.6.1.3 Les stérols

Les stérols dérivent d'un noyau cyclopentanophénanthrénique. La structure des divers stérols diffère et on les distingue par leurs insaturations. On retrouve notamment le cholestérol chez les mammifères, l'ergostérol chez les champignons et certains protozoaires comme *T. brucei*, et les hormones stéroïdes (estrogène, progestérone, cortisol, etc.) (Fig. 24B). L'ergostérol diffère du cholestérol par un groupement méthyl supplémentaire sur le carbone 24 (C24) et deux doubles liaisons, l'une sur le C7 et l'autre sur le C22.

1.6.2 La biosynthèse *de novo* des lipides chez *T. brucei*

Une représentation schématique des voies de biosynthèse des lipides est proposée dans la figure 25.

1.6.2.1 Composition lipidique de *T. brucei*

La composition globale en lipides des formes sanguines et de la forme procyclique est similaire à ce qui est décrit chez les autres eucaryotes, la PC et la PE étant les plus abondantes (45 à 60% des phospholipides, Fig. 26). Le PI, la PS, le phosphatidylglycérol et la cardiolipine sont présents en quantités moins importantes. *T. brucei* contient également des sphingolipides comme la sphingomyéline, l'inositol phosphocéramide et l'éthanolamine phosphocéramide (10-15%). La composition en phospholipides varie cependant quelque peu entre les deux formes du parasite (Smith and Butikofer 2010). La principale différence est la présence d'inositol phosphocéramide chez la forme procyclique mais pas chez les formes sanguines (Richmond, Gibellini et al. 2010). Les mêmes longueurs de chaînes et degrés d'insaturations des acides gras sont retrouvés pour la PI et PE chez les formes sanguines et la forme procyclique mais la répartition est différente. Chez la forme procyclique, la quantité de glycérophospholipides contenant des chaînes d'acides gras polyinsaturées est diminuée en comparaison à ce qui est observé chez les formes sanguines. *T. brucei* contient également une importante proportion d'éther glycérophospholipides, en particulier pour la PE (73 à 84%) et la PS (60 à 88%) (Smith and Butikofer 2010). Par ailleurs, la nature des chaînes d'acides gras synthétisés *de novo* diffère entre les formes sanguines et la forme procyclique (Dixon and Williamson 1970, Patnaik, Field et al. 1993). Les formes sanguines synthétisent majoritairement du myristate (C14), acide gras qui entre dans la composition de l'ancre GPI des VSG (Ferguson and Cross 1984) et la forme procyclique du palmitate (C16) et du stéarate (C18). La forme procyclique synthétise également dans une moindre mesure du myristate (Morita, Paul et al. 2000, van Weelden, van Hellemond et al. 2005). Une étude a montré que le cholestérol constituait 95% des stérols totaux chez les formes sanguines.

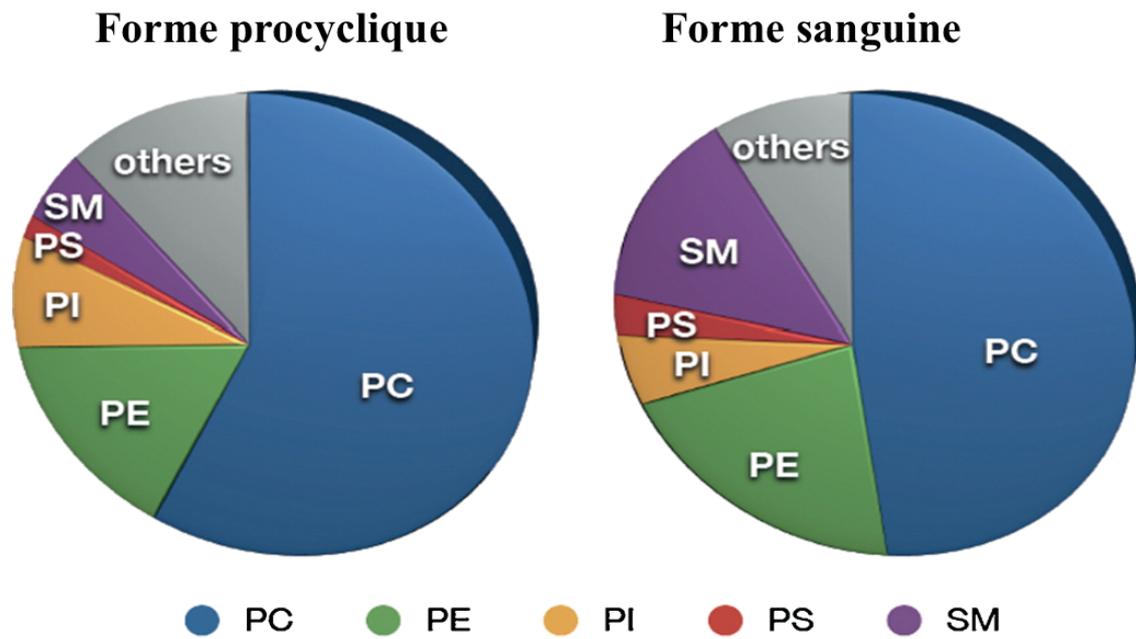


Figure 26 : Distribution relative des différentes classes de phospholipides chez *T. brucei*

D'après Smith et al., 2010

PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidyléthanolamine; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylsérine; SM, sphingomyéline.

Chez la forme procyclique, le cholesta-5,7,24-triénol, le cholestérol et l'ergosta-5,7,25(27)-triénol sont les stérols les plus abondants, représentant plus de 84% de la quantité totale de stérols (Zhou, Cross et al. 2007). Les différences de composition lipidique peuvent être dues à la nécessité d'adapter la structure des membranes en fonction de l'hôte (van Hellemond and Tielens 2006).

1.6.2.2 Biosynthèse *de novo* des acides gras

Il a très longtemps été considéré que les formes sanguines de *T. brucei* ne synthétisent pas d'acides gras mais incorporent ces lipides depuis leur environnement. En effet une étude publiée en 1971 montrait que, contrairement à ce qui avait été découvert chez de nombreux procaryotes et eucaryotes, le [¹⁴C]-acétate n'est pas incorporé dans les acides gras chez ces parasites (Dixon, Ginger et al. 1971). En revanche, les acides gras radio-marqués sont assimilés par les formes sanguines de *T. brucei* (Voorheis 1980, Mellors and Samad 1989). Les recherches suivantes ont conclu que les sources d'acides gras chez ce parasite étaient les esters de cholestérols et les phospholipides exogènes (Coppens and Courtoy 1995, Green, Del Pilar Molina Portela et al. 2003). Plusieurs observations ont cependant conduit à remettre en cause ce postulat. Premièrement, une étude a montré qu'il était possible de marquer les acides gras à partir de [¹⁴C]-thréonine chez les formes sanguines (Cross, Klein et al. 1975). De plus, les deux acides gras de l'ancre GPI des VSG sont du myristate (C14) (Ferguson and Cross 1984). Or, la concentration du myristate est trop faible dans le sang de l'hôte pour supporter la myristoylation des VSG, confirmant ainsi la nécessité d'un système de synthèse des acides gras (Paul, Jiang et al. 2001). Le séquençage du génome du parasite a par la suite confirmé que *T. brucei* contient les gènes codant les enzymes nécessaires à la biosynthèse des acides gras (Berriman, Ghedin et al. 2005, Smith and Bütikofer 2010). La forme procyclique de *T. brucei* quant à elle est capable de synthétiser *de novo* des acides gras (Gilbert, Klein et al. 1983). Des études biochimiques menées sur les deux formes de *T. brucei* ont montré que comme pour les autres organismes, le malonyl-CoA (C2) sert de donneur de carbones pour la biosynthèse des acides gras. Le manonyl-CoA est produit à partir d'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase cytosolique (Tb927.8.7100) (Vigueira and Paul 2011). Les trypanosomes présentent cependant des particularités. Alors que les autres organismes produisent les acides gras par un système de synthèses de type I ou II, les trypanosomes ont développé un autre mécanisme; ils utilisent les élongases du réticulum endoplasmique pour la synthèse de la plupart des acides gras, lesquelles sont utilisées par les autres organismes pour l'élongation les acides gras pré-existants (Lee, Stephens et al. 2006).

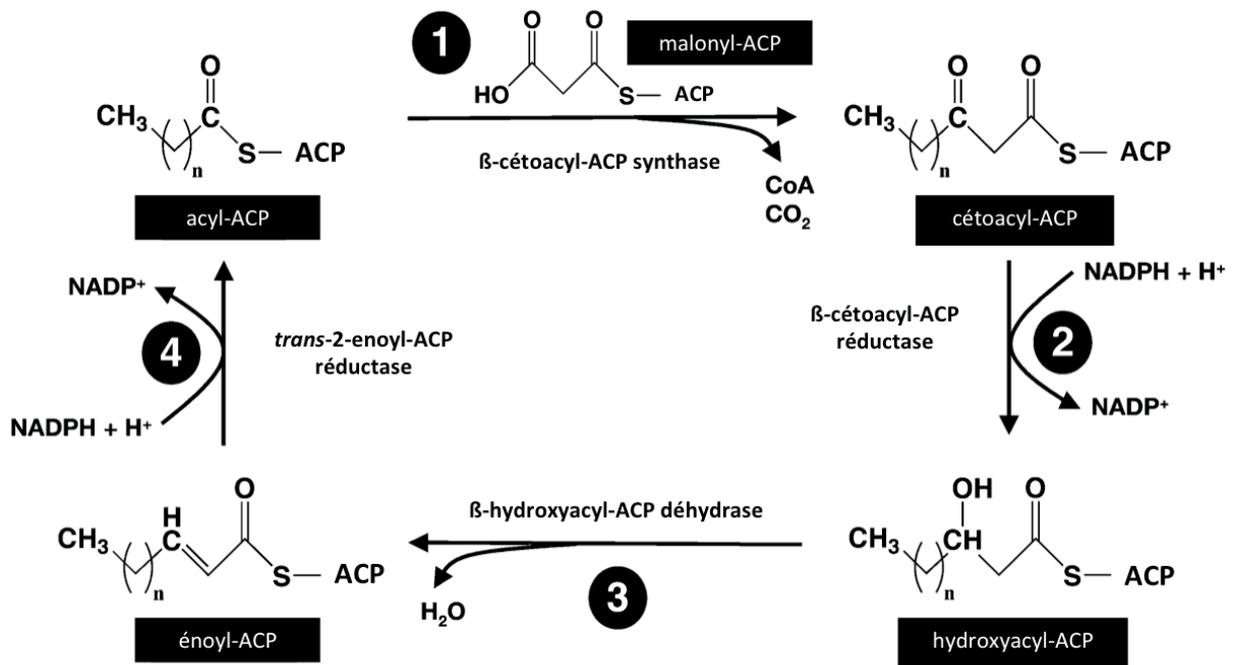


Figure 27 : Schéma réactionnel du système FAS

De plus, le précurseur de cette voie de biosynthèse n'est pas l'acétyl-CoA comme dans d'autres systèmes mais le butyryl-CoA (Morita, Paul et al. 2000). Cependant, la voie de production du butyryl-CoA n'est à l'heure actuelle pas connue. Les trypanosomes possèdent également un système de synthèses de type II mitochondrial qui semble dédié à la production de certains acides gras et dont la contribution globale est nettement inférieure à la voie des élongases (10% versus 90% respectivement *in vitro*, (Stephens, Lee et al. 2007).

1.6.2.2.1 Les acides-gras synthèses

Les cellules peuvent synthétiser les acides gras grâce à deux systèmes : FAS I (Fatty Acid Synthases type I), retrouvé dans le cytosol des eucaryotes, et FAS II, présent chez les bactéries et les mitochondries d'eucaryotes. Dans le système FAS I, les activités enzymatiques sont localisées sur des domaines séparés d'un ou deux polypeptides. Le système FAS II catalyse les mêmes réactions enzymatiques que FAS I mais sur des polypeptides séparés. Chaque système contient une protéine porteuse d'acyl (ACP, Acyl Carrier Protein) avec un groupement prosthétique phosphopantéthéine. L'ACP va permettre de véhiculer la chaîne acyle en élongation vers les différents sites actifs de l'acide gras synthase, permettant ainsi d'effectuer un cycle de réactions. A chaque cycle, la chaîne acyle liée à une ACP est condensée avec du malonyl-ACP par l'activité β -cétol-ACP synthase. Le β -cétol-ACP est ensuite réduit par une β -cétol-ACP réductase, déshydraté par une β -hydroxyacyl-ACP déshydratase et de nouveau réduit par une trans-2-enoyl ACP réductase. Ainsi, à chaque cycle, deux carbones provenant du malonyl-ACP sont ajoutés à la chaîne acyle en élongation (Fig. 27). Le génome de *T. brucei* ne contient pas de gène codant pour le système FAS de type I. En revanche, des gènes candidats codants tous les composants du système FAS II sont présents dans le génome de ce parasite et les enzymes correspondantes sont localisées dans la mitochondrie (Stephens, Lee et al. 2007, Autio, Guler et al. 2008). Cependant, la plupart des acides gras cellulaires sont synthétisés par un autre système impliquant des élongases du réticulum endoplasmique (Lee, Stephens et al. 2006, Lee, Stephens et al. 2007). Le système FAS II aurait un rôle spécifique : il produirait l'acide octanoïque (C8) nécessaire à la synthèse de l'acide lipoïque, cofacteur de plusieurs enzymes mitochondriales, telles que la PDH. Ce phénomène est également retrouvé chez les levures, les hommes et les plantes (Brody, Oh et al. 1997, Wada, Shintani et al. 1997, Zhang, Joshi et al. 2005, Lee, Stephens et al. 2007). Le système FAS II sert également à synthétiser des acides gras jusqu'à 16 carbones probablement utilisés dans la mitochondrie (Stephens, Lee et al. 2007).

Les mutants ARNi ou knockout de l'ACP (Tb927.3.860) présentent un important phénotype de croissance chez les formes sanguines et la forme procyclique et une diminution de la production des acides gras (Stephens, Lee et al. 2007). De plus, l'inhibition de cette protéine affecte la morphologie, la fonction respiratoire et le potentiel de membrane de la mitochondrie des deux formes du parasite (Guler, Kriegova et al. 2008) ainsi que des changements au niveau du kinétoplaste chez les formes sanguines (Clayton, Guler et al. 2011). Initialement, trois composants du système FAS de *T. brucei* ont été identifiés par homologie avec les enzymes du système FAS des levures, i.e. β -cétacyl-ACP synthase (Tb927.2.3910), β -cétacyl-ACP réductase (KAR2, Tb927.8.6420) et trans-2-enoyl ACP réductase, cependant ces gènes n'ont pas été étudiés pour le moment (Stephens, Lee et al. 2007). En 2008, le gène codant pour la 4^{ième} activité enzymatique du FAS, β -hydroxyacyl-ACP déshydratase (TbHTD2, Tb927.8.1440), a été identifié chez *T. brucei* par homologie avec une hydratase mitochondriale humaine. Il a été démontré que cette enzyme est localisée dans la mitochondrie et possède une activité hydratase. De plus, l'expression de TbHTD2 chez une souche de *Saccharomyces cerevisiae* déficiente en cette activité restaure le phénotype respiratoire et la production d'acide lipoïque (Autio, Guler et al. 2008). Le précurseur de ce système FAS II n'a pas été identifié. En revanche, des essais ont montré que les mitochondries isolées à partir de cellules procycliques n'utilisaient pas le butyryl-CoA exogène pour synthétiser les acides gras. La présence ou l'absence de cet acyl-CoA ne modifie ni le niveau de production ni la longueur des chaînes des acides gras synthétisés (Lee, Stephens et al. 2007). Le système FAS II doit donc utiliser un précurseur endogène à la mitochondrie.

1.6.2.2.2 Le système ELO

Ce système a été identifié pour la première fois chez la levure (Toke and Martin 1996). Le système élongases (ELO) fait intervenir des réactions similaires à celles retrouvées dans les systèmes FAS, à la différence que les groupements acyl et malonyl sont estérifiés au CoA et non à une ACP (Fig. 27). La première des quatre étapes enzymatiques du cycle d'élongation des acides gras est assurée par les ELO (β -cétacyl-CoA synthase), qui sont des protéines membranaires du réticulum endoplasmique (Kohlwein, Eder et al. 2001). Des homologues ont par la suite été identifiés chez les mammifères (Jakobsson, Westerberg et al. 2006). Chez les plantes, des élongases ont également été caractérisées mais ne sont pas homologues de celles des mammifères et des levures (Zank, Zähringer et al. 2002, Paul, Gable et al. 2006).

Chez les eucaryotes, les élongases permettent l'élongation des acides gras à longue chaîne synthétisés par le système FAS, comme le palmitate (C16) chez les mammifères (Moon, Shah et al. 2001). Les trypanosomes ont adapté ce système pour la biosynthèse *de novo* des acides gras. Quatre élongases ont été identifiées chez *T. brucei* (ELO1 à 4) (Lee, Stephens et al. 2006). ELO1 et ELO2 (Tb927.7.4180 et Tb927.7.4170) utilisent le malonyl-CoA (élongateur, « donneur de carbones ») pour l'élongation du butyryl-CoA (précurseur) en myristate (C14), ELO1 convertissant le C4 en C10 et ELO2 le C10 en C14. Ce myristate peut être incorporé dans les GPI des VSG ou bien allongé par ELO3 (Tb927.7.4160) en C16 et C18. Ces derniers entrent dans la composition des GPI et des phospholipides ou bien sont modifiés par les acides gras désaturases avant d'être intégrés dans des phospholipides. Chez les formes sanguines, ELO3 est peu active, le myristate est donc le principal acide gras produit par ces formes (Lee, Stephens et al. 2006). ELO4 (Tb927.5.4530) catalyse l'élongation de l'arachidonate (C20:4 provenant du milieu extra cellulaire) en C22:4 qui sera allongé ou désaturé. Chez la forme procyclique, le système ELO est essentiel. En effet, le mutant ARNi de la trans-2-enoyl-CoA réductase, une enzyme de ce système, entraîne un arrêt de la croissance. En revanche, chez les formes sanguines, les simples mutants knock-out des quatre élongases sont viables (Lee, Stephens et al. 2006). Les homologues de la β -cétocoacyl-CoA réductase et de la β -hydroxyacyl-CoA déshydratase n'ont pas encore été identifiés.

1.6.2.2.3 β -oxydation

La β -oxydation permet la formation d'acétyl-CoA à partir de la dégradation des acides gras. Le génome de *T. brucei* contient des gènes candidats pour les 4 étapes enzymatiques nécessaires à cette voie (Berriman, Ghedin et al. 2005) et les activités enzymatiques ont été identifiées. Cependant, l'existence de cette voie n'a pas été démontrée chez ce parasite; si elle existe, il semble qu'elle soit peu ou pas utilisée dans les conditions standards de culture des formes sanguines et de la forme procyclique (Colasante, Ellis et al. 2006).

1.6.2.3 Biosynthèse *de novo* des stérols

Les trypanosomes africains ne synthétisent pas de cholestérol *de novo*, mais ils synthétisent de l'ergostérol ou d'autres stérols alkylés en C24 similaires aux plantes et champignons (Roberts, McLeod et al. 2003). Cependant, quand le cholestérol est présent dans l'environnement il est incorporé par le parasite sous forme de LDL-cholesterol (LDL, low density lipoprotein) par endocytose médiée par des récepteurs de LDL (Coppens and Courtoy 2000).

Le LDL-cholesterol est ensuite dégradé au niveau des lysosomes et le cholestérol libéré dans le cytosol (Coppens and Courtoy 1995, Coppens, Levade et al. 1995). Si les formes sanguines sont très dépendantes de ce cholestérol exogène, la forme procyclique peut s'adapter et ajuster la biosynthèse *de novo* d'ergostérol en fonction des disponibilités de cholestérol du milieu extérieur. Cependant, il a récemment été démontré que la biosynthèse *de novo* des stérols se produisait également chez les formes sanguines de *T. brucei* (Nes, Singha et al. 2012).

Le précurseur de cette voie de biosynthèse est l'acétyl-CoA mitochondrial (Carrero-Lerida, Perez-Moreno et al. 2009, Mazet, Harijan et al. 2011). Le génome code pour une thiolase mitochondriale apparentée à la famille SCP2 (Tb927.8.2540), qui pourrait condenser deux molécules d'acétyl-CoA pour donner une molécule acétoacétyl-CoA. Cependant, l'implication de cette enzyme dans la biosynthèse des stérols n'a pas été montrée expérimentalement. L'acétoacétyl-CoA est ensuite converti dans la mitochondrie en 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) par une HMG-CoA synthase (HMGS) puis en mévalonate par une HMG-CoA réductase (HMGR, Tb927.6.4540) (Heise and Opperdoes 2000, Carrero-Lerida, Perez-Moreno et al. 2009). Le mévalonate est ensuite converti en mévalonate 5-phosphate par une mévalonate kinase (Tb927.4.4070) dans les glycosomes. La succession d'étapes enzymatiques (qui n'ont pas toutes été caractérisées) dans les glycosomes et le cytosol (Ferella, Li et al. 2008) aboutira à la biosynthèse d'ergostérol dans le réticulum endoplasmique (Carrero-Lerida, Perez-Moreno et al. 2009, Pérez-Moreno, Sealey-Cardona et al. 2012).

II - RESULTATS

Durant mes trois années de thèse, j'ai entrepris l'étude de différents aspects du métabolisme de l'acétate et de l'acétyl-CoA, éléments clés du métabolisme intermédiaire chez la forme procyclique de *T. brucei*.

Nous avons vu en introduction que l'acétate est produit à partir du glucose dans la mitochondrie de la forme procyclique de *T. brucei* via l'ASCT. Cependant le mutant de cette enzyme produit toujours de l'acétate. J'ai consacré la première partie de ma thèse à la caractérisation de l'alternative à l'ASCT pour la production d'acétate à partir du glucose. Existe-t-il une ou plusieurs enzymes capables de produire l'acétate ? Quelles sont les caractéristiques de cette (ou de ces) enzyme(s) ? D'après la littérature, l'ASCT formerait un cycle avec la succinyl-CoA synthétase permettant la production d'ATP, mais cela n'avait pas encore été formellement démontré. Je me suis donc ensuite intéressé à cette production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat dans la mitochondrie des parasites afin de confirmer, ou d'infirmer, l'hypothèse selon laquelle l'ASCT contribuerait à cette production d'ATP. J'ai également étudié la contribution (ou non) de l'activité (ou des activités) permettant également la synthèse d'acétate dans la production d'ATP.

Dans un second temps, j'ai étudié la voie de dégradation de la thréonine qui, bien qu'acceptée par la communauté scientifique, n'a jusqu'alors pas été caractérisée. L'étude de cette voie nous a amené à nous poser plusieurs questions auxquelles j'ai tenté de répondre. Si la thréonine est bien catabolisée par le parasite, quels sont les métabolites produits par cette voie de dégradation ? Quelles sont les activités enzymatiques qui contribuent à la dégradation de la thréonine ? Quelle est l'importance de la thréonine dans le métabolisme de la forme procyclique de *T. brucei* ? Cette voie est-elle régulée ?

Après avoir étudié la production d'ATP liée à la biosynthèse d'acétate à partir du glucose, je me suis intéressé à la contribution éventuelle de la voie de dégradation de la thréonine pour la production d'ATP dans la mitochondrie du parasite. En effet, si la dégradation de la thréonine aboutit à la production d'acétate et que l'ASCT contribue à cette voie, la thréonine pourrait participer à la production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat. Si tel est le cas, quelle est la contribution relative du glucose et de la thréonine dans cette production d'ATP ? Nous verrons que nos résultats nous ont conduit vers l'hypothèse d'une « séparation » des deux voies de dégradation bien qu'elles partagent les étapes enzymatiques aboutissant à la production d'acétate.

Nous avons montré que l'acétate est produit dans la mitochondrie de la forme procyclique de *T. brucei* à partir de l'acétyl-CoA provenant de la dégradation du glucose et de la thréonine. Grâce à une navette acétate, l'acétyl-CoA produit dans la mitochondrie est transféré vers le cytosol et permet d'alimenter la biosynthèse *de novo* des acides gras. Je me suis intéressé à la biosynthèse *de novo* des acides gras et des stérols chez les mutants ne produisant plus d'acétyl-CoA à partir du glucose, de la thréonine ou des deux sources de carbone. Nous verrons ainsi que dans les conditions où la cellule ne peut pas utiliser l'une ou l'autre de ces deux sources de carbone, le flux de dégradation de la source disponible est redirigé vers la biosynthèse des acides gras.

Enfin, nous savons que la production d'acétate est nécessaire à la biosynthèse *de novo* des acides gras par un mécanisme de navette acétate (Rivière, Moreau et al. 2009). Chez *T. brucei*, la majorité des acides gras sont produits par un mécanisme unique utilisant des élongases. Ce mécanisme a été adapté par le parasite pour la production *de novo* des acides gras et non uniquement pour l'élongation des acides gras pré-existants comme observé chez d'autres organismes. Une autre particularité du modèle *T. brucei* est l'utilisation du butyryl-CoA comme précurseur de cette biosynthèse, et non l'acétyl-CoA comme dans la plupart des organismes. Cependant, la voie de biosynthèse du butyryl-CoA n'est à l'heure actuelle pas connue. Nous avons donc recherché dans le génome de *T. brucei* d'éventuels gènes pouvant intervenir dans la voie de biosynthèse pour cet acyl-CoA. Je me suis concentré sur la caractérisation d'une enzyme de cette voie de biosynthèse hypothétique, l'isovaléryl-CoA déshydrogénase (IVDH).

2.1 Article I : ATP synthesis-coupled and -uncoupled acetate production from acetyl-CoA by the mitochondrial acetate:succinate CoA-transferase and acetyl-CoA thioesterase in *Trypanosoma*

2.1.1 Résumé de l'article

En 2004, Rivière et al. ont caractérisé le gène *ASCT* et montré que chez la forme procyclique de *T. brucei*, l'activité ASCT permettait la production d'acétate à partir d'acétyl-CoA dans la mitochondrie de ces parasites. Cependant, le gène n'est pas essentiel et l'ASCT n'est pas la seule activité enzymatique impliquée dans la production d'acétate. En effet, les mutants n'exprimant plus l'ASCT sont viables et la production d'acétate à partir du glucose n'est que modérément réduite.

Avant mon arrivée au laboratoire, le génome de *T. brucei* a été étudié afin d'identifier des gènes codants potentiellement des enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA en acétate dans la mitochondrie. Ainsi, aucun homologue des enzymes de la voie PAT/ACKA et de l'AceCS ADP-forming n'a été trouvé. Un gène codant une AceCS AMP-forming avait déjà été identifié, mais cette enzyme permet la conversion de l'acétate en acétyl-CoA dans le cytosol (Rivière et al 2009). Enfin, un homologue d'une acyl-CoA hydrolase/thioestérase (ACH) a été trouvé. Le mutant Δach produit au laboratoire ne présente pas de phénotype de croissance et l'analyse des métabolites excrétés par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton a révélé que ce simple mutant produisait toujours de l'acétate à partir du glucose. En revanche, le double mutant $\Delta ach/^{ARNi}ASCT$ après induction par la tétracycline n'est pas viable et ne produit plus d'acétate à partir du glucose. L'ACH contient une séquence d'adressage mitochondrial prédite par le programme Mitoprot. Pour vérifier cette localisation, un mutant exprimant l'ACH couplée à la GFP a été produit. Le signal fluorescent émis par la GFP a révélé une localisation mitochondriale. Un anticorps anti-ACH et un mutant surexprimant l'ACH (le niveau d'expression de cette protéine étant faible dans la souche parentale) ont également été produits. J'ai ainsi pu confirmer la localisation de l'ACH dans la mitochondrie par une technique d'immunofluorescence. J'ai également montré que cette enzyme avait une activité acyl-CoA thioestérase capable d'hydrolyser les acyl-CoA à courtes chaînes, particulièrement l'acétyl-CoA (C2) et les acyl-CoA en C4.

Il a été démontré que la forme procyclique de *T. brucei* utilise une "navette acétate", et non la navette citrate identifiée chez tous les eucaryotes, pour transférer l'acétyl-CoA de la mitochondrie vers le cytosol et ainsi initier la biosynthèse des acides gras (Rivière et al 2009).

L'acétate provenant de la dégradation du glucose étant produit par l'ACH et l'ASCT, nous avons analysé, en collaboration avec l'équipe de Patrick Moreau (CNRS UMR 5200, Bordeaux), la biosynthèse des acides gras à partir de [¹⁴C]-glucose chez le double mutant $\Delta ach/^{ARNi}ASCT$. Après induction, ce mutant n'incorpore plus la radioactivité provenant du glucose dans les acides gras, les glycérophospholipides et les stérols (non montré dans l'article pour les stérols). Chez la forme procyclique de *T. brucei*, l'ATP mitochondrial est produit par phosphorylation oxydative grâce à la F₀/F₁-ATP synthase (F₀/F₁-ATP ϵ) et par phosphorylation au niveau du substrat (Bochud-Allemann and Schneider 2002). La production d'acétate par l'ASCT est considérée comme étant couplée à une production d'ATP grâce à un cycle que formerait l'ASCT avec la succinyl-CoA synthétase (SCoAS). Mais cette hypothèse n'a pas été expérimentalement prouvée. Pour étudier l'implication de l'ASCT, et éventuellement de l'ACH dans la production d'ATP, j'ai soumis les simples mutants Δach et $\Delta asct$ à différentes concentrations d'oligomycine, un inhibiteur spécifique de la F₀/F₁-ATP ϵ , afin d'inhiber la production d'ATP par phosphorylation oxydative chez ces mutants et d'évaluer le rôle de ces deux activités enzymatiques dans la production d'ATP. Dans un milieu riche en glucose, le $\Delta asct$ est ainsi ~1000 fois plus sensible à l'oligomycine que la souche parentale et le Δach , montrant que le cycle ASCT/ScoAS contribue à la production d'ATP dans la mitochondrie, alors que l'ACH n'est pas impliquée dans la production d'ATP. Ces résultats ont été confirmés en comparant l'inhibition par ARNi de l'expression de la sous-unité F_{1B} de la F₀/F₁-ATP ϵ , dans le fond génétique sauvage, Δach et $\Delta asct$. En effet, le double mutant $\Delta asct/^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1B}$ est létal, alors que les mutants $^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1B}$ et $\Delta ach/^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1B}$ sont viables.

En conclusion, ces travaux démontrent que l'acétate provenant de la dégradation du glucose est produit dans la mitochondrie par l'ACH et l'ASCT chez la forme procyclique de *T. brucei*. Il s'agit de la seule voie permettant de produire l'acétate nécessaire à la biosynthèse des acides gras. De plus, l'ASCT, mais pas l'ACH, est impliquée dans la production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat dans la mitochondrie, et est essentielle en absence de phosphorylation oxydative. Par ailleurs, les phénotypes de croissance des mutants $^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1B}$ et $^{ARNi}ASCT$ sont similaires et la diminution de la concentration intracellulaire d'ATP dans ces deux mutants est comparable. La contribution du cycle ASCT/SCoAS et de la F₀/F₁-ATP ϵ pour la production de l'ATP mitochondrial semble donc être équivalente.

2.1.2 Article

ATP Synthesis-coupled and -uncoupled Acetate Production from Acetyl-CoA by Mitochondrial Acetate:Succinate CoA-transferase and Acetyl-CoA Thioesterase in *Trypanosoma*^{*[5]}

Received for publication, February 22, 2012, and in revised form, March 30, 2012. Published, JBC Papers in Press, April 2, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.355404

Yoann Millerieux^{‡1}, Pauline Morand^{‡1}, Marc Biran[‡], Muriel Mazet[‡], Patrick Moreau[§], Marion Wagnies[‡], Charles Ebikeme[‡], Kamel Deramchia[‡], Lara Gales^{¶||**}, Jean-Charles Portais^{¶||**}, Michael Boshart^{‡‡}, Jean-Michel Franconi[‡], and Frédéric Bringaud^{‡2}

From the [‡]Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536, Université Bordeaux Segalen, CNRS, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France, the [§]Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200, Université Bordeaux Segalen, CNRS, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France, the [¶]Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Ranguieu, F-31077 Toulouse, France, the ^{||}INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France, ^{**}CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France, ^{‡‡}Biozentrum, Genetik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Grosshadernerstr. 2-4, D-82152 Martinsried, Germany

Background: Mitochondrial acetate production is essential for viability of the procyclic trypanosomes and probably many other protists.

Results: We identified an acetyl-CoA thioesterase (ACH) contributing to acetate production from acetyl-CoA.

Conclusion: Acetate production by ASCT, but not by ACH, is involved in ATP production.

Significance: In trypanosomes and probably other protists, ASCT/SCoAS cycle-derived ATP production can substitute for oxidative phosphorylation.

Insect stage trypanosomes use an “acetate shuttle” to transfer mitochondrial acetyl-CoA to the cytosol for the essential fatty acid biosynthesis. The mitochondrial acetate sources are acetate:succinate CoA-transferase (ASCT) and an unknown enzymatic activity. We have identified a gene encoding acetyl-CoA thioesterase (ACH) activity, which is shown to be the second acetate source. First, RNAi-mediated repression of ASCT in the ACH null background abolishes acetate production from glucose, as opposed to both single ASCT and ACH mutants. Second, incorporation of radiolabeled glucose into fatty acids is also abolished in this ACH/ASCT double mutant. ASCT is involved in ATP production, whereas ACH is not, because the ASCT null mutant is ~1000 times more sensitive to oligomycin, a specific inhibitor of the mitochondrial F₀/F₁-ATP synthase, than wild-type cells or the ACH null mutant. This was confirmed by RNAi repression of the F₀/F₁-ATP synthase F₁β subunit, which is lethal when performed in the ASCT null background but not in the wild-type cells or the ACH null background. We concluded that acetate is produced from both ASCT and ACH; however, only ASCT is responsible, together with the F₀/F₁-ATP synthase, for ATP production in the mitochondrion.

Many protists, including parasitic helminths, amoeba, diplomonads, trichomonads, and trypanosomatids, produce and excrete acetate as a major metabolic end product of their energy metabolism (1, 2). In all of these eukaryotic organisms, acetate production is considered to be coupled to ATP production. Acetate is mainly produced by two different reactions catalyzed by either a cytosolic acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) or an organellar acetate:succinate CoA-transferase (ASCT).³ Acetyl-CoA synthetase generates ATP by substrate level phosphorylation, whereas the involvement of ASCT in ATP production requires the succinyl-CoA synthase (SCoAS) activity (see supplemental Fig. S1). Indeed, it has been proposed that ASCT transfers the CoA group of acetyl-CoA to succinate to form succinyl-CoA, which is consequently converted back to succinate by SCoAS with a net production of one molecule of ATP per molecule of acetyl-CoA (3).

ASCT and SCoAS are located in the same subcellular compartment in all trypanosomatids, including *Trypanosoma brucei* (3), in all helminths analyzed so far, such as *Fasciola hepatica* and *Brugia malayi* (4, 5), *Nyctotherus ovalis* (6), *Trichomonas vaginalis* (7), *Neocallimastix* (8), *Blastocystis* sp. (9), and *Naegleria gruberi* (10). However, the ATP production by the proposed ASCT/SCoAS cycle has not been experimentally demonstrated so far in any of these organisms. To address this key question as a model, we use the procyclic form of *T. brucei*.

The procyclic form of *T. brucei* primarily converts glucose, the main carbon source consumed in rich medium, into succi-

^{*} This work was supported by CNRS, the Université Bordeaux Segalen, the Conseil Régional d'Aquitaine, the Fondation pour la Recherche Médicale, Agence Nationale de la Recherche programs (Grants METABOTRYP of the ANR-MIME2007 call, SysTryp of the ANR-BioSys2007 call, and ACETOTRYP of the ANR-BLANC-2010 call), Prod'Innov, and Franco-Bavarian University Cooperation Center Grant BFHZ/CCUFB (to M. B. and F. B.).

^[5] This article contains supplemental Figs. S1–S3.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-5-57-57-46-32; Fax: 33-5-57-57-45-56; E-mail: bringaud@rmsb.u-bordeaux2.fr.

³ The abbreviations used are: ASCT, acetate:succinate CoA-transferase; ACH, acetyl-CoA thioesterase or acetyl-CoA hydrolase; ATP_ε, mitochondrial F₀/F₁-ATP synthase; EGFP, enhanced green fluorescent protein; ERETIC, electronic reference to access *in vivo* concentrations; hsp60, heat shock protein 60; SCoAS, succinyl-CoA synthetase; TCA, tricarboxylic acid.

nate and acetate (11, 12). Acetate is produced in the mitochondrion of the parasite, where the ASCT activity and protein are located (3, 13). We characterized the *ASCT* gene and showed that RNAi down-regulation of ASCT expression or *ASCT* gene deletion did not abolish acetate production from glucose, although its relative excretion was significantly reduced (13). This indicated at least one additional enzymatic activity contributing to acetate production. Interestingly, upon ablation of pyruvate dehydrogenase expression, the enzyme that converts pyruvate to acetyl-CoA, acetate is no longer produced from glucose (14). This implied that the alternative source of acetate was acetyl-CoA.

Here, we show that the *Tb927.3.4260* (see the TriTrypDB Web site) gene product, encoding a putative mitochondrial acetyl-CoA thioesterase (also called acetyl-CoA hydrolase (ACH)), is contributing to acetate production. RNAi-mediated repression of both ASCT and ACH proteins led to a complete cessation of glucose-derived acetate excretion. Whereas ACH is not involved in ATP production, the ASCT contribution to the mitochondrial ATP production can substitute for oxidative phosphorylation and *vice versa*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Growth and Maintenance of Trypanosomes—The procyclic form of *T. brucei* EATRO1125.T7T (*TetR-HYG T7RNAPOL-NEO*) was cultured at 27 °C in SDM79 medium containing 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 25 μg/ml hemin (15).

Gene Knockout of ACH and ASCT—Replacement of ACH (*Tb927.3.4260*; see the TriTrypDB Web site) or ASCT (*Tb11.02.0290*) genes by the blasticidin and puromycin resistance markers via homologous recombination was performed with DNA fragments containing a resistance marker gene flanked by the ACH or ASCT UTR sequences, as performed before (16). Briefly, the pGEMt plasmid was used to clone an *HpaI* DNA fragment containing the blasticidin and puromycin resistance marker genes preceded by the ACH or ASCT 5'-UTR fragment (537 or 492 bp) and followed by the ACH or ASCT 3'-UTR fragment (521 or 485 bp). The ACH and ASCT knockouts were generated in the EATRO1125.T7T parental cell line, which constitutively expresses the T7 RNA polymerase gene and the tetracycline repressor under the control of a T7 RNA polymerase promoter for tetracycline-inducible expression (17). Transfection and selection of drug-resistant clones were performed as reported previously (18). Transfected cells, called *Δach* (*TetR-HYG T7RNAPOL-NEO Δach::BLA/Δach::PURO*) and *Δasct* (*TetR-HYG T7RNAPOL-NEO Δasct::BLA/Δasct::PURO*), were selected in SDM79 medium containing hygromycin B (25 μg/ml), neomycin (10 μg/ml), blasticidin (10 μg/ml), and puromycin (1 μg/ml).

Inhibition of Gene Expression by RNAi—The inhibition by RNAi of gene expression in the procyclic form (19) was performed by expression of stem-loop “sense-antisense” RNA molecules of the targeted sequences (17) introduced in the pLew100 (kindly provided by E. Wirtz and G. Cross) (20) or pHD1336 (kindly provided by C. Clayton, ZMBH, Heidelberg, Germany) expression vectors, as described previously. These vectors contain the phleomycin and blasticidin resistance

genes, respectively. Construction of pLew-ASCT-SAS and pLew-ATPε-F1β-SAS (ATPε-F1β, F1β subunit of the F_0/F_1 -ATP synthase, *Tb927.3.1380*), used to produce the *Δach*/^{RNAi}ASCT, *Δach*/^{RNAi}ATPε-F1β, and *Δasct*/^{RNAi}ATPε-F1β double mutants has been described before (13, 14). The ^{RNAi}ASCT and ^{RNAi}ATPε-F1β cell lines have been generated before (13, 14). The pHD-ACH-SAS construct targets a fragment (from position 76 to 576 bp) of the *ACH* gene. Briefly, a PCR-amplified 592-bp fragment, containing the antisense ACH sequence with restriction sites added to the primers, was inserted into the *HindIII* and *BamHI* restriction sites of the pLew100 plasmid. Then separate PCR-amplified fragments containing the sense ACH sequence was inserted upstream of the antisense sequence, using *HindIII* and *XhoI* restriction sites (*XhoI* was introduced at the 3'-extremity of the antisense PCR fragment). Finally, the “sense-antisense” *HindIII*/*BamHI* cassette was inserted in the *HindIII*/*BamHI*-digested pHD1336 vector. The resulting plasmid (pHD-ACH-SAS) contains a sense and antisense version of the targeted gene fragment, separated by a 50-bp fragment, under the control of the PARP polymerase promoter linked to a prokaryotic tetracycline operator.

The *Δach* and *Δasct* null mutants and the EATRO1125.T7T parental cell line have been transformed with pLew100 constructs described above (pLew-ATPε-F1β-SAS). The RNAi-harboring single mutant cell lines were selected in SDM79 medium containing hygromycin B (25 μg/ml), neomycin (10 μg/ml), and phleomycin (5 μg/ml). For transfection of the *Δach* and *Δasct* cell line, blasticidin (10 μg/ml) and puromycin (1 μg/ml) were also included in the medium. The EATRO1125.T7T and ^{RNAi}ASCT cell lines were transfected with the pHD-ACH-SAS construct, and blasticidin (10 μg/ml) was used to select recombinant cell lines in addition to hygromycin B/neomycin and hygromycin B/neomycin/phleomycin, respectively. Aliquots of each were frozen in liquid nitrogen to provide stocks of each line that had not been cultivated long term in medium.

Inhibition of Mitochondrial F_0/F_1 -ATP Synthase by Oligomycin—*T. brucei* EATRO1125.T7T, *Δach*, and *Δasct* cell lines were cultivated at 27 °C in SDM79. This assay was performed in 96-well microtiter plates with 100 μl of cell suspension (5×10^5 /ml)/well in the presence of decreasing quantities of oligomycin (from 20 μg/ml to 0.012 pg/ml). The concentration of oligomycin required to kill all of the cells (lethal dose 100; LD₁₀₀) was determined optically at 24 h and every 48 h during 13 days after drug addition.

Immune Sera Production and Western Blot Analyses—For the production of ACH antibodies, a recombinant fragment corresponding to the full-length *ACH* gene preceded by an N-terminal histidine tag (6 histidine codons) was expressed in the *Escherichia coli* BL21(DE3), using the pET3a expression vector (Novagen). Cells were harvested by centrifugation, and recombinant proteins contained in the insoluble fraction were purified by nickel chelation chromatography in the presence of 6 M urea (Novagen), according to the manufacturer's instructions. Antisera were raised in rabbits by five injections at 15-day intervals of 100 μg of ACH-His recombinant nickel-purified proteins, emulsified with complete (first injection) or incom-

Mitochondrial Acetate and ATP Production in Trypanosomes

plete Freund's adjuvant (Proteogenix S.A.). Because the immune sera diluted up to 20 times did not detect the native ACH in trypanosome extracts by Western blotting, we purified the anti-ACH antibodies against a recombinant peptide corresponding to an N-terminal part of the *ACH* gene. A PCR fragment corresponding to positions 135–651 bp (amino acids 45–217) of the *ACH* gene was cloned in the NdeI and BamHI restriction sites of the pET28a expression vector (Novagen). Expression and purification by nickel chelation of the histidine-tagged ACHNter peptide was performed as described for the full-length histidine-tagged recombinant ACH. Approximately 1 mg of the purified His-tagged ACHNter peptide was blotted on a PVDF membrane (2 cm²). After blocking with 5% dry milk in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at room temperature, the membrane was incubated overnight at 4 °C with the immune serum (10 ml). The antibodies were eluted by a 10-min incubation in 1 ml of 100 mM glycine, pH 2.5, and the eluate was neutralized by the addition of 50 μ l of 100 mM Tris, pH 8.

Total protein extracts of procyclic form *T. brucei* (5×10^6 cells) were separated by SDS-PAGE (10%) and immunoblotted on Immobilon-P filters (Millipore) (21). Immunodetection was performed as described (21, 22) using as primary antibodies the rabbit antisera against ACH diluted 1:500, ASCT diluted 1:1,000 (13), and the F1 moiety of the mitochondrial F₀/F₁-ATP synthase isolated from *Crithidia fasciculata* diluted 1:1,000 (23) (gift from D. Speijer, Amsterdam, Netherlands) or the mouse antiserum against heat shock protein 60 (hsp60) diluted 1:10,000 (24). Goat anti-rabbit or anti-mouse Ig/peroxidase (1:10,000 dilution) was used as secondary antibody, and revelation was performed using the SuperSignal[®] West Pico chemiluminescent substrate as described by the manufacturer (Thermo Scientific). Images were acquired and analyzed with a KODAK Image Station 4000 MM, and quantitative analyses were performed with the KODAK MI application.

Overexpression and Purification of ACH in Procyclic Cells—The pHD1336 expression vector was used to produce the full-length recombinant ACH protein containing (pHD-ACH⁺his) or not (pHD-ACH⁺) a C-terminal histidine tag (6 histidine codons), by inserting a 1,122- or 1,140-bp PCR fragment, respectively, in the HindIII and BamHI restriction sites of the pHD11336 plasmid. The pHD-ACH⁺ and pHD-ACH⁺his plasmids were introduced in the EATRO1125.T7T and ^{RNAi}ASCT cell lines (*TetR-HYG T7RNAPOL-NEO* ^{RNAi}ASCT-*BLE*). Expression of the ACH recombinant protein together (^{RNAi}ASCT/ACH⁺.i and ^{RNAi}ASCT/ACH⁺his.i) or not (ACH⁺.i and ACH⁺his.i) with RNAi inhibition of the *ASCT* gene expression was tetracycline-induced 48 h at 27 °C.

Enzyme Assays—Sonicated (5 s at 4 °C) crude extracts of trypanosomes resuspended in cold hypotonic buffer (10 mM potassium phosphate, pH 7.8) or trypanosome fractions containing ACH-His recombinant proteins purified by nickel chelation chromatography were tested for ACH (EC 3.1.2.1) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.8) activities (25). ACH activity was measured spectrophotometrically as production of CoA by a 4,4'-dithiodipyridine (Aldrithiol) assay, modified by P. P. Van Veldhoven from protocols described previously (26, 27). Aldrithiol reacts with free CoASH, and formation of one of the reaction products, 4-thiopyridine, is followed

at 324 nm ($\epsilon_{324} = 19,800/\text{M}/\text{cm}$). The reaction mixture contained 50 mM HEPES (pH 7.4), 0.25 mM EDTA (pH 7.4), 0.2 mM aldrithiol, 0.05% (w/v) Thesit, and 5×10^6 cells resuspended in cold hypotonic buffer, in a final volume of 0.5 ml. Acetyl-CoA was added as a substrate at 0.1 mM. To test the ACH substrate specificity, 0.1 mM acetyl-CoA was replaced by the same concentration of malonyl-CoA (C3), crotonoyl-CoA (C4), acetoacetyl-CoA (C4), hydroxybutyryl-CoA (C4), butyryl-CoA (C4), hexanoyl-CoA (C6), octanoyl-CoA (C8), decanoyl-CoA (C10), lauroyl-CoA (C12), myristoyl-CoA (C14), palmitoyl-CoA (C16), palmitoleoyl-CoA (C16:1), stearoyl-CoA (C18), oleoyl-CoA (C18:1), and arachidonoyl-CoA (C20).

Construction of Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)-tagged ACH in Trypanosomes and Immunofluorescence Analyses—Recombinant fragments corresponding to the N-terminal extremity of the *ACH* gene, with or without the N-terminal mitochondrial signal (33 residues), followed by the EGFP, were expressed in the procyclic form using the pLew100 vector. PCR fragments corresponding to the first 164 amino acids of ACH (pLew-ACH-1/164.EGFP) and the same region deleted for the N-terminal 33 residues (pLew-ACH-34/164.EGFP) were inserted between the XhoI (or HindIII) and XbaI restriction sites of the pLew100-EGFP1 plasmid described previously (28).

To stain mitochondria of the wild type and ACH⁺.i procyclic cell lines, 200 nM MitoTracker[®] Red CMXRos (Invitrogen) were added to the culture, followed by a 20-min incubation and washes in PBS. For immunofluorescence analyses, wild type, ACH⁺.i, ACH-1/164.EGFP.i, and ACH-34/164.EGFP.i cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS, permeabilized with 1% Triton X-100, and spread on poly-L-lysine-coated slides. The slides were then incubated for 45 min in PBS containing 5% BSA, followed by incubation in PBS with 2% BSA and the primary antiserum, 1:200 diluted rabbit polyclonal anti-ACH or 1:100 diluted rabbit anti-ASCT (13). After washing with PBS, the slides were incubated with 2 μ g/ml Alexa 594 anti-rabbit IgG conjugate or Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG conjugate (Molecular Probes). Slides were then washed and mounted in the SlowFade[®] antifade reagent (Invitrogen). Cells were visualized with a Leica DM5500B microscope, and images were captured by an ORCA[®]-R² camera (Hamamatsu) and Leica MM AF Imaging System software (MetaMorph[®]).

Analysis of Excreted End Products from Glucose Metabolism— 1×10^8 *T. brucei* procyclic cells were collected by centrifugation at $1,400 \times g$ for 10 min, washed once with PBS, and incubated in 5 ml of PBS supplemented with 2 g/liter NaHCO₃ (pH 7.4). Cells were maintained for 6 h at 27 °C in incubation buffer containing 20 μ mol of D-glucose (4 mM). The integrity of the cells during the incubation was checked by microscopic observation. The supernatant was collected, and 50 μ l of maleate solution in D₂O (20 mM) was added as an internal reference. ¹H-NMR spectra were performed at 125.77 MHz on a Bruker DPX500 spectrometer equipped with a 5-mm broadband probe head. Acquisition conditions were as follows: 90° flip angle, 5,000 Hz spectral width, 32 K memory size, and 9.3 s total recycle time. The relaxation delay was 6 s for a nearly complete longitudinal relaxation. Measurements were recorded at 25 °C with an electronic reference to access *in vivo* concentrations (ERETIC) method, which provides an electronically synthe-

sized reference signal on the proton spectrum (29). This reference was placed at 0.2 ppm to avoid superposition on sample resonances. Measurements were performed with 256 scans for a total time close to 40 min. Before each experiment, the phase of the ERETIC peak was precisely adjusted. Resonances of obtained spectra (succinate at 3.35 ppm, pyruvate at 3.32 ppm, acetate at 1.87 ppm, alanine at 1.43 ppm, and lactate at 1.28 ppm) were integrated, and results were expressed relative to ERETIC peak integration.

Lipid Labeling from [U-¹⁴C]Glucose— 10^8 cells in the late exponential phase were incubated for 16 h in 5 ml of SDM79 medium without L-threonine, containing 3 mM D-glucose and 25 μ Ci of D-[U-¹⁴C]glucose (300 mCi/mmol; PerkinElmer SAS, Courtaboeuf, France) or containing 3 mM D-glucose, 1 mM acetate, and 10 μ Ci of [1-¹⁴C]acetate (55.3 mCi/mmol; PerkinElmer SAS). Cells were checked microscopically for viability during the incubation. Subsequently, lipids were extracted by chloroform/methanol (2:1, v/v) for 30 min at room temperature and then washed three times with 0.9% NaCl. The solvent was evaporated, and lipids were dissolved in an appropriate volume of chloroform/methanol (1:1, v/v). Polar lipids were analyzed by loading total lipids onto HPTLC plates (60F254, Merck), which were developed in methyl acetate, *n*-propanol, chloroform, methanol, 0.25% aqueous KCl (25:25:25:10:9; v/v/v/v/v) (30). To analyze neutral lipids, total lipids were loaded onto HPTLC plates developed in hexane/ethylether/acetic acid (90:15:2, v/v/v) and diacylglycerols ($R_F = 0.08$), free fatty acids ($R_F = 0.29$), and triacylglycerols ($R_F = 0.50$) were separated. Lipids were identified by co-migration with known standards. Lipid radioactivity was determined with a Storm 860 molecular imager from GE Healthcare.

Determination of Intracellular ATP Concentrations—The intracellular ATP concentrations were determined on established procyclic cells in mid-log growth phase, when applicable. Cell pellets ($1-2 \times 10^8$ procyclic cells) were washed in cold PBS and frozen in liquid nitrogen. Lysis and deproteinization of the cellular pellets involved homogenization in 500 μ l of cold perchloric acid (0.9 M) and neutralization (pH 6.5) by the addition of KOH/MOPS (2 M/0.5 M). Then ATP concentrations were determined with the firefly luciferase bioluminescence assay (ATPlite 1step Luminescent Assay, PerkinElmer SAS) (31).

RESULTS

Down-regulation of ASCT Expression in ACH Null Background Is Lethal for Procyclic Trypanosomes—We previously showed that procyclic trypanosomes produced acetate from acetyl-CoA by mitochondrial ASCT and an by unknown distinct activity (13). We screened the *T. brucei* genome databases (TriTrypDB and GeneDB) for homologues of all known enzymes producing acetate from acetyl-CoA. In addition to the previously characterized ASCT and acetyl-CoA synthetase (AMP-forming) genes (13, 32), we identified a single gene candidate containing the acyl-CoA thioesterase domain (COG1607; GeneDB) named acetyl-CoA thioesterase or ACH (Tb927.3.4260). ACH orthologs are present in the genome of all trypanosomatids sequenced so far, except *Trypanosoma cruzi* (TriTrypDB). ACH expression was down-regulated by RNAi in EATRO1125.T7T procyclic trypanosomes and derived

RNAi ASCT cell lines to generate the *RNAi* ACH single and *RNAi* ASCT/*RNAi* ACH double mutants, respectively. Upon RNAi induction by tetracycline addition, the *RNAi* ASCT/*RNAi* ACH double mutant (*RNAi* ASCT/*RNAi* ACH.i) ceased growth, whereas the *RNAi* ACH.i and *RNAi* ASCT.i single mutants were not compromised (data not shown). However, the *RNAi* ASCT/*RNAi* ACH cell line was not amenable to further analyses because of the rapid phenotypic reversion due to ASCT and/or ACH re-expression (data not shown).

As an alternative, we generated an ACH knock-out mutant (Δ *ach*::BLA/ Δ *ach*::PURO, abbreviated as Δ *ach*) by replacing both ACH alleles by selectable markers in the procyclic EATRO1125.T7T background. Deletion of both ACH alleles in the selected Δ *ach* cell line was tested by PCR (Fig. 1A, inset) and Western blotting using immunopurified anti-ACH antibodies raised against the recombinant histidine-tagged *T. brucei* ACH (see Fig. 4A); the 44-kDa protein detected in the wild type procyclic cells, which is compatible with the ACH calculated size (41.3 kDa), is not detectable in the Δ *ach* cell line. As expected from growth of the *RNAi* ACH.i mutant, the Δ *ach* mutant showed no growth phenotype (Fig. 1A). For RNAi knockdown of ASCT in the Δ *ach* background, the pLew100-ASCT-SAS construct was introduced. The tetracycline-induced Δ *ach*/*RNAi* ASCT cell line (Δ *ach*/*RNAi* ASCT.i) showed a strong growth phenotype and complete growth arrest after 2 weeks of induction (Fig. 1B). In the single *RNAi* ASCT mutant, only a slight growth phenotype was observed upon tetracycline induction (Fig. 1C). These results establish that ASCT and ACH share a common function and act redundantly.

Acetate Production Is Abolished in Δ *ach*/*RNAi* ASCT.i Double Mutant—Proton ¹H-NMR spectroscopy was used to detect and quantify the metabolic end products excreted from glucose metabolism. The parasites were incubated in PBS/NaHCO₃ medium containing 4 mM D-glucose as the only carbon source, and the incubation medium was analyzed by ¹H-NMR spectroscopy. The parental EATRO1125.T7T procyclic cells mainly excrete acetate and succinate (~80 and 19% of the excreted molecules, respectively) and traces of pyruvate under those conditions (Table 1 and Fig. 2). As observed previously (13), the rate of acetate excretion is significantly reduced in the tetracycline-induced *RNAi* ASCT.i mutant compared with uninduced cells (980 versus 1440 nmol/h/mg of protein, respectively), confirming that ASCT is contributing to acetate production. The rate of pyruvate excretion is ~9.5-fold increased in the mutant compared with the parental cells, probably as a consequence of product inhibition of pyruvate dehydrogenase by accumulating acetyl-CoA in the *RNAi* ASCT.i mutant (Table 1). Similarly, alanine production in the induced cell line may result from accumulation of pyruvate, which is the substrate of the alanine-producing enzyme alanine aminotransferase (33). It is also noteworthy that the rate of succinate production increased upon tetracycline induction (713 versus 231 nmol/h/mg of protein), suggestive of a metabolic flux redistribution at the phosphoenolpyruvate bifurcation (see supplemental Fig. S1). In the induced Δ *ach*/*RNAi* ASCT.i line, the rate of acetate production is almost completely abolished, indicating that ASCT and ACH together fully account for mitochondrial acetate production (Table 1 and Fig. 2). Succinate and pyruvate become the major

Mitochondrial Acetate and ATP Production in Trypanosomes

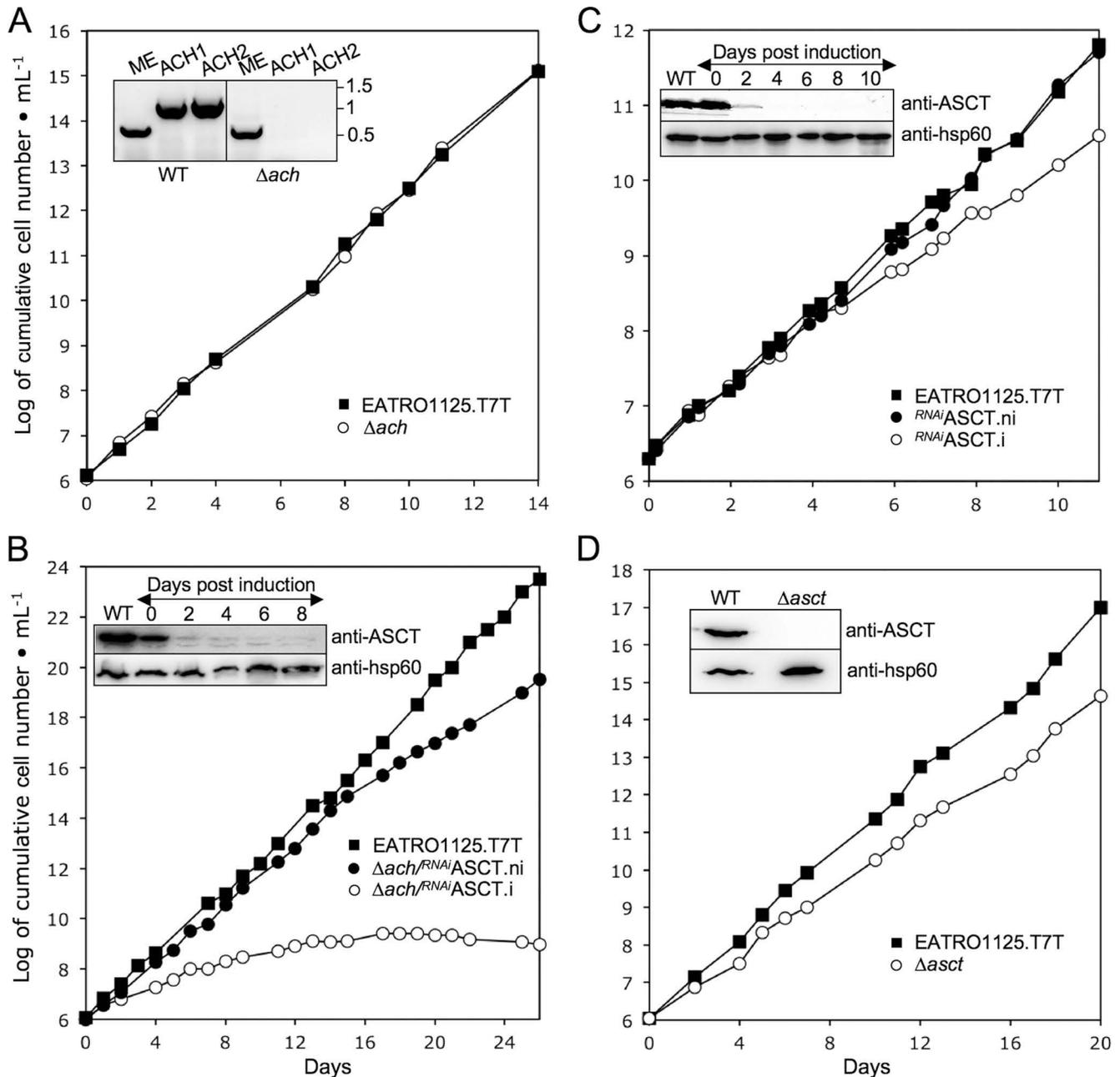


FIGURE 1. Analysis of ASCT and ACH mutant cell lines. Growth curves of the Δach (A) and $\Delta asct$ (D) null mutants and the Δach /^{RNAi}ASCT (B) and ^{RNAi}ASCT (C) cell lines incubated in the presence (i; ○) or in the absence (ni; ●) of tetracycline. Cells were maintained in the exponential growth phase (between 10^6 and 10^7 cells/ml) by dilution, and cumulative cell numbers are calculated. The insets show Western blot controls of ASCT expression in EATRO1125.T7T (WT) and $\Delta asct$ (D), Δach /^{RNAi}ASCT (B), and ^{RNAi}ASCT (C). Induction refers to tetracycline addition. The inset in A shows the locus PCR on genomic DNA isolated from the parental EATRO1125.T7T (WT) and Δach . Primers specific for the cytosolic malic enzyme (ME) (control) or ACH locus (ACH1 and ACH2) were used (see "Experimental Procedures").

end products excreted by the Δach /^{RNAi}ASCT.i double mutant (~2.4- and 46-fold increased compared with the parental cell line) (Table 1). The residual acetate production (~13-fold reduced compared with the parental cell line) is probably due to the low expression of ASCT, which is still detectable 8 days after induction of RNAi (Fig. 1B). Interestingly, no significant differences were observed between the parental and Δach cells, suggesting that the ASCT activity is alone sufficient to maintain the normal rate of acetate production (Table 1 and Fig. 2).

ACH Is Mitochondrial Protein—Immunofluorescence analyses with the immunopurified anti-ACH antibodies were not

sufficiently sensitive to detect the native ACH protein in procyclic trypanosomes. To determine the subcellular localization, the ACH ORF was inducibly overexpressed in EATRO1125.T7T procyclic cells using the pHD1336 vector. ACH⁺ cells overexpress (~50-fold) a 44-kDa protein recognized by the anti-ACH antibody (see supplemental Fig. S2A). Immunofluorescence analyses of the ACH⁺ cell line using the anti-ACH immune serum revealed a "mitochondrion-like" reticulate pattern matching the mitochondrion-specific dye Mitotracker[®] Red CMXRos (Invitrogen) (Fig. 3A). The same mitochondrial pattern was also observed with the first 164 amino acids of ACH

TABLE 1

Excreted end products of D-glucose metabolism by procyclic *T. brucei* cell lines

The extracellular PBS medium of trypanosome cell lines incubated in the presence of 4 mM glucose was analyzed by ¹H-NMR spectrometry to detect and quantify excreted end products.

Cell line ^a	n ^b	Excreted molecules ^c					
		Acetate	Succinate	Pyruvate	Alanine	Lactate	Total
<i>nmol/h/mg of protein (% of excreted molecules)</i>							
EATRO1125.T7T	3	1,343 ± 113 (79.7)	344 ± 45 (19.1)	21 ± 24 (1.2)	ND ^d	ND	1,708 ± 181 (100)
ASCT.ni	4	1,440 ± 217 (81.1)	231 ± 53 (13.7)	36 ± 28 (2.2)	ND	ND	1,707 ± 173 (100)
ASCT.i	4	980 ± 149 (48.7)	713 ± 164 (35.2)	199 ± 37 (10.0)	121 ± 18 (6.1)	ND	2,013 ± 278 (100)
Δ ach	3	1,498 ± 90 (82.1)	309 ± 28 (16.9)	19 ± 20 (1.0)	ND	ND	1,826 ± 138 (100)
Δ ach/ASCT.ni	4	1,151 ± 95 (64.1)	549 ± 68 (30.5)	82 ± 12 (4.5)	14 ± 29 (0.9)	ND	1,796 ± 133 (100)
Δ ach/ASCT.i	4	105 ± 31 (6.1)	829 ± 185 (47.0)	686 ± 54 (39.5)	103 ± 60 (6.0)	24 ± 27 (1.5)	1,747 ± 173 (100)
ACH ⁺ .ni	4	1,511 ± 78 (83.4)	262 ± 91 (14.3)	43 ± 27 (2.3)	ND	ND	1,816 ± 114 (100)
ACH ⁺ .i	4	1,483 ± 84 (82.2)	242 ± 27 (13.6)	57 ± 22 (3.2)	ND	ND	1,782 ± 115 (100)
ASCT/ACH ⁺ .ni	3	1,384 ± 131 (82.8)	254 ± 28 (15.2)	28 ± 16 (1.7)	6 ± 10 (0.4)	ND	1,672 ± 133 (100)
ASCT/ACH ⁺ .i	3	1,366 ± 71 (84.8)	216 ± 29 (13.3)	34 ± 17 (2.0)	ND	ND	1,616 ± 102 (100)

^a .i, RNAi cell lines tetracycline-induced during 6–10 days, depending on the cell line and the experiments; .ni, non-induced RNAi cell lines.

^b Number of experiments.

^c Mean ± S.D. of three or four experiments (nmol/h/mg of protein) and the percentage of each excreted molecule (values in parentheses) are presented.

^d Not detectable.

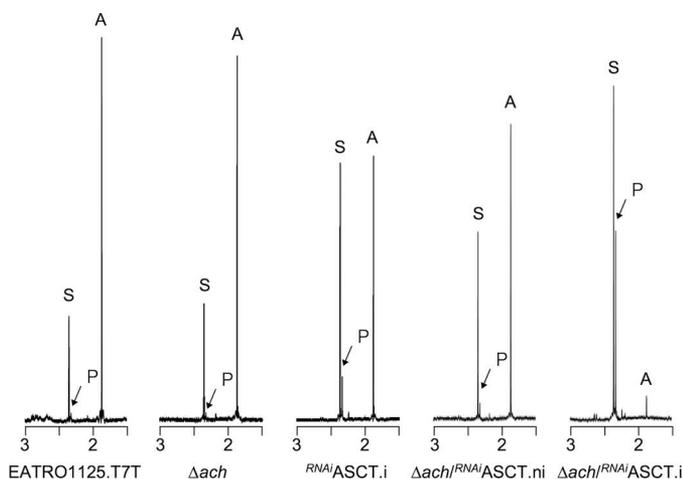


FIGURE 2. Proton ¹H-NMR spectra of metabolic end products excreted by procyclic cell lines incubated with D-glucose. The parental EATRO1125.T7T, Δ ach, tetracycline-induced (.i), or non-induced (.ni) RNAi/ASCT and Δ ach/RNAi/ASCT cell lines were incubated with 4 mM D-glucose in PBS/NaHCO₃ buffer for 6 h. Each spectrum corresponds to one representative experiment from a set of at least three. The spectrum detail ranging from 1.5 to 3 ppm is shown. The resonances indicated are acetate (A), pyruvate (P), and succinate (S).

fused to EGFP (Fig. 3B). Deletion of the first 33 residues in the previous construct gave a homogenous diffuse fluorescence pattern characteristic for a cytoplasmic localization (Fig. 3C). Thus, the N-terminal MLRRCFPSHLIPFLCGGCLSSRRQLVVGNSKN peptide contains a functional mitochondrial targeting sequence as predicted by Mitoprot (available on the World Wide Web; 0.97 probability).

The ACH Gene Encodes Acetyl-CoA Thioesterase—Acetyl-CoA thioesterase activity was barely detectable in EATRO1125.T7T crude extracts (<5 milliunits/mg of proteins; see supplemental Fig. S3A). In the tetracycline-induced ACH⁺his cell line, 29.7 ± 0.7 milliunits/mg of proteins were measured, in agreement with the ~50-fold increase of the ACH protein compared with wild type cells (Fig. 4A and supplemental Fig. S3B), indicating that ACH is a bona fide acetyl-CoA thioesterase. To determine the specific activity of the protein, the histidine-tagged protein overexpressed in the ACH⁺his.i cell line was purified by nitrilotriacetic acid affinity chromatography, as shown in Fig. 4B (see supplemental Fig. S3C). The purification of a single 44-kDa protein detectable by Coomassie

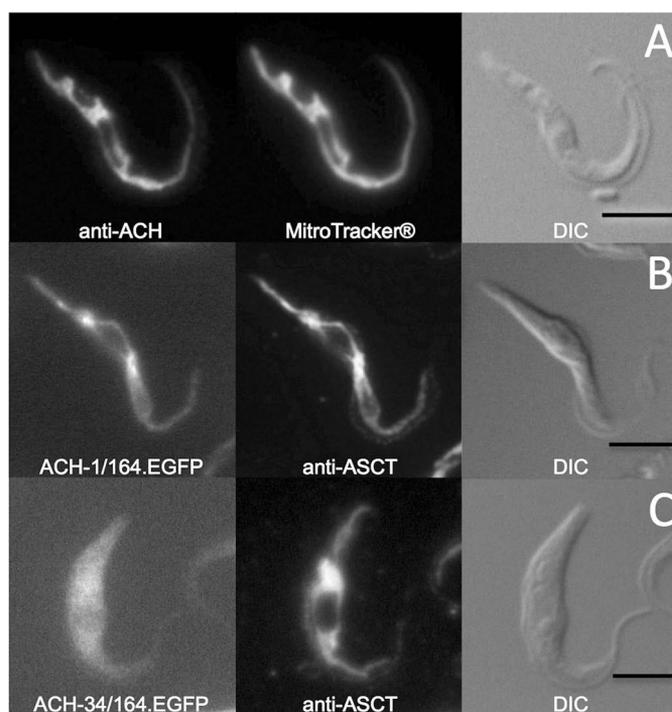


FIGURE 3. Immunolocalization of ACH. ACH⁺ cell line (A) was stained with rabbit anti-ACH (Alexa 488 channel) and MitroTracker[®]. ACH-1/164.EGFP (B) and ACH-34/164.EGFP (C) cell lines were stained with rabbit anti-ASCT (Alexa 594 channel). Differential interference contrast (DIC) of cells is shown to the right of each panel. Scale bar, 5 μm.

staining and recognized by the anti-ACH immune serum resulted in a ~130-fold increase of the ACH specific activity. This corresponded to a yield of ~200 μg of recombinant ACH purified from 3 × 10⁹ ACH⁺his cells. The maximum catalytic activity of the recombinant histidine-tagged ACH is 3.9 ± 0.33 units/mg of protein, which corresponds to a calculated *k*_{cat} for hydrolysis of acetyl-CoA of 2.7 s⁻¹.

Substrate specificity was determined by testing the ability of the ACH⁺his-purified protein to hydrolyze short- and long-chain fatty acids ranging from C2 to C20 (Table 2). The highest thioesterase activity was observed with acetyl-CoA (C2) and C4 fatty acyl-CoA (butyryl-CoA, hydroxybutyryl-CoA, and acetoacetyl-CoA). ACH⁺his shows a lower thioesterase activity with

Mitochondrial Acetate and ATP Production in Trypanosomes

crotonyl-CoA (C4) and hexanoyl-CoA (C6) and no significant activity with malonyl-CoA (C3) and other acyl-CoA (from C8 to C20).

Interestingly, we did not observe any decrease of the acetyl-CoA thioesterase activity by the addition of 50 mM succinate (data not shown). Because the enzymatic assay is based on the measurement of released CoASH, this indicates that ACH has no CoA-transferase activity to succinate, in contrast to ASCT (3).

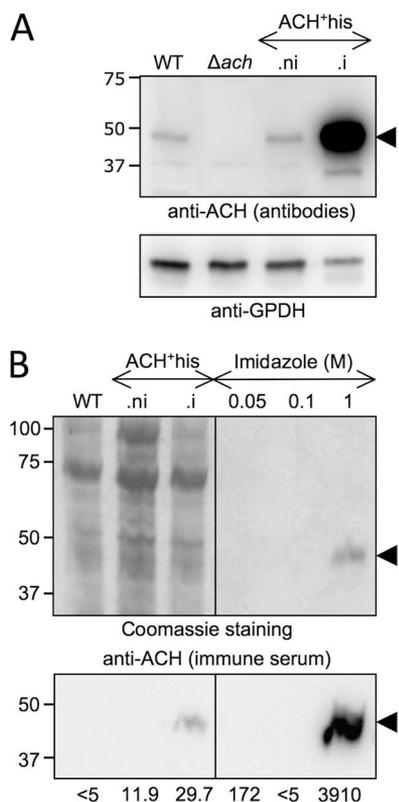


FIGURE 4. Overexpression and purification of ACH. Lysates of *T. brucei* EATRO1125.T7T procyclic form (WT), Δach , non-induced (.ni), and tetracycline-induced (.i) ACH⁺his cell lines were analyzed by Western blotting with the immunopurified anti-ACH antibodies and the anti-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) immune serum (A). Samples contained 5×10^6 cells, except for ACH⁺his.i (1.5×10^6 cells). ACH overexpression in ACH⁺his.i was quantified using the KODAK Image Station 4000 MM. B, purification by nickel chelation of the ACH⁺his. Top panel, Coomassie staining of lysates (5×10^6 cells) of wild type procyclic cell, non-induced, and tetracycline-induced ACH⁺his cell lines and elution fractions sequentially obtained by nickel chelation with different imidazole concentrations. For each elution condition (0.05, 0.1, and 1 M), only the first of the three collected fractions is shown. The bottom panel shows the corresponding Western blot with the anti-ACH immune serum. The specific acetyl-CoA thioesterase activity (milliunits/mg of protein) measured for each sample is indicated below the Western blot. The positions of the molecular weight markers are indicated in kDa on the left of each panel.

TABLE 2

Substrate specificity of the *T. brucei* ACH

ACH activities (milliunits/mg of purified ACH-his protein) were determined on the ACH-His recombinant protein purified by nickel chelation chromatography, using as substrates 0.1 mM acyl-CoA molecules ranging from 2 to 20 carbons (C2 to C20).

	Acyl-CoA (0.1 mM)						
	Acetyl-CoA (C2)	Malonyl-CoA (C3)	Crotonoyl-CoA (C4)	Hydroxybutyryl-CoA (C4)	Acetoacetyl-CoA (C4)	Butyryl-CoA (C4)	Hexanoyl CoA (C6) to C20
Specific activity (milliunits/mg of protein)	$3,910 \pm 329$	<60	851 ± 198	$1,893 \pm 791$	$3,605 \pm 312$	$7,300 \pm 194$	359.2 ± 7.6 <60

ACH Overexpression Rescues Metabolic Phenotype of ASCT Deficiency—The decrease of acetate production (1.6-fold) and increase of succinate and pyruvate production (2.8- and 5.1-fold, respectively) in induced RNAi ASCT.i cells (Table 1) shows that ASCT cannot alone account for the wild type acetate production level. To confirm the role of ACH in acetate production, we rescued maximal acetate excretion by overexpressing ACH in the RNAi ASCT mutant (RNAi ASCT/ACH⁺ cell line). The simultaneous down-regulation of ASCT expression and ACH overexpression in the RNAi ASCT/ACH⁺.i cell line was confirmed by Western blot analysis (supplemental Fig. S2B). The amounts of acetate, succinate, and pyruvate excreted from glucose metabolism remained unchanged upon double induction, indicating that ACH overexpression compensates for loss of ASCT. Interestingly, the significant overexpression of ACH (~50-fold) in the wild type background (ACH⁺ cell line), does not increase the rate of acetate production (Table 1), suggesting that another step of the glucose catabolism is rate-limiting.

Fatty Acid Biosynthesis from Glucose Is Abolished in $\Delta ach/^{RNAi}$ ASCT Mutant—We previously demonstrated that acetyl-CoA used to feed fatty acid biosynthesis is produced from acetate by the essential cytosolic enzyme acetyl-CoA synthetase (AMP-forming), defining the acetate shuttle as a replacement for the more common citrate shuttle (32) (supplemental Fig. S1). Because glucose-derived acetate is produced by ASCT and ACH, we compared *de novo* fatty acid biosynthesis in the tetracycline-induced or non-induced $\Delta ach/^{RNAi}$ ASCT double mutant and the parental cell line incubated in growth medium containing D-[U-¹⁴C]glucose. ¹⁴C label incorporation in free fatty acids as well as in lipids containing fatty acids, *i.e.* phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, and phosphatidylethanolamine), diacylglycerol, and triacylglycerol, is presented in Fig. 5. After 14 days of tetracycline induction, ¹⁴C label incorporation is almost completely abolished in free fatty acids (15-fold reduction) and glycerolipids (from 7- to 48-fold reduction in phosphatidylethandamine and triacylglycerol, respectively). Conversely, we did not observe any decrease of ¹⁴C label incorporation into the different lipids when cells were incubated in the same medium containing [1-¹⁴C]acetate, which bypasses the acetate production by ASCT and ACH. We conclude that conversion of acetyl-CoA into acetate by ASCT or ACH is essential for incorporation of glucose carbon into fatty acids.

ATP Production in ASCT/SCoAS Cycle—The mitochondrial F₀/F₁-ATP synthase (ATP_e) produces ATP as the last step in oxidative phosphorylation but is not essential for growth of the EATRO1125 procyclic cell line in glucose-rich medium (14, 34) (see Fig. 6B). This implies that ATP production by substrate level phosphorylation in the cytosol (phosphoglycerate kinase

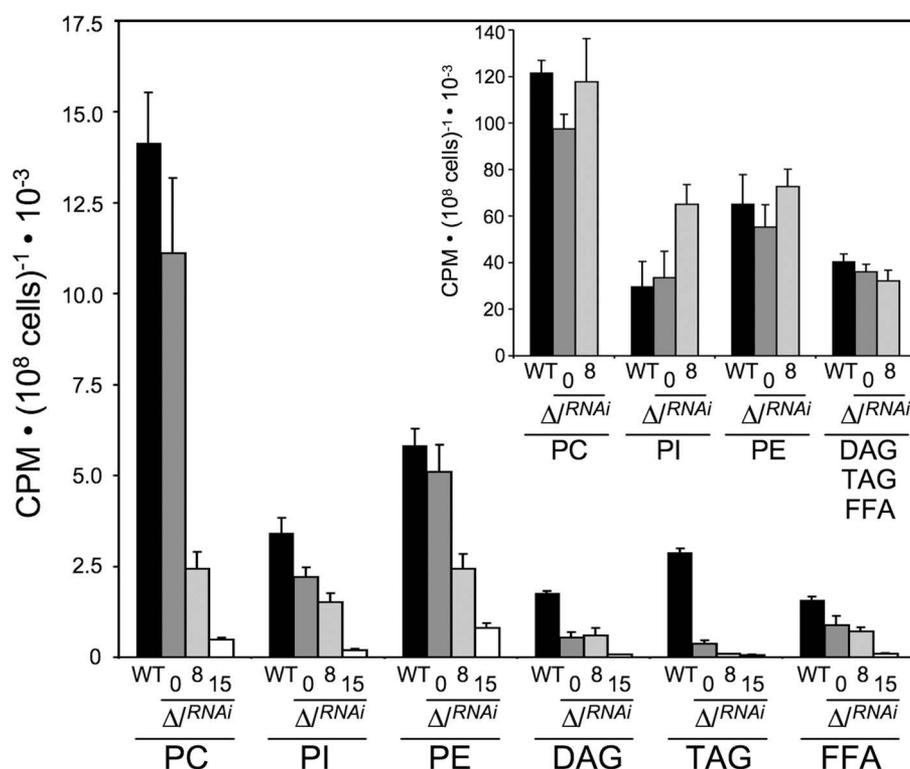


FIGURE 5. D-[U-¹⁴C]-glucose and [1-¹⁴C]-acetate incorporation into lipids of the EATRO1125.T7T and Δach^{RNAi} ASCT cell lines. ¹⁴C-labeled phospholipids (phosphatidylcholine (PC), phosphatidylinositol (PI), and phosphatidylethanolamine (PE)) and ¹⁴C-labeled neutral lipids (diacylglycerol (DAG), triacylglycerol (TAG), and free fatty acids (FFA)) were separated by HPTLC and analyzed as described under "Experimental Procedures." Cells were incubated for 16 h in SDM79 containing D-[U-¹⁴C]glucose or [1-¹⁴C]acetate (inset histogram) prior to lipid extraction. Black columns correspond to the EATRO1125.T7T parental cell line (column WT), whereas dark gray, light gray and white columns correspond to the non-induced (column 0), tetracycline-induced for 8 days (column 8), and tetracycline-induced for 15 days (column 15) Δach^{RNAi} ASCT cells, respectively. Shown is the mean \pm S.D. (error bars) of three independent experiments.

and pyruvate kinase) and/or in the mitochondrion (SCoAS) can compensate for the chemical inhibition or RNAi-mediated down-regulation of ATP ϵ . To determine whether the postulated ASCT/SCoAS cycle becomes essential for ATP production in the absence of oxidative phosphorylation, the EATRO1125.T7T, Δach and $\Delta asct$ cell lines were compared for their sensitivity to oligomycin, a specific inhibitor of ATP ϵ . We observed that the $\Delta asct$ cell line is \sim 1,000 times more sensitive to the inhibitor than the EATRO1125.T7T cell line, whereas the Δach line is as sensitive as parental cells (Fig. 6A). This indicates that ASCT, but not ACH, becomes essential when ATP ϵ is inhibited. To confirm these data, expression of ATP ϵ F1 β subunit was down-regulated by RNAi in the wild type (RNAi ATP ϵ -F1 β), Δach (Δach^{RNAi} ATP ϵ -F1 β), and $\Delta asct$ ($\Delta asct^{RNAi}$ ATP ϵ -F1 β) backgrounds. No significant growth phenotype was observed for the RNAi ATP ϵ -F1 β single and the Δach^{RNAi} ATP ϵ -F1 β double mutants (Fig. 6, B and C), whereas the ATP ϵ -F1 β is repressed below detectability on Western blots upon tetracycline induction. In contrast, the $\Delta asct^{RNAi}$ ATP ϵ -F1 β double mutant is lethal upon tetracycline induction (Fig. 6D).

The intracellular ATP concentration was reduced by \sim 60% in the $\Delta asct^{RNAi}$ ATP ϵ -F1 β .i after 4 days of induction, compared with the wild-type cells (Table 3). This strongly supports the interpretation that death of the $\Delta asct^{RNAi}$ ATP ϵ -F1 β .i mutant is due to a great reduction of the mitochondrial ATP production. A lower reduction (\sim 30%) was observed for the $\Delta asct$ and RNAi ATP ϵ -F1 β .i single mutants, matching their

moderate growth phenotypes (Figs. 1C and 6C). We conclude that the ASCT/SCoAS cycle and ATP ϵ can both supply sufficient mitochondrial ATP for survival and growth. The great reduction of the intracellular amounts of ATP in the non-induced $\Delta asct^{RNAi}$ ATP ϵ -F1 β .ni cell line (\sim 50%) is certainly due to the reduction of the ATP ϵ -F1 β expression in the ASCT null background (Fig. 6D, inset). In contrast, the impact of ACH gene deletion on the intracellular amounts of ATP is minor (Table 3), in agreement with the absence of a growth phenotype.

DISCUSSION

The procyclic form of *T. brucei* excretes mainly acetate and succinate when glucose is metabolized (12). The enzymes involved in the glycosomal and mitochondrial succinate production have been characterized (11, 35); however, the mitochondrial metabolic pathway leading to acetate production was not completely elucidated. Unraveling the topology of the acetate branch is particularly relevant because we recently showed that acetate production in the mitochondrion of the procyclic trypanosomes is essential for *de novo* fatty acids biosynthesis (32). Indeed, trypanosomes have replaced the canonical citrate shuttle by a so-called "acetate shuttle" to transfer acetyl-CoA produced in the mitochondrion to the cytosol, where fatty acid biosynthesis is initiated (steps 1, 2, and 5 in supplemental Fig. S1). Here we show that two mitochondrial enzymatic activities (ASCT and ACH) are responsible for acetate production from acetyl-CoA. These activities are encoded by the ASCT gene

Mitochondrial Acetate and ATP Production in Trypanosomes

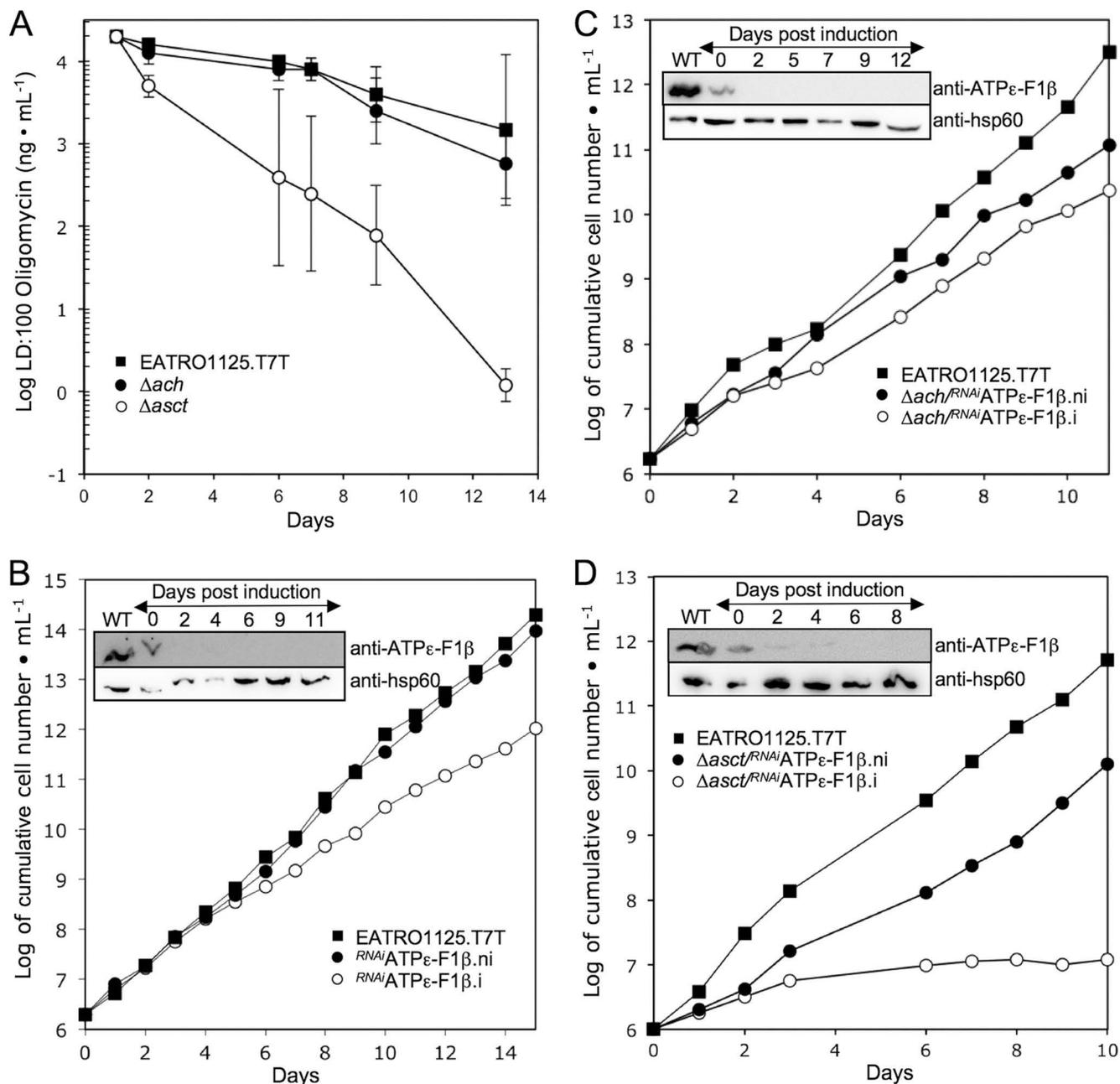


FIGURE 6. ATP is primarily produced by the ASCT/SCoAS cycle and oxidative phosphorylation in the procyclic cells. *A*, oligomycin sensitivity of the EATRO1125.T7T, Δach , and $\Delta asct$ cell lines (5×10^5 cells/ml) incubated in SDM79 medium. The drug concentration required to kill all cells ($LD:100$) is plotted over the incubation time with the drug. A logarithmic scale is used for the drug concentration, and the mean \pm S.D. ($n = 3$) is presented. *B–D*, growth curves of the $RNAi ATP\epsilon-F1\beta$, $\Delta ach^{RNAi} ATP\epsilon-F1\beta$, and $\Delta asct^{RNAi} ATP\epsilon-F1\beta$ cell lines incubated in the presence (*i*; \circ) or in the absence (*ni*; \bullet) of tetracycline. Cells were maintained in the exponential growth phase (between 10^6 and 10^7 cells/ml) by dilution, and cumulative cell numbers are calculated. The insets show Western blot controls of $ATP\epsilon-F1\beta$ expression in the respective cell lines upon tetracycline induction. Anti-hsp60 was used as an internal reference.

(Tb11.02.0290) (13) and the *ACH* gene (*Tb927.3.4260*), both expressed in the mitochondrion of procyclic trypanosomes. *ACH* activity is largely described in plants and animals, but only one *ACH* activity was earlier reported in a parasite, the nematode *Ascaris suum* (36). However, the gene has not yet been identified in the incomplete *A. suum* genome database (2). Trypanosomatids are the first organisms known to express two mitochondrial enzymatic activities for acetate production. Such redundancy has also been proposed for *N. gruberi*, whose genome contains *ASCT* and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) genes (10), yet there is no biochemical evidence.

Acetate production has also been proposed to be coupled to ATP production through the ASCT/SCoAS cycle (3, 13, 37). In glucose-rich conditions, oxidative phosphorylation is not essential for growth and ATP production in the EATRO1125 procyclic trypanosome strain, whereas substrate-level phosphorylation is essential for the parasite (14, 34, 38). The mitochondrion is involved in both oxidative phosphorylation through $ATP\epsilon$ and substrate level phosphorylation by SCoAS. It was previously proposed that succinyl-CoA produced during acetate formation by ASCT is recycled to succinate by SCoAS, with a concomitant production of ATP (3). In agreement with

TABLE 3
Intracellular ATP concentration

ATP concentrations (nmol/mg of protein) were determined on trypanosome extracts using the firefly luciferase bioluminescence assay.

Cell lines ^a	[ATP]	Student's <i>t</i> test (compared with WT) ^b
	nmol/mg protein	
EATRO1125.T7T (WT)	3.88 ± 0.32	NA ^c
Δ <i>ach</i>	3.36 ± 0.34	0.14354 ^d
Δ <i>asct</i>	2.72 ± 0.58	0.02311
^{RNAi} ATPε-F1β.ni	3.43 ± 1.15	0.55343 ^d
^{RNAi} ATPε-F1β.i (4 days)	2.46 ± 0.43	0.02092 ^e
Δ <i>asct</i> / ^{RNAi} ATPε-F1β.ni	2.00 ± 0.32	0.00035
Δ <i>asct</i> / ^{RNAi} ATPε-F1β.i (1 day)	1.84 ± 0.47	0.00081
Δ <i>asct</i> / ^{RNAi} ATPε-F1β.i (2 days)	1.78 ± 0.35	0.00093
Δ <i>asct</i> / ^{RNAi} ATPε-F1β.i (3 days)	1.69 ± 0.14	0.00003
Δ <i>asct</i> / ^{RNAi} ATPε-F1β.i (4 days)	1.57 ± 0.24	0.00030 ^e

^a i, RNAi cell lines tetracycline-induced during 1–4 days, depending on the cell line and the experiments; ni, non-induced RNAi cell lines.

^b Statistical significance for the difference in the ATP levels between the EATRO1125.T7T (WT) cells and the other cell lines was determined using Student's *t* test (bilateral and equal variance parameters). Statistical differences are significant for values of <0.05.

^c NA, not applicable.

^d Not significant.

^e Statistical difference between the ^{RNAi}ATPε-F1β.i and Δ *asct*/^{RNAi}ATPε-F1β.i (4 days) is 0.0267.

this hypothesis, down-regulation of SCoAS expression by RNAi is lethal for the procyclic trypanosomes (37). However, SCoAS is a TCA cycle enzyme also involved in proline catabolism and may be essential for purposes other than ATP production through the ASCT/SCoAS cycle (see supplemental Fig. S1). Here, we directly demonstrate that the ASCT/SCoAS cycle is involved in ATP production and is essential for parasite viability when oxidative phosphorylation is inhibited. Interestingly, the ^{RNAi}ASCT.i and ^{RNAi}ATPε-F1β.i single mutants show a similar reduction of their doubling time (Figs. 1C and 6B) and of their intracellular ATP concentrations (Table 3), suggesting that the ASCT/SCoAS cycle and oxidative phosphorylation equally contribute to ATP generation and that both are required for maximal growth rate in glucose-rich medium.

In contrast, production of acetate through ACH is not coupled to ATP production because we observed neither a growth phenotype with the Δ *ach*/^{RNAi}ATPε-F1β double mutant nor a significant oligomycin sensitivity of the Δ *ach* single mutant. Furthermore, the recombinant ACH does not show a CoA-transferase activity to succinate. This raises questions about competition of ACH with ATP production in the acetate branch because ASCT and ACH share the same pool of substrate (mitochondrial acetyl-CoA). In procyclic extracts, the ASCT maximum velocity is at least 10-fold higher compared with ACH (58 and <5 milliunits/mg of protein, respectively) (13). This suggests that the ACH contribution to acetate production is minor in the wild type cells grown in standard glucose-rich conditions. This is consistent with acetate production in the ^{RNAi}ASCT.i and Δ *ach* mutants, which is at a level of ~70% or close to 100%, respectively (Table 1). The relatively low ACH specific activity in *T. brucei* is consistent with its low k_{cat} compared with the rat liver cytosolic ACH (2.7 versus 341 s⁻¹) (39). It is, however, noteworthy that its k_{cat} is similar to that of the rat liver mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase, which shows an acetyl-CoA thioesterase activity (1.2 s⁻¹) (40). Although the contribution of ACH is low in procyclic trypanosomes grown in glucose-rich conditions, ATP production in the

acetate branch may be tuned by regulation of ACH or ASCT expression and/or activities in other physiological conditions. For instance, in the absence of glucose, the procyclic cells considerably increase their mitochondrial capacity for ATP production. First, the rate of proline degradation is ~6-fold increased (34), with an estimated 10-fold increase of the mitochondrial production of reducing equivalents (41). Consequently, electron flow increase through the respiratory chain may lead to an increase of ATP production by oxidative phosphorylation (14). Second, ATP production by the TCA cycle SCoAS step increases proportionately with the increase of proline consumption (~6-fold) (see supplemental Fig. S1). Third, in these glucose-depleted conditions, high amounts of acetate are nevertheless produced from threonine to feed fatty acid *de novo* biosynthesis, further adding to ATP production through the ASCT/SCoAS cycle (32, 34). ATP is exported to the cytoplasm in low glucose conditions, but ATP production has to be regulated to prevent mitochondrial ADP depletion. One way to achieve this in kinetoplastids is redirecting the electron flow toward the trypanosome alternative oxidase, which is not involved in proton gradient and hence ATP production. We propose that modulating the ACH and/or ASCT activity ratio is an alternative mechanism. It is noteworthy that the trypanosome alternative oxidase does not exist in *Leishmania* spp. (42), which may therefore rely on the ASCT and ACH pair present in the genome (TriTrypDB).

Another possible function of ACH may be to hydrolyze the CoA radical of other acyl-CoAs because ACH belongs to the acyl-CoA thioesterase family, which shows a broad substrate specificity ranging from acetyl-CoA to long-chain acyl-CoAs (43). The *T. brucei* enzyme is specific for short-chain fatty acids (C2, C4, and to a lesser extent C6) and shows no detectable activity with longer acyl-CoAs (from C8 to C20). Consequently, ACH is not directly involved in fatty acid metabolism by acyl-CoA thioesterification. Interestingly, the *T. brucei* ACH shows a particularly high specific activity for C4 acyl-CoAs (butyryl-CoA, acetoacetyl-CoA, β -hydroxybutyryl-CoA, and crotonyl-CoA), which are precursors of ketone bodies (β -hydroxybutyrate and acetoacetate). The procyclic trypanosomes produce and excrete β -hydroxybutyrate from proline metabolism (14) as well as from glucose metabolism when acetate production is reduced in the Δ *asct* and ^{RNAi}ASCT.i mutants (13) or succinate production is abolished in the Δ *pepck* mutant (16). ACH could be involved in ketone body production by hydrolyzing β -hydroxybutyryl-CoA and/or acetoacetyl-CoA into β -hydroxybutyrate and acetoacetate, respectively. The role of ketone body production from proline metabolism in wild type trypanosomes is unknown. Detailed analyses of intracellular metabolites in the Δ *ach* cell line will be helpful to understand this unexpected pathway.

In conclusion, we have demonstrated that the ASCT/SCoAS cycle is a key player in ATP production by substrate level phosphorylation in the mitochondrion of procyclic trypanosomes, and its contribution to ATP production seems equivalent to oxidative phosphorylation by the mitochondrial ATPε. ASCT has been described in several other parasites, where it probably also plays an important or essential role in ATP production (1, 2). These organisms are not amenable or are poorly amenable

Mitochondrial Acetate and ATP Production in Trypanosomes

to reverse genetic approaches, and no ASCT inhibitors are known yet, preventing functional characterization of the enzyme's role. For anaerobic or microaerophilic pathogenic parasites, ASCT may be an attractive target for inhibitor development.

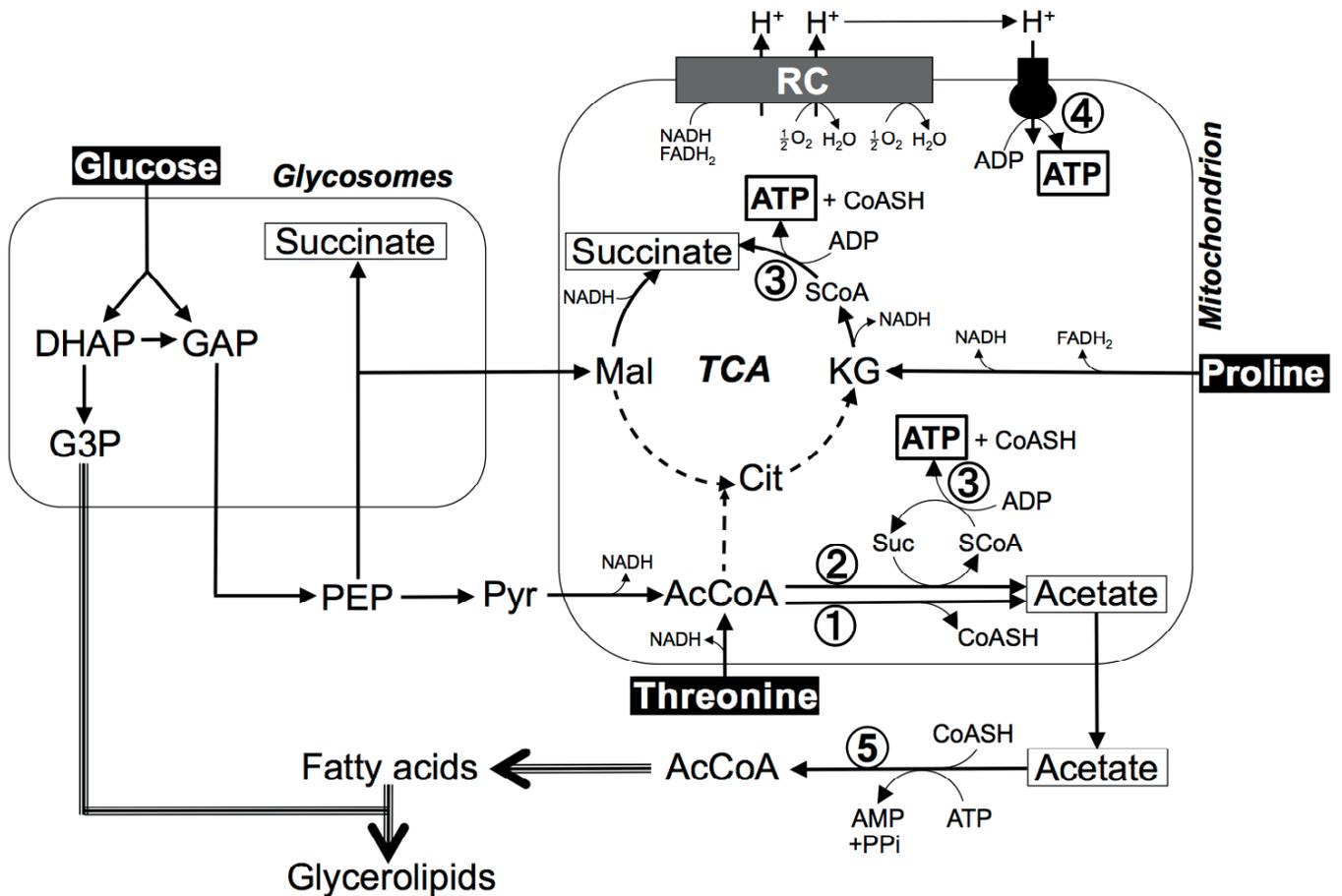
Acknowledgments—We thank Dave Speijer (Amsterdam, Netherlands) for providing the immune serum against the F1 β subunit of the F₀/F₁-ATP synthase, Paul P. Van Veldhoven (Leuven, Belgium) for the ACH activity protocol, and Michel Rigoulet (Bordeaux, France) for the luminometer.

REFERENCES

- Bringaud, F., Ebikeme, C., and Boshart, M. (2010) Acetate and succinate production in amoebae, helminths, diplomonads, trichomonads, and trypanosomatids. Common and diverse metabolic strategies used by parasitic lower eukaryotes. *Parasitology* **137**, 1315–1331
- Tielens, A. G., van Grinsven, K. W., Henze, K., van Hellemond, J. J., and Martin, W. (2010) Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists. *Int. J. Parasitol.* **40**, 387–397
- Van Hellemond, J. J., Opperdoes, F. R., and Tielens, A. G. (1998) Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3036–3041
- Saz, H. J., deBruyn, B., and de Mata, Z. (1996) Acyl-CoA transferase activities in homogenates of *Fasciola hepatica* adults. *J. Parasitol.* **82**, 694–696
- Ghedini, E., Wang, S., Spiro, D., Caler, E., Zhao, Q., Crabtree, J., Allen, J. E., Delcher, A. L., Guiliano, D. B., Miranda-Saavedra, D., Angiuoli, S. V., Creasy, T., Amedeo, P., Haas, B., El-Sayed, N. M., Wortman, J. R., Feldblyum, T., Tallon, L., Schatz, M., Shumway, M., Koo, H., Salzberg, S. L., Schobel, S., Perte, M., Pop, M., White, O., Barton, G. J., Carlow, C. K., Crawford, M. J., Daub, J., Dimmic, M. W., Estes, C. F., Foster, J. M., Ganatra, M., Gregory, W. F., Johnson, N. M., Jin, J., Komuniecki, R., Korf, I., Kumar, S., Laney, S., Li, B. W., Li, W., Lindblom, T. H., Lustigman, S., Ma, D., Maina, C. V., Martin, D. M., McCarter, J. P., McReynolds, L., Mitreva, M., Nutman, T. B., Parkinson, J., Peregrin-Alvarez, J. M., Poole, C., Ren, Q., Saunders, L., Sluder, A. E., Smith, K., Stanke, M., Unnasch, T. R., Ware, J., Wei, A. D., Weil, G., Williams, D. J., Zhang, Y., Williams, S. A., Fraser-Liggett, C., Slatko, B., Blaxter, M. L., and Scott, A. L. (2007) Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* **317**, 1756–1760
- van Hoek, A. H., Akhmanova, A. S., Huynen, M. A., and Hackstein, J. H. (2000) A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 202–206
- Steinbüchel, A., and Müller, M. (1986) Anaerobic pyruvate metabolism of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**, 57–65
- Marvin-Sikkema, F. D., Pedro Gomes, T. M., Grivet, J. P., Gottschal, J. C., and Prins, R. A. (1993) Characterization of hydrogenosomes and their role in glucose metabolism of *Neocallimastix* sp. L2. *Arch. Microbiol.* **160**, 388–396
- Denoëud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., Viscogliosi, E., Brochier-Armanet, C., Couloux, A., Poulain, J., Segurens, B., Anthouard, V., Texier, C., Blot, N., Poirier, P., Ng, G. C., Tan, K. S., Artiguenave, F., Jaillon, O., Aury, J. M., Delbac, F., Wincker, P., Vivarès, C. P., and El Alaoui, H. (2011) Genome sequence of the stramenopile Blastocystis, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* **12**, R29
- Fritz-Laylin, L. K., Prochnik, S. E., Ginger, M. L., Dacks, J. B., Carpenter, M. L., Field, M. C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J., Pham, J., Shu, S., Neupane, R., Cipriano, M., Mancuso, J., Tu, H., Salamov, A., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., Grigoriev, I. V., Cande, W. Z., Fulton, C., Rokhsar, D. S., and Dawson, S. C. (2010) The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**, 631–642
- Besteiro, S., Biran, M., Biteau, N., Coustou, V., Baltz, T., Canioni, P., and Bringaud, F. (2002) Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. *J. Biol. Chem.* **277**, 38001–38012
- Bringaud, F., Rivière, L., and Coustou, V. (2006) Energy metabolism of trypanosomatids. Adaptation to available carbon sources. *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**, 1–9
- Rivière, L., van Weelden, S. W., Glass, P., Vegh, P., Coustou, V., Biran, M., van Hellemond, J. J., Bringaud, F., Tielens, A. G., and Boshart, M. (2004) Acetyl:succinate CoA-transferase in procyclic *Trypanosoma brucei*. Gene identification and role in carbohydrate metabolism. *J. Biol. Chem.* **279**, 45337–45346
- Coustou, V., Biran, M., Breton, M., Guegan, F., Rivière, L., Plazolles, N., Nolan, D., Barrett, M. P., Franconi, J. M., and Bringaud, F. (2008) Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **283**, 16342–16354
- Brun, R., and Schönenberger, M. (1979) Cultivation and *in vitro* cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semidefined medium. Short communication. *Acta Trop.* **36**, 289–292
- Ebikeme, C., Hubert, J., Biran, M., Gouspillou, G., Morand, P., Plazolles, N., Guegan, F., Diollez, P., Franconi, J. M., Portais, J. C., and Bringaud, F. (2010) Ablation of succinate production from glucose metabolism in the procyclic trypanosomes induces metabolic switches to the glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate shuttle and to proline metabolism. *J. Biol. Chem.* **285**, 32312–32324
- Bringaud, F., Robinson, D. R., Barradeau, S., Biteau, N., Baltz, D., and Baltz, T. (2000) Characterization and disruption of a new *Trypanosoma brucei* repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**, 283–297
- Bringaud, F., Baltz, D., and Baltz, T. (1998) Functional and molecular characterization of a glycosomal PP_i-dependent enzyme in trypanosomatids. Pyruvate, phosphate dikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7963–7968
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14687–14692
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., and Cross, G. A. (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**, 89–101
- Harlow, E., and Lane, D. (eds). (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (eds) (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Speijer, D., Breek, C. K., Muijsers, A. O., Hartog, A. F., Berden, J. A., Albracht, S. P., Samyn, B., Van Beeumen, J., and Benne, R. (1997) Characterization of the respiratory chain from cultured *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **85**, 171–186
- Bringaud, F., Peyruchaud, S., Baltz, D., Giroud, C., Simpson, L., and Baltz, T. (1995) Molecular characterization of the mitochondrial heat shock protein 60 gene from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**, 119–123
- Choe, J., Guerra, D., Michels, P. A., and Hol, W. G. (2003) *Leishmania mexicana* glycerol-3-phosphate dehydrogenase showed conformational changes upon binding a bi-substrate adduct. *J. Mol. Biol.* **329**, 335–349
- Ramsay, R. R., and Tubbs, P. K. (1975) The mechanism of fatty acid uptake by heart mitochondria. An acylcarnitine-carnitine exchange. *FEBS Lett.* **54**, 21–25
- Mannaerts, G. P., Debeer, L. J., Thomas, J., and De Schepper, P. J. (1979) Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats. *J. Biol. Chem.* **254**, 4585–4595
- Coustou, V., Biran, M., Besteiro, S., Rivière, L., Baltz, T., Franconi, J. M., and Bringaud, F. (2006) Fumarate is an essential intermediary metabolite produced by the procyclic *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **281**, 26832–26846
- Akoka, S., Barantin, L., and Trierweiler, M. (1999) Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Anal. Chem.* **71**, 2554–2557
- Heape, A. M., Juguelin, H., Boiron, F., and Cassagne, C. (1985) Improved one-dimensional thin layer chromatographic technique for polar lipids.

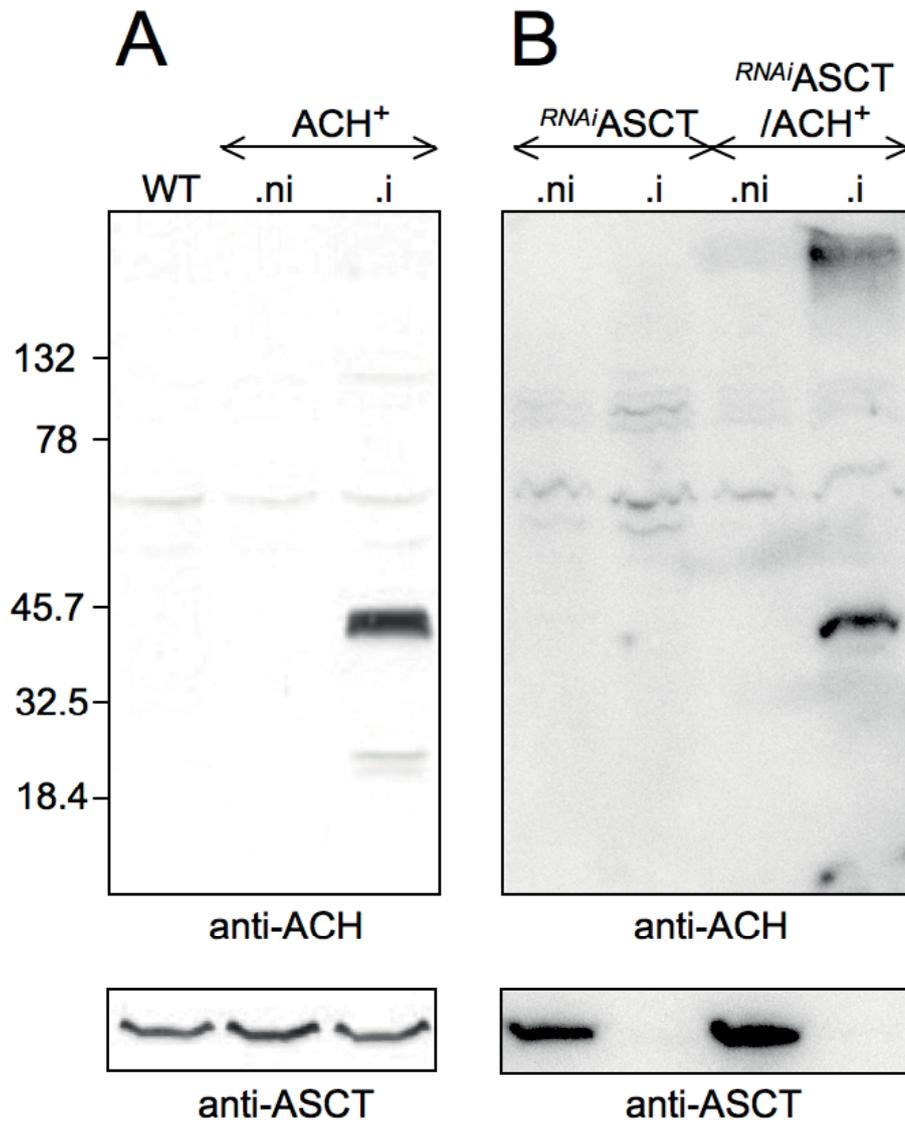
- J. Chromatogr.* **322**, 391–395
31. Lemasters, J. J., and Hackenbrock, C. R. (1979) Continuous measurement of adenosine triphosphate with firefly luciferase luminescence. *Methods Enzymol.* **56**, 530–544
 32. Riviere, L., Moreau, P., Allmann, S., Hahn, M., Biran, M., Plazolles, N., Franconi, J. M., Boshart, M., and Bringaud, F. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 12694–12699
 33. Spitznagel, D., Ebikeme, C., Biran, M., Nic a' Bháird, N., Bringaud, F., Henehan, G. T., and Nolan, D. P. (2009) Alanine aminotransferase of *Trypanosoma brucei*—a key role in proline metabolism in procyclic life forms. *FEBS J.* **276**, 7187–7199
 34. Lamour, N., Rivière, L., Coustou, V., Coombs, G. H., Barrett, M. P., and Bringaud, F. (2005) Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *J. Biol. Chem.* **280**, 11902–11910
 35. Coustou, V., Besteiro, S., Rivière, L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J. M., Boshart, M., Baltz, T., and Bringaud, F. (2005) A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **280**, 16559–16570
 36. de Mata, Z. S., deBruyn, B., and Saz, H. J. (1997) Acetyl-CoA hydrolase activity and function in *Ascaris suum* muscle mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **116**, 379–383
 37. Bochud-Allemann, N., and Schneider, A. (2002) Mitochondrial substrate level phosphorylation is essential for growth of procyclic *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **277**, 32849–32854
 38. Coustou, V., Besteiro, S., Biran, M., Diolez, P., Bouchaud, V., Voisin, P., Michels, P. A., Canioni, P., Baltz, T., and Bringaud, F. (2003) ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form. Cytosolic substrate level is essential, but not oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 49625–49635
 39. Suematsu, N., Okamoto, K., and Isohashi, F. (2003) Simple and unique purification by size-exclusion chromatography for an oligomeric enzyme, rat liver cytosolic acetyl-coenzyme A hydrolase. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **790**, 239–244
 40. Yamashita, H., Itsuki, A., Kimoto, M., Hiemori, M., and Tsuji, H. (2006) Acetate generation in rat liver mitochondria. Acetyl-CoA hydrolase activity is demonstrated by 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 17–23
 41. Bringaud, F., Barrett, M. P., and Zilberstein, D. (2012) Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Front. Biosci.* **17**, 349–374
 42. Chaudhuri, M., Ott, R. D., and Hill, G. C. (2006) Trypanosome alternative oxidase. From molecule to function. *Trends Parasitol.* **22**, 484–491
 43. Hunt, M. C., and Alexson, S. E. (2002) The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog. Lipid. Res.* **41**, 99–130

Figure S1



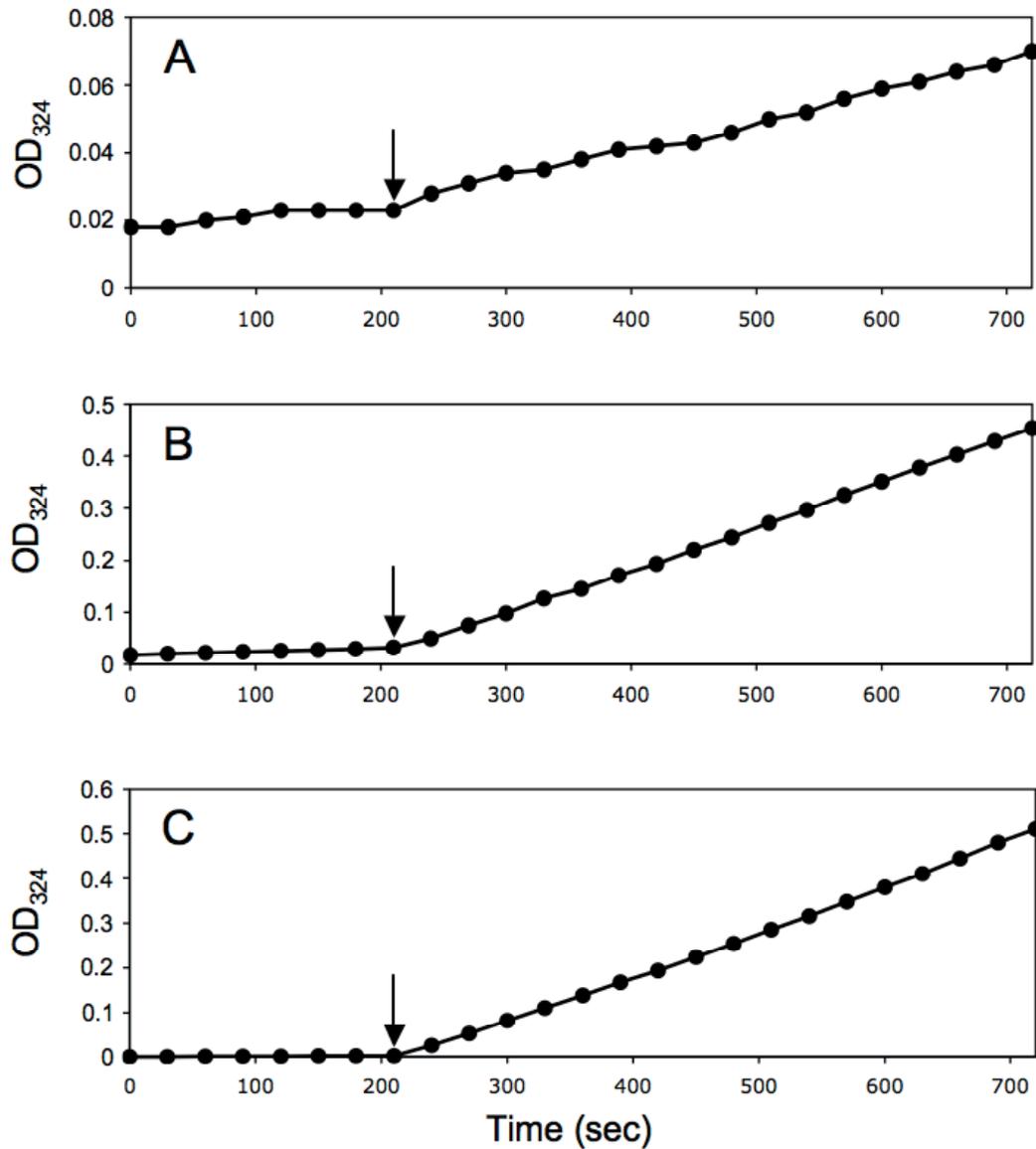
Schematic representation of the central energy metabolism in procyclic trypanosomes. Black arrows indicate enzymatic steps of glucose, proline and threonine metabolism, dashed arrows symbolize steps for which no evidence of flux is available, and triple line arrows represent *de novo* fatty acid biosynthesis. Mitochondrial production or consumption of reducing equivalents (NADH and FADH₂) and the respiratory chain (RC) responsible for transfer of electron from reducing equivalents to molecular oxygen *via* the terminal oxydases are indicated. Abbreviations: AcCoA, acetyl-CoA; Cit, citrate; CoASH, coenzyme A; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; G3P, glycerol 3-phosphate; KG, 2-ketoglutarate; MAL, malate; PEP, phosphoenolpyruvate; Pyr, pyruvate; RC, respiratory chain. Indicated enzymes are: 1, acetyl-CoA thioesterase (ACH); 2, acetate:succinate CoA-transferase (ASCT); 3, succinyl-CoA synthetase (SCoAS); 4, F₀/F₁-ATP synthase (ATP_ε); 5, acetyl-CoA synthetase “AMP forming” (AceCS).

Figure S2



Over-expression of ACH in WT (panel A) and *RNAi*ASCT (panel B) cell lines. Lysates of *T. brucei* EATRO1125.T7T procyclic form (WT), non-induced (.ni) and tetracycline-induced (.i) ACH over-expressing parasite (ACH⁺), *RNAi*ASCT and *RNAi*ASCT/ACH⁺ cell lines (5×10^6 cells) were analyzed by Western blotting with the anti-ACH and anti-ASCT immune sera. The positions of the molecular weight markers are indicated in kDa on the left of panel A.

Figure S3



Measurement of the ACH activity in wild type procyclic trypanosomes (panel A), procyclic cells over-expressing ACH^{his} (panel B) and ACH^{his} purified by NTA affinity chromatography (panel C). Production of 4-thiopyridine resulting from Aldrithiol reaction with free CoASH is followed at 324 nm during 210 sec before adding acetyl-CoA (arrow), the ACH substrate. Increase of absorbance was measured for 700 sec after addition of acetyl-CoA. The assay was performed with ~70 µg of proteins from total procyclic cell extracts (panels A and B) and 1 µg of purified ACH^{his} (panel C).

2.2 Article II : The threonine degradation pathway of the *Trypanosoma brucei* procyclic form: the main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control

2.2.1 Résumé de l'article

La forme procyclique de *T. brucei* est capable de métaboliser la thréonine, dont le taux de consommation est aussi important, sinon plus élevé, que celui du glucose (Lamour, Rivière et al. 2005). Il est admis que la dégradation de cet acide aminé aboutit à la production en quantités équimolaires d'acétate et de glycine mais cette voie métabolique n'a pas été expérimentalement démontrée. Pour caractériser cette voie métabolique, j'ai dans un premier temps étudié la contribution du glucose et de la thréonine pour la production d'acétate. Une analyse par RMN du proton des produits excrétés par les cellules parentales incubées avec du [U-¹³C]-glucose et de la thréonine, a montré que la thréonine contribue environ 2,5 fois plus à la production d'acétate que le glucose. De plus, l'ajout de thréonine au [U-¹³C]-glucose entraîne une augmentation de la production globale d'acétate mais une diminution de cette production à partir du glucose. Enfin, l'approche RMN nous a permis de confirmer que l'acétate et la glycine sont bien produits en quantités équimolaires à partir de la thréonine.

Nous avons montré dans l'article précédent que la production d'acétate à partir du glucose dans la mitochondrie était nécessaire à la biosynthèse *de novo* des acides gras. La thréonine étant la principale source de carbone utilisée pour la production d'acétate, nous avons étudié, en collaboration avec l'équipe de Patrick Moreau (CNRS, Bordeaux), la contribution relative du glucose et de la thréonine pour la production des acides gras. Ainsi, lorsque les cellules sont incubées en présence de [¹⁴C]-glucose ou de [¹⁴C]-thréonine, il y a 2,5 fois plus d'incorporation de thréonine dans les acides gras et dans les stérols que de glucose.

D'après le modèle actuel, la dégradation de la thréonine fait intervenir successivement deux enzymes : une thréonine-3-déhydrogénase (TDH) et une 2-amino-3-cétobutyrate coenzyme A ligase (AKCL). Ces réactions aboutissent à la production d'acétyl-CoA et de glycine. Deux gènes codant potentiellement ces enzymes ont été identifiés dans le génome de *T. brucei*. Afin de décrire la voie de dégradation de cet acide aminé, nous avons généré un mutant ^{ARNi}TDH qui ne présente pas de phénotype de croissance après induction. Nous avons également produit un anticorps anti-TDH. J'ai ainsi pu localiser la TDH dans la mitochondrie par immunofluorescence et montrer par Western-Blot que la TDH n'est plus détectable dans le mutant ARNi après induction. L'incubation des cellules en présence de [¹³C]-glucose et de

thréonine nous a permis de montrer par RMN du proton que le mutant ^{ARNi}TDH induit ne produit plus d'acétate à partir de la thréonine.

Le pyruvate provenant de la dégradation du glucose est dégradé en acétyl-CoA par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) dans la mitochondrie. Des mutants knock out et ARNi de la sous-unité E2 de la PDH sont viables dans un milieu contenant de la thréonine. En revanche, les cellules meurent en l'absence de thréonine dans le milieu de culture. L'analyse par RMN du proton en présence de [¹³C]-glucose et de thréonine a montré que la production d'acétate à partir du glucose est fortement réduite dans le mutant ^{ARNi}PDH et abolie dans le Δpdh .

Nous avons ensuite généré des doubles mutants Δpdh /^{ARNi}TDH et ^{ARNi}TDH/^{ARNi}PDH afin d'inhiber la production d'acétate à partir du glucose et de la thréonine. Après induction, ces mutants sont létaux et ne produisent plus d'acétate que ce soit à partir du glucose ou de la thréonine, confirmant ainsi le rôle essentiel de la production d'acétate (et d'acétyl-CoA) dans la mitochondrie de ces parasites.

Nous avons précédemment montré que l'acétate est produit dans la mitochondrie à partir de l'acétyl-CoA provenant de la dégradation du glucose par l'action de l'ACH et de l'ASCT. J'ai également montré que ces mêmes enzymes, l'ACH et l'ASCT, sont utilisées pour la dégradation de la thréonine en acétate. En effet, le mutant Δach /^{ARNi}ASCT ne produit plus d'acétate à partir du glucose et de la thréonine.

Le phospho $enol$ pyruvate (PEP) produit dans le cytosol par la glycolyse se situe à un carrefour métabolique, puisqu'une partie est convertie en acétate dans la mitochondrie et l'autre partie en succinate dans les glycosomes et la mitochondrie (voir Fig. 16). Il a été montré au laboratoire que la production du succinate est abolie chez un mutant $\Delta pepck$, avec une redistribution du flux glycolytique vers la production d'acétate (Ebikeme, Hubert et al. 2010). La comparaison du protéome de ce mutant et de la souche parentale par 2D-DiGE, effectuée par l'équipe de Richard Burchmore (Glasgow, UK), a révélé que la TDH est 1,5 fois moins exprimée dans le mutant $\Delta pepck$. J'ai confirmé ces résultats en montrant que (1) l'activité enzymatique TDH est diminuée de moitié dans le $\Delta pepck$ comparé à la souche parentale, (2) la TDH est 1,7 fois moins exprimée dans le $\Delta pepck$ et (3) la contribution de la thréonine dans la production d'acétate est 1,8 fois diminuée dans le $\Delta pepck$. Ces résultats montrent d'une part que l'activité TDH est une étape limitante dans la voie de dégradation de la thréonine et d'autre part que l'expression du gène *TDH* est sous contrôle, comme observé dans le mutant $\Delta pepck$.

La thréonine, bien que n'étant pas essentielle à la croissance de la forme procyclique de *T. brucei*, est la principale source de carbone utilisée par le parasite pour la production de l'acétate, des acides gras et des stérols. Les voies de dégradation du glucose et de la thréonine aboutissent à la production d'acétate en utilisant une dernière étape commune, catalysée par l'ACH et l'ASCT. Enfin nos résultats montrent que l'expression du gène *TDH* diminue chez un mutant dont le flux glycolytique est redirigé vers la production d'acétate. Nous pensons que la possible accumulation d'acétyl-CoA provenant du glucose chez le mutant $\Delta pepck$ serait responsable de la répression de l'expression du gène TDH pour éviter une accumulation supplémentaire d'acétyl-CoA qui serait néfaste pour le parasite.

2.2.2 Article

The threonine degradation pathway of the *Trypanosoma brucei* procyclic form: the main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control

Yoann Millerieux,^{1†} Charles Ebikeme,^{1†} Marc Biran,¹ Pauline Morand,¹ Guillaume Bouyssou,² Isabel M. Vincent,³ Muriel Mazet,¹ Loïc Riviere,⁴ Jean-Michel Franconi,¹ Richard J. S. Burchmore,³ Patrick Moreau,² Michael P. Barrett³ and Frédéric Bringaud^{1*}

¹Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques (RMSB), UMR-5536 Université Bordeaux Segalen, CNRS, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

²Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR-5200 Université Bordeaux Segalen, CNRS, Bâtiment A3-1er étage, INRA Bordeaux Aquitaine BP81, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France.

³Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, and Glasgow Polyomics, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, CMVLS, University of Glasgow, Glasgow G12 8TA, UK.

⁴Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, UMR-5234 Université Bordeaux Segalen, CNRS, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

Summary

The *Trypanosoma brucei* procyclic form resides within the digestive tract of its insect vector, where it exploits amino acids as carbon sources. Threonine is the amino acid most rapidly consumed by this parasite, however its role is poorly understood. Here, we show that the procyclic trypanosomes grown in rich medium only use glucose and threonine for lipid biosynthesis, with threonine's contribution being ~ 2.5 times higher than that of glucose. A combination of reverse genetics and NMR analysis of excreted end-products from threonine and glucose metabolism, shows that acetate, which feeds lipid biosynthesis, is also produced primarily from threonine. Interestingly, the first enzymatic step of the threonine degrada-

tion pathway, threonine dehydrogenase (TDH, EC 1.1.1.103), is under metabolic control and plays a key role in the rate of catabolism. Indeed, a trypanosome mutant deleted for the phosphoenolpyruvate decarboxylase gene (*PEPCK*, EC 4.1.1.49) shows a 1.7-fold and twofold decrease of TDH protein level and activity, respectively, associated with a 1.8-fold reduction in threonine-derived acetate production. We conclude that TDH expression is under control and can be downregulated in response to metabolic perturbations, such as in the *PEPCK* mutant in which the glycolytic metabolic flux was redirected towards acetate production.

Introduction

Trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* group are the aetiological agents of Human African trypanosomiasis, a parasitic disease that affects over 36 countries in sub-Saharan Africa (Barrett *et al.*, 2003). The *T. brucei* life cycle is complex, and the parasite adapts to life in both its insect (tsetse fly) and mammalian hosts. These distinct environments require remodelling of parasite metabolism to enable adaptation in each. In the glucose-rich environment of mammalian blood, the bloodstream forms of the parasite rely solely on glucose to produce energy. The procyclic forms of the parasite living in the tsetse fly midgut – where glucose availability is scarce or absent – have developed an elaborate energy metabolism based on amino acids such as proline and threonine. In the insect, central energy metabolism of the procyclic trypanosomes is based on breakdown of proline, the main carbon and energy source circulating in haemolymph of the tsetse fly (Coustou *et al.*, 2008). Threonine, however, is the most abundantly consumed carbon source in procyclics grown in glucose-depleted conditions (Lamour *et al.*, 2005), but its contribution and exact role in central metabolism remains poorly understood.

When grown in standard glucose-rich conditions, procyclic trypanosomes prefer D-glucose to L-proline as a carbon source (Bringaud *et al.*, 2006). As a consequence, the rate of proline consumption is up to sixfold reduced, with succinate becoming the main end-product of its metabolism,

Accepted 29 July, 2013. *For correspondence. E-mail bringaud@rmsb.u-bordeaux2.fr; Tel. (+33) 5 57 57 46 32; Fax (+33) 5 57 57 45 56. †Contribution of these authors is equivalent.

© 2013 The Authors. Molecular Microbiology published by John Wiley & Sons Ltd.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

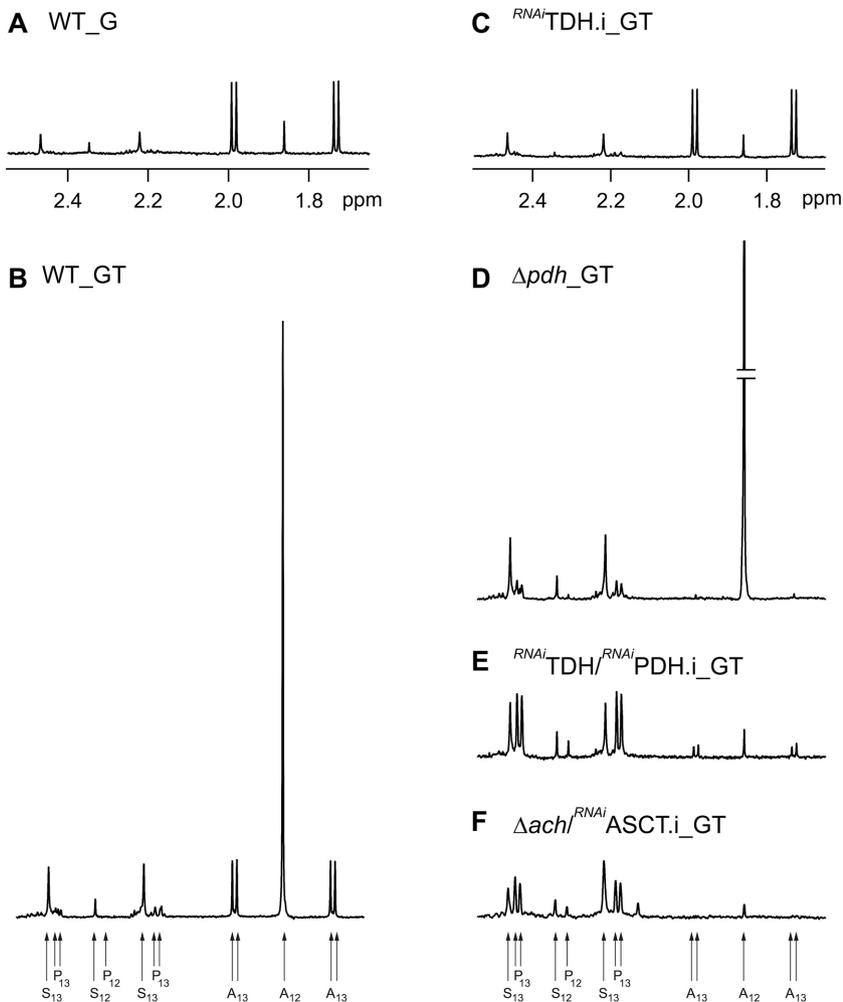


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ analysis of excreted end-products from glucose and threonine metabolism. Metabolic end-products (succinate, pyruvate, and acetate) excreted by the procyclic wild-type cell line (A and B), the Δpdh mutant (D) and the tetracycline-induced $^{RNAi}TDH.i$ (C), $^{RNAi}TDH/^{RNAi}PDH.i$ (E) and $\Delta ach/^{RNAi}ASCT.i$ (F) mutants from D-[U- ^{13}C]-glucose and/or threonine was determined by $^1\text{H-NMR}$. The cells were incubated in PBS containing 4 mM D-[U- ^{13}C]-glucose with (_GT) or without (_G) 4 mM threonine. Each spectrum corresponds to one representative experiment from a set of at least 3. A part of each spectrum ranging from 1.6 ppm to 2.6 ppm is shown (see panels A and C). The resonances were assigned as indicated in panels B and F: A₁₂, acetate; A₁₃, ^{13}C -enriched acetate; P₁₂, pyruvate; P₁₃, ^{13}C -enriched pyruvate; S₁₂, succinate; S₁₃, ^{13}C -enriched succinate.

Results

Threonine is the main source of acetate production

It is currently accepted that the procyclic trypanosomes produce acetate from glucose and threonine (Bringaud *et al.*, 2006); however, their relative contribution is unknown and possible involvement of additional carbon source(s) to acetate production has not been investigated. To address these questions we have developed a metabolite profiling assay based on the ability of proton NMR spectrometry to distinguish ^{13}C -enriched from ^{12}C molecules. Cells were incubated in PBS with equal amounts (4 mM) of D-[U- ^{13}C]-glucose and unenriched threonine (natural ^{13}C -enrichment is 1.1%), in order to perform a quantitative analysis of threonine-derived and glucose-derived acetate production by $^1\text{H-NMR}$. In addition, the same experiment was performed without threonine, to compare D-[U- ^{13}C]-glucose metabolism in the presence and in the absence of the amino acid. When glucose is the only carbon source in the incubation

medium, the procyclic trypanosomes excreted mainly acetate and succinate with traces of pyruvate from glucose metabolism (Fig. 2A and Table 1). [^{13}C]-Acetate derived from D-[U- ^{13}C]-glucose (annotated A₁₃ in Fig. 2B) is represented by two doublets, with chemical shifts at around 2.0 ppm and 1.75 ppm respectively (see Fig. 2A). The central resonance (1.88 ppm) corresponding to [^{12}C]-acetate, probably derived from an unknown internal carbon source (11.4% of the excreted acetate; 193 nmol *versus* 1692 nmol of excreted molecules $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein), is not included in the quantitative analyses. Addition of threonine to the D-[U- ^{13}C]-glucose/PBS medium induces (i) a huge increase of [^{12}C]-acetate excretion (3348 nmol *versus* 193 nmol of excreted molecules $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein), the difference (3155 \pm 561 nmol) corresponding to threonine-derived acetate, (ii) a 17.3% reduction of glucose contribution to acetate production (1240 \pm 250 nmol *versus* 1499 \pm 235 nmol of excreted molecules $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein, *P*-value < 0.001) and (iii) a 1.6-fold and 2.3-fold increase

Table 1. Excreted end-products of glucose and threonine metabolism by procyclic *T. brucei* cell lines.

Cell line ^{a,b}	<i>n</i> ^c	Excreted molecules from [¹³ C-U]-glucose ^d				Pyruvate	Alanine	TOTAL	
		Acetate	Succinate	nmol h ⁻¹ mg ⁻¹ of protein (% of excreted molecules)					
WT ^e	20	1499 ± 235 (72.0)	433 ± 151 (20.8)	150 ± 97 (7.2)	ND ^f	2082 ± 382 (100)			
<i>RNAi</i> TDH.ni	3	1358 ± 65 (65.5)	418 ± 30 (20.1)	300 ± 19 (14.4)	ND	2076 ± 93 (100)			
<i>RNAi</i> TDH.i	3	1505 ± 235 (67.4)	447 ± 64 (20.0)	281 ± 101 (12.6)	ND	2233 ± 413 (100)			
<i>RNAi</i> PPDH.ni	3	1132 ± 247 (62.0)	408 ± 66 (22.3)	286 ± 63 (15.7)	ND	1826 ± 369 (100)			
<i>RNAi</i> PPDH.i	3	71 ± 12 (3.4)	508 ± 94 (24.4)	1373 ± 269 (66.0)	131 ± 43 (6.3)	2083 ± 381 (100)			
<i>RNAi</i> TDH/ <i>RNAi</i> PPDH.ni	3	992 ± 92 (61.5)	415 ± 32 (25.7)	206 ± 81 (12.8)	ND	1613 ± 167 (100)			
<i>RNAi</i> TDH/ <i>RNAi</i> PPDH.i	3	119 ± 34 (8.7)	404 ± 45 (29.6)	780 ± 40 (57.2)	62 ± 61 (4.5)	1366 ± 124 (100)			
<i>Δlach</i> / <i>RNAi</i> ASCT.ni	5	1051 ± 150 (50.6)	617 ± 186 (29.7)	408 ± 160 (19.6)	ND	2076 ± 364 (100)			
<i>Δlach</i> / <i>RNAi</i> ASCT.i (4d)	4	200 ± 97 (13.9)	564 ± 237 (39.2)	674 ± 98 (46.9)	ND	1438 ± 283 (100)			
<i>Δlach</i> / <i>RNAi</i> ASCT.i (9d)	2	123 (7.6)	592 (36.6)	726 (44.8)	179 (11.1)	1621 (100)			
Cell line ^{a,g}	<i>n</i> ^c	Excreted molecules from [¹³ C-U]-glucose ^d				Pyruvate	Alanine	TOTAL	Ratio acetate (Thr)/(Glu)
		Excreted acetate from threonine ^h	Acetate	Succinate	nmol h ⁻¹ mg ⁻¹ of protein (% of excreted molecules)				
WT ^e	38	3155 ± 561	1240 ± 250 (53.1)	695 ± 156 (29.8)	346 ± 155 (14.8)	53 ± 64 (2.3)	2335 ± 368 (100)	2.54	
<i>RNAi</i> TDH.ni	3	881 ± 62	1356 ± 149 (64.4)	430 ± 121 (20.5)	318 ± 58 (15.1)	ND ^f	2104 ± 229 (100)	0.65	
<i>RNAi</i> TDH.i	3	ND	1463 ± 136 (64.1)	490 ± 16 (21.5)	329 ± 88 (14.4)	ND	2282 ± 237 (100)	<0.001	
<i>Δpdh</i>	6	3688 ± 273	ND	678 ± 232 (47.3)	621 ± 64 (43.4)	132 ± 45 (9.3)	1431 ± 120 (100)	>100	
<i>RNAi</i> PPDH.ni	9	3201 ± 322	1162 ± 94 (52.0)	608 ± 33 (27.2)	402 ± 42 (18.0)	61 ± 31 (2.8)	2233 ± 177 (100)	2.75	
<i>RNAi</i> PPDH.i	3	3134 ± 369	83 ± 30 (3.9)	847 ± 126 (39.7)	1058 ± 165 (49.6)	144 ± 81 (6.8)	2132 ± 278 (100)	37.8	
<i>Δpdh</i> / <i>RNAi</i> TDH.ni	3	1850 ± 70	ND	778 ± 75 (34.9)	1309 ± 79 (58.7)	144 ± 46 (6.4)	2231 ± 139 (100)	>100	
<i>Δpdh</i> / <i>RNAi</i> TDH.i	3	57 ± 37	ND	458 ± 88 (21.0)	1580 ± 289 (72.3)	149 ± 127 (6.8)	2187 ± 468 (100)	>100	
<i>RNAi</i> TDH/ <i>RNAi</i> PPDH.ni	3	710 ± 66	951 ± 100 (52.5)	505 ± 31 (27.9)	330 ± 35 (18.2)	25 ± 43 (1.4)	1811 ± 118 (100)	0.75	
<i>RNAi</i> TDH/ <i>RNAi</i> PPDH.i	3	64 ± 19	142 ± 34 (6.4)	545 ± 68 (24.4)	1488 ± 140 (66.7)	56 ± 32 (2.5)	2230 ± 223 (100)	0.45	
<i>Δlach</i> / <i>RNAi</i> ASCT.ni	6	1199 ± 236	492 ± 96 (20.4)	797 ± 229 (33.0)	1042 ± 289 (43.2)	83 ± 113 (3.4)	2415 ± 369 (100)	2.44	
<i>Δlach</i> / <i>RNAi</i> ASCT.i (4d)	4	103 ± 66	119 ± 92 (6.9)	511 ± 196 (29.5)	1004 ± 238 (58.0)	97 ± 131 (5.6)	1732 ± 199 (100)	0.87	
<i>Δlach</i> / <i>RNAi</i> ASCT.i (9d)	2	57	34 (1.8)	665 (34.8)	1006 (52.6)	208 (10.9)	1914 (100)	1.67	
<i>Δpepck</i>	11	1714 ± 215	1030 ± 136 (81.3)	52 ± 40 (4.1)	105 ± 86 (8.3)	80 ± 97 (6.3)	1267 ± 158 (100)	1.66	
<i>Δtdh</i> /TDH	3	1361 ± 46	1109 ± 92 (50.1)	782 ± 32 (35.4)	320 ± 26 (14.5)	ND	2211 ± 97 (100)	1.23	
<i>Δasc</i>	9	3304 ± 365	1070 ± 163 (53.2)	624 ± 180 (31.0)	320 ± 84 (15.9)	ND	2014 ± 242 (100)	3.09	

a. i: RNAi cell lines tetracycline-induced during 5 to 10 days depending on the cell line and the experiments; .ni: non-induced RNAi cell lines.

b. Cells incubated in PBS containing 4 mM [¹³C]-glucose.

c. Number of experiments.

d. Mean ± SD of 3 to 38 experiments (nmol h⁻¹ mg⁻¹ of protein) and the percent of each excreted molecules (values into brackets) are presented.

e. EATRO1125.T7T cell line.

f. Non-detectable.

g. Cells incubated in PBS containing 4 mM [¹³C]-glucose and 4 mM threonine.

h. Mean ± SD of 3 to 38 experiments (nmol h⁻¹ mg⁻¹ of protein) are presented.

i. Ratio between glucose-derived and threonine-derived acetate excreted.

The extracellular PBS medium of trypanosoma cell lines incubated in the presence of 4 mM [¹³C]-glucose, in the presence or not of 4 mM threonine, was analysed by ¹H-NMR spectrometry to detect and quantify excreted end-products.

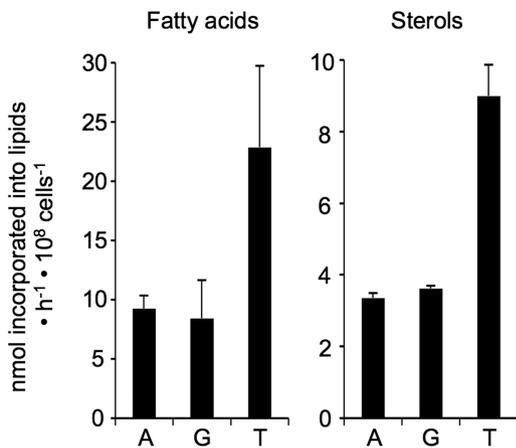


Fig. 3. [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-acetate, D- $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ -glucose and L- $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ -threonine incorporation into lipids of the procyclic trypanosomes. ^{14}C -labelled fatty acid methyl esters and sterols were separated by HPTLC after transesterification and analysed as described in the Experimental procedures section. The EATRO1125.T7T procyclic cells were incubated 16 h in SDM79 containing 4 mM glucose and 4 mM threonine with 1 mM acetate and [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-acetate (lanes A), D- $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ -glucose (lanes G) or L- $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ -threonine (lanes T) prior to lipid extraction. The data are expressed as nmol of acetate, glucose or threonine (radioactive and non-radioactive molecules) incorporated into fatty acids or sterols in 10^8 cells per hour. Error bars indicate mean \pm SD of 5 independent experiments.

of succinate and pyruvate excretion from glucose, probably as a consequence of the observed reduction of glucose-derived acetate production (Fig. 2B and Table 1). More importantly, these metabolite analyses show that, in the presence of equal amounts of threonine and glucose, the amino acid is the main source of acetate, which contributes approximately 2.5-fold more to acetate production than glucose (3155 ± 561 nmol versus 1240 ± 250 nmol of excreted molecules $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein). Unfortunately, we could not determine the rate of acetate production from threonine in the absence of glucose, because procyclic cells die within two hours in PBS/threonine conditions. To get closer to physiological conditions, the wild type procyclics were incubated in the presence of low amounts of threonine (0.2, 0.5 and 1 mM) with equimolar amounts of glycerol, a carbon source probably present in the insect vector instead of glucose. In these conditions, threonine remains the main acetate source regardless of the quantities of carbon sources available (Fig. S1).

Threonine is the main source for lipid biosynthesis

We previously reported that acetate produced in the mitochondrion of procyclic trypanosomes is essential for *de novo* fatty acid biosynthesis (Riviere *et al.*, 2009). To compare the relative contribution of threonine and glucose to lipid biosynthesis, we determined the radiolabel incorporation from D- $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ -glucose, $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ -threonine or

$[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -acetate into fatty acids and sterols in wild-type procyclic cells incubated for 16 h in SDM79 medium containing equal amounts of glucose and threonine (4 mM). Fatty acid methyl esters (FAMES) from total lipids were formed by trans-esterification, separated from sterols by HPTLC, and the radiolabelling of FAMES and sterols was then determined (Fig. 3). The amounts of threonine incorporated into fatty acids and sterols is ~ 2.5 -fold higher than the amount of glucose incorporated into these molecules, indicating that threonine is the preferred carbon source for lipid biosynthesis. This is in agreement with the observed ~ 2.5 times higher contribution of threonine to the production of acetate (Table 1), which is an essential precursor of *de novo* fatty acid biosynthesis (Riviere *et al.*, 2009).

Threonine degradation is a non-essential mitochondrial pathway in standard growth conditions

According to the current model, glucose-derived acetyl-CoA is produced from pyruvate by the action of the PDH complex (step 3 in Fig. 1). Acetyl-CoA is then converted in the mitochondrion into acetate by ASCT (step 4) and ACH (step 5) (Millerioux *et al.*, 2012). A pathway to produce acetate from threonine has not been experimentally validated to date but the *T. brucei* genome contains the coding capacity to degrade threonine to acetyl-CoA by threonine 3-dehydrogenase (TDH, EC 1.1.1.103; step 1) and 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase (EC 2.3.1.29, step 2). Antibodies raised against the *T. brucei* TDH protein expressed in *Escherichia coli* recognize a single 36.5 kDa protein in Western blots, corresponding to the protein's calculated molecular weight (36.96 kDa). Immunofluorescence analyses revealed colocalization with the mitochondrion-specific dye Mitotracker[®] Red CMXRos (Invitrogen) (Fig. 4, upper panel) and known mitochondrial

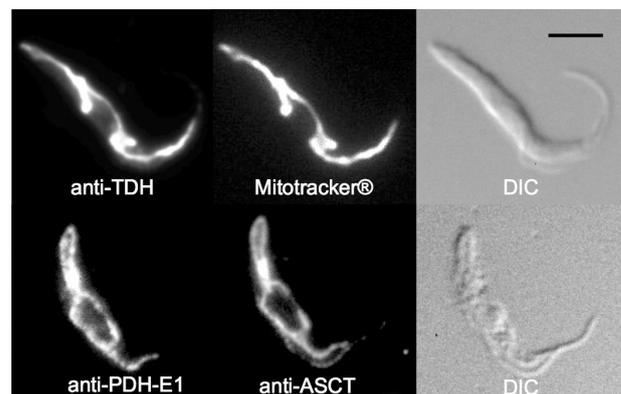


Fig. 4. Immunolocalization of TDH and PDH. Procyclic cells were stained with rabbit anti-TDH (Alexa 488 channel) and MitoTracker[®] (top panels) or mouse anti-PDH-E1 α (Alexa 488 channel) and rabbit anti-ASCT (Alexa 594 channel) (lower panels). Differential interference contrast (DIC) of cells is shown to the right of each panel. Scale bar, 5 μm .

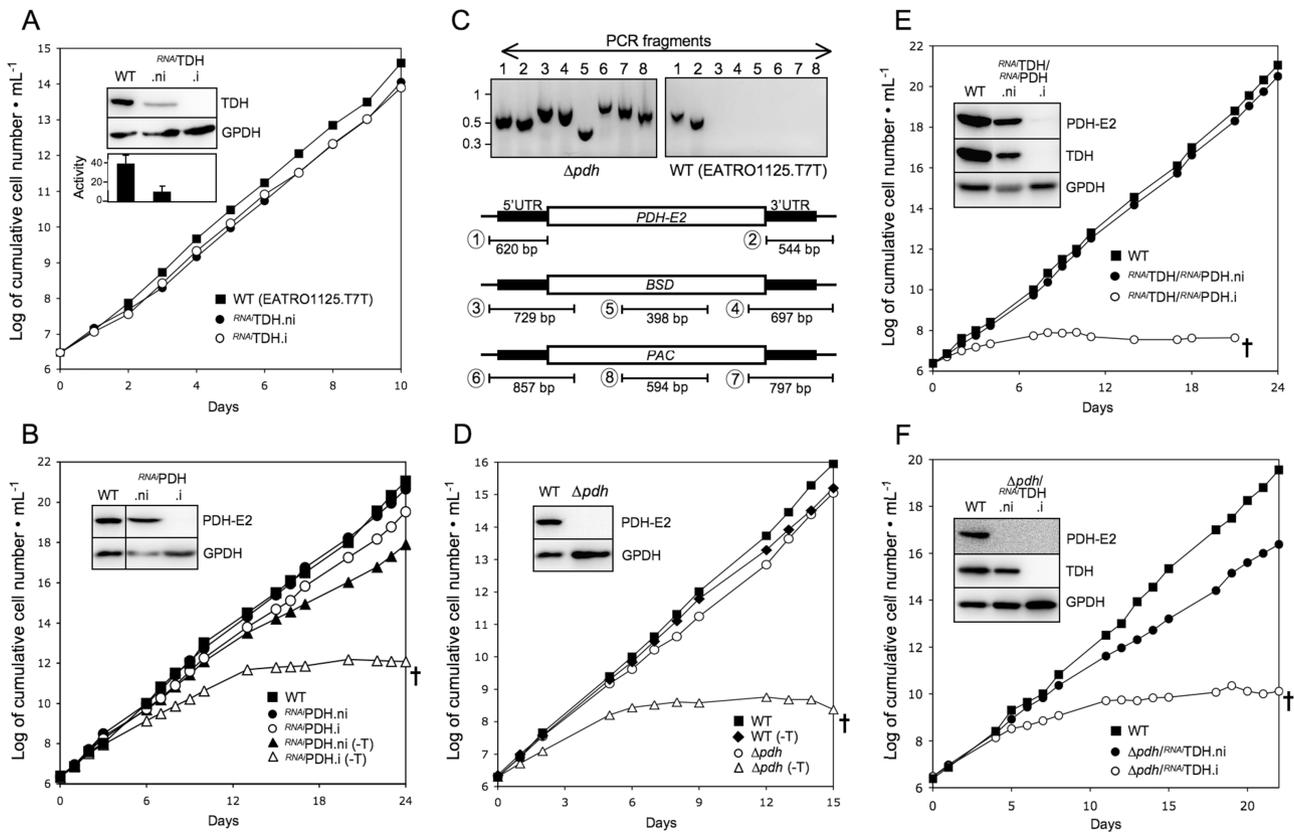


Fig. 5. Analysis of mutant cell lines. The figure shows growth curve of the Δpdh null mutant (D) and of the $RNAiTDH$ (A), $RNAiPDH$ (B), $RNAiTDH/RNAiPDH$ (E) and $\Delta pdh/RNAiTDH$ (F) mutant cell lines incubated in the presence (.i, \circ) or in the absence (.ni, \bullet) of tetracycline, and compared with the parental EATRO1125.T7T cell line (WT, \blacksquare). Cells were maintained in the exponential growth phase (between 10^6 and 10^7 cells ml^{-1}) and cumulative cell numbers reflect normalization for dilution during cultivation. All cell lines were grown in SDM79 medium; the $RNAiPDH$ (B), Δpdh (D) and WT (D) cell lines were also grown in threonine-depleted conditions (-T). Crosses indicate that all cells were dead. The insets in panels A–B and D–F show Western blot analyses of the parental (WT) and mutant cell lines with the immune sera indicated in the right margin. The lower inset in panel A shows the TDH activity (milliunits mg^{-1} of protein) normalized with the malic enzyme activity measured in the same samples. Panel C, shows a PCR analysis of genomic DNA isolated from the parental EATRO1125.T7T (WT) and Δpdh cell lines. Amplifications were performed with primers based on sequences that flank the 5'UTR and 3'UTR fragments used to target the *PDH-E2* gene depletion (black boxes) and internal sequences from the *PDH-E2* gene (PCR products 1 and 2), the blasticidin resistance gene (*BSD*, PCR products 3–5) or the puromycin resistance gene (*PAC*, PCR products 6–8). As expected, PCR amplification using primers derived from the *PDH-E2* gene and drug resistant genes were only observed for the parental EATRO1125.T7T and Δpdh cell lines respectively.

proteins including the E1 α subunit of PDH and ASCT (Fig. 4, lower panel). The mitochondrial localization of TDH is consistent with a 24 amino acid N-terminal mitochondrial targeting signal predicted by MitoProt (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) with a high probability (0.82).

Downregulation of the *TDH* gene in the EATRO1125.T7T background ($RNAiTDH$ cell line) showed no growth phenotype upon tetracycline induction (Fig. 5A), although the TDH enzyme activity and the TDH protein are no longer detectable up to 12 days after tetracycline induction (Fig. 5A, insets). Metabolite profiling of the tetracycline-induced $RNAiTDH.i$ cell line (.ni and .i stand for non-induced and tetracycline-induced respectively) incubated in the presence of 4 mM of D-[U- ^{13}C]-glucose and unenriched threonine showed a complete abolition of threonine-derived acetate production, while the rate

of acetate production from glucose reached the value observed for the wild-type cells incubated in the absence of threonine ($1463 \text{ nmol} \pm 136$ versus 1499 ± 235 nmol of excreted molecules $h^{-1} mg^{-1}$ of protein) (Fig. 2C and Table 1). This demonstrates that TDH is the only route through which threonine is metabolized to acetate. The increase of glucose-derived acetate production in the non-induced $RNAiTDH.ni$ cell line is probably a consequence of the 2.9-fold decrease in threonine-derived acetate production (Table 1), that correlates with a 3.9-fold reduction of TDH activity (Fig. 5A, inset), presumed to arise from leaky RNAi expression even under non-induced conditions. The data demonstrate that TDH and the threonine degradation pathway are not essential for growth of the parasite, nor is growth of WT cells affected by removing threonine from the medium (see Fig. 5D).

Inhibition of both threonine and glucose degradation is synthetically lethal

To completely abolish acetate production from both glucose and threonine metabolism, two complementary approaches were taken. First, expression of the E2 subunit of PDH (PDH-E2) was successfully downregulated in the *^{RNAi}PDH* cell line (Fig. 5B, inset) and both *PDH-E2* alleles were replaced by the BSD and PAC markers in the Δpdh cell line (Fig. 5C and D). Neither cell line is viable in threonine-depleted medium, while their growth is not affected in standard threonine-rich medium (Fig. 5B and D). Second, RNAi-mediated downregulation of TDH was performed in the *^{RNAi}PDH* and Δpdh backgrounds. Both the $\Delta pdh/^{RNAi}TDH$ and *^{RNAi}TDH/^{RNAi}PDH* cell lines die upon tetracycline induction in standard rich medium (Fig. 5E and F), confirming that abolition of acetyl-CoA/acetate production from glucose and threonine is lethal for the procyclic trypanosomes grown in glucose-rich conditions. Addition of 5 mM acetate in the medium does not rescue growth of the *^{RNAi}TDH/^{RNAi}PDH* mutant (data not shown), suggesting that acetate or acetyl-CoA have to be produced in the mitochondrion to feed essential pathway(s), such as biosynthesis of mitochondrial fatty acids by the prokaryotic-like type II fatty acid synthase (Guler *et al.*, 2008). In addition, acetate may participate in the generation of the mitochondrial membrane potential if exported from the mitochondrion in its protonated form (Bringaud *et al.*, 2010).

The NMR metabolite profiling of the PDH mutant cell lines (*^{RNAi}PDH.i* and Δpdh) incubated in the presence of both of D-[U-¹³C]-glucose and unenriched threonine, revealed that glucose-derived acetate production is 14-fold reduced (*^{RNAi}PDH.i*) compared with the parental cells, or not detectable (Δpdh). As expected, threonine-derived acetate production is not affected in these mutants (Table 1, Fig. 2D). In agreement with the current model of glucose and threonine metabolism, acetate production from both carbon sources is almost completely abolished in the $\Delta pdh/^{RNAi}TDH.i$ and *^{RNAi}TDH/^{RNAi}PDH.i* cell lines (Table 1, Fig. 2E). The rate of pyruvate production is considerably increased in all of these PDH-depleted mutants (up to 4.6-fold), while an increase in succinate production is moderate (up to 1.2-fold). As expected, pyruvate, the substrate of the targeted enzyme, accumulates in the PDH-depleted cell lines and is excreted. Succinate production occurs further upstream in the pathway (see Fig. 1) and is not significantly affected by PDH-depletion.

Glucose- and threonine-derived acetate branches share the same last step

We recently demonstrated that glucose-derived acetate is produced from acetyl-CoA by the action of two redundant

enzymes, acetate:succinate CoA-transferase (ASCT) and acetyl-CoA thioesterase (ACH) (Millerioux *et al.*, 2012). RNAi downregulation of ASCT expression in the ACH null background ($\Delta ach/^{RNAi}ASCT.i$ cell line) is lethal and abolished acetate production from glucose. NMR metabolite profiling of the $\Delta ach/^{RNAi}ASCT.i$ cell line incubated in the presence of 4 mM of D-[U-¹³C]-glucose and unenriched threonine, showed 36.5- and 55.4-fold reduction of acetate production from each of these carbon sources, respectively, after 9 days of tetracycline induction (Fig. 2F and Table 1). The ~2.5-fold reduction of acetate production from glucose (492 ± 96 nmol *versus* 1240 ± 250 nmol of excreted molecules h⁻¹ mg⁻¹ of protein) and threonine (1199 ± 236 nmol *versus* 3155 ± 561 nmol of excreted molecules h⁻¹ mg⁻¹ of protein) in the uninduced $\Delta ach/^{RNAi}ASCT$ cell line is due to RNAi leakage in addition to ACH gene deletion (Millerioux *et al.*, 2012). As expected, reduction of glucose-derived acetate production induced a notable increase in pyruvate excretion (threefold), even before tetracycline induction. These data clearly demonstrate, for the first time, that the last step of acetate production catalysed by ASCT and ACH is shared by the glucose and threonine degradation pathways.

Glycine production from threonine

Linstead *et al.* previously showed that threonine is converted into equimolar amounts of acetate and glycine (Linstead *et al.*, 1977). By ¹H-NMR, a single glycine resonance (3.52 ppm) is detected near one of the two threonine doublets (3.56 and 1.28 ppm) (see Fig. S2A, inset). Although the close proximity of these resonances (3.52 and 3.56 ppm) affects the quantitative analyses of glycine production and a 2D ¹H-NMR approach does not separate the glycine and threonine resonances (data not shown), this semi-quantitative analysis reveals that the ratio between threonine-derived glycine and acetate is 0.88 ± 0.14 , confirming that both end-products are secreted in similar amounts (see Fig. S2A). This ratio is 10-fold increased in the $\Delta ach/^{RNAi}ASCT.i$ cell line (9.51 ± 3.30), while it remains the same in the *^{RNAi}TDH.i* and *^{RNAi}TDH/^{RNAi}PDH.i* mutants (see Fig. S2B and C; quantitative data not shown). The higher production of glycine compared with acetate in the $\Delta ach/^{RNAi}ASCT.i$, is in agreement with the current model (Fig. 1), since glycine is produced before conversion of acetyl-CoA into acetate by ASCT and ACH. In addition, we observed that a significant amount of threonine-derived glycine is incorporated into trypanothione, which results from the condensation of spermidine with two glutathione molecules, the latter being a glycine containing tripeptide. LC-MS metabolic profiling of intracellular metabolites of the wild-type procyclic cells incubated with [¹⁵N]-threonine show that 26% of the trypanothione molecules are ¹⁵N-enriched (data not shown)

and given that cysteine, glutamate and spermidine, the other components of trypanothione are not labelled beyond the natural abundance of ^{15}N , this label must correspond to the incorporated glycine.

TDH expression is downregulated in the $\Delta pepck$ mutant

In the procyclic trypanosomes, glucose breakdown produces PEP, which is converted into two major excreted end-products, i.e. acetate and succinate (Fig. 1). We previously manipulated its intermediate metabolism by redirecting the glycolytic flux towards acetate production (Ebikeme *et al.*, 2010). This was performed by deleting the *PEPCK* gene ($\Delta pepck$ cell line), which encodes the first enzymatic step of both succinate branches (step 8). To identify possible protein expression adaptations in response to these metabolic changes, we compared the proteome of the $\Delta pepck$ and wild-type cells by 2D-DIGE, as previously described (Alban *et al.*, 2003). This analysis highlighted a protein species, which was 1.5-fold ($P = 4.0 \times 10^{-6}$) downregulated in the $\Delta pepck$ cell line (Fig. S3). This protein was confidently identified, by tandem mass spectrometry and Mascot searching, as TDH (MOWSE score 485, 56% peptide coverage). Modulation of TDH was confirmed by the 1.7-fold reduction of TDH in the $\Delta pepck$ cell line observed by Western blotting with the anti-TDH and anti-GPDH (control) immune sera (Fig. 6B). The TDH activity is also downregulated in the $\Delta pepck$ cell line by a similar order of magnitude (2.1-fold) (Fig. 6C). Interestingly, downregulation of TDH expression and activity induces a reduction of threonine's contribution to acetate production. Indeed, the ratio between threonine-derived and glucose-derived acetate production is 1.5-fold reduced in the $\Delta pepck$ cell line compared with the wild-type cells (1.66 *versus* 2.54) (Fig. 7A and B and Table 1). This correlation is consistent with the analysis of the $^{RNA}\text{T-DH.ni}$ cell line showing 3.9-fold and 3.6-fold reduction of TDH activity and threonine-derived acetate production respectively (Figs 5A and 7D, Table 1). In addition, ^{15}N -incorporation into trypanothione is approximately twofold reduced in the $\Delta pepck$ cell line compared with the wild-type parasites (data not shown).

To further confirm the direct correlation between the TDH protein/activity and threonine-derived acetate production, we generated a $\Delta tdh/\text{TDH}$ cell line in which one allele of the *TDH* gene was replaced by the puromycin marker (Fig. 6A). The $\Delta tdh/\text{TDH}$ cell line showed a twofold and 2.3-fold reduction of the TDH protein levels and activity respectively (Fig. 6B and C), associated to a twofold reduction of threonine's contribution to overall acetate production (Fig. 7C and Table 1), as observed for the $\Delta pepck$ cell line. Figure 8A illustrates the direct correlation of TDH activity and threonine-derived acetate production in the wild-type, $\Delta pepck$, $\Delta tdh/\text{TDH}$ and $^{RNA}\text{T-DH.ni}$ cell

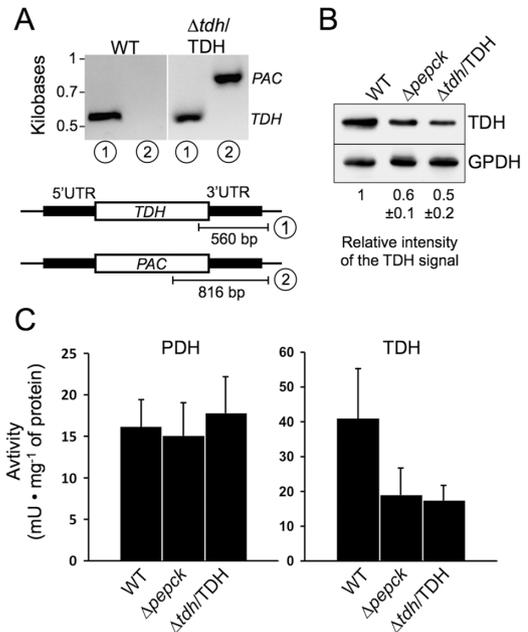


Fig. 6. TDH expression and activity are reduced in the $\Delta pepck$ cell line. Demonstration of the single *TDH* allele replacement in the $\Delta tdh/\text{TDH}$ cell line is presented in panel A. PCR analysis of genomic DNA isolated from the WT and $\Delta tdh/\text{TDH}$ cell lines was performed with primers based on sequences that flank the 3'UTR fragment used to target depletion of one *TDH* allele (black boxes) and internal sequences from the *TDH* gene (PCR product 1) or the *PAC* (PCR product 2). As expected, PCR amplification using the primer derived from the *PAC* gene was only observed for the $\Delta tdh/\text{TDH}$ cell line. In panel B, expression of TDH and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) was analysed by Western blotting with specific immune sera. Ratio between the TDH and GPDH signals, indicated below the blot, represents a mean \pm SD of 3 different experimental duplicates, with an arbitrary value of 1 for the parental cells (WT). Panel C shows the PDH (right panel) and TDH (left panel) activities (milliunits mg^{-1} of protein), normalized with the malic enzyme activity measured in the same samples, i.e. WT, $\Delta pepck$ and $\Delta tdh/\text{TDH}$ cell lines.

lines. Collectively these data demonstrate that TDH is a rate-limiting step of the threonine degradation pathway, which is downregulated in the $\Delta pepck$ cell line to reduce contribution of threonine in acetate production.

Uptake of threonine was investigated in the wild-type and $\Delta pepck$ cell lines and found that threonine uptake is similar in both cell lines, as was tyrosine uptake (Fig. 9), indicating that transport activity is not affected by *PEPCK* gene deletion.

Discussion

Threonine is a major carbon source consumed by procyclic trypanosomes and is converted into equimolar amounts of glycine and acetate (Cross *et al.*, 1975; Linstead *et al.*, 1977; and this present analysis). In contrast to glucose and proline, this amino acid alone cannot sustain growth of the parasite because it is not a good source for ATP production

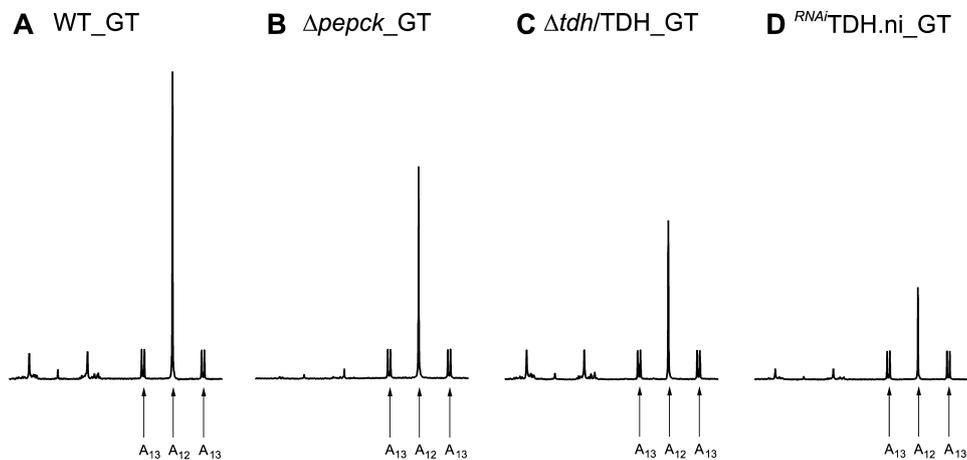


Fig. 7. Threonine-derived acetate excretion is reduced in the $\Delta pepck$ cell line. Metabolic end-products (succinate, pyruvate, and acetate) excreted by the procyclic wild-type (A), $\Delta pepck$ (B), Δtdh /TDH (C) and RNAi TDH.ni (D) cell lines from D-[U- ^{13}C]-glucose and threonine was determined by 1H -NMR. The cells were incubated in PBS containing 4 mM D-[U- ^{13}C]-glucose and 4 mM threonine. Each spectrum corresponds to one representative experiment from a set of at least 3. A part of each spectrum ranging from 1.6 ppm to 2.6 ppm is shown. For the resonances assignment, see Fig. 2.

(Lamour *et al.*, 2005). However, it is the amino acid by far the most rapidly consumed by procyclic trypanosomes grown in standard SDM79 medium, with a consumption rate similar to glucose (Lamour *et al.*, 2005). Here we show that threonine is the preferred carbon source for lipid biosynthesis, as previously proposed (Klein and Linstead, 1976), contributing to both the fatty acid and sterol biosynthetic pathways ~ 2.5 times more than glucose contributes to the same pathways. This implies that it is degraded to acetyl-CoA and acetate to feed the initial steps of sterol and fatty acid biosynthesis, which are respectively located in the mitochondrion (Carrero-Lerida *et al.*, 2009; Mazet *et al.*, 2011) and the cytosol (Vigueira and Paul, 2011) (see Fig. 1). We previously showed that glucose-derived acetate is produced exclusively inside the mitochondrion from acetyl-CoA by ASCT and ACH (Millerioux *et al.*, 2012). Here we show that the same two enzymes produce acetate from threonine, suggesting that the mitochondrion is the site for all acetyl-CoA and acetate production in procyclic form *T. brucei*. Thus, acetyl-CoA production and initiation of sterol biosynthesis take place in the same subcellular compartment; the first three steps of sterol biosynthesis from acetyl-CoA being catalysed by mitochondrial enzymes, i.e. thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthetase and HMG-CoA reductase (Carrero-Lerida *et al.*, 2009; Mazet *et al.*, 2011). However, acetyl-CoA must be transferred from the mitochondrion to the cytosol to feed the first step of the fatty acid biosynthetic pathways catalysed by the cytosolic acetyl-CoA carboxylase (Vigueira and Paul, 2011). This is achieved by the so-called acetate shuttle, a trypanosomatid specific pathway involving the cytosolic AceCS (Riviere *et al.*, 2009) (see Fig. 1).

Procyclic trypanosomes are not dependent on threonine for optimal growth in the standard glucose rich-medium, where glucose is sufficient to feed lipid biosynthesis. However, the role of threonine in lipid biosynthesis may be essential in the insect vector (*Glossina* species), which becomes a glucose-free environment 15–30 min after injection of the blood meal. The doubling time of procyclic cells grown in medium depleted of glucose, threonine and pyruvate is significantly reduced compared with glucose/pyruvate-depleted conditions (18.5 h *versus* 11.6 h), but not abolished (Y. Millerioux, M. Mazet, P. Morand and F. Bringaud, unpubl. data). It is important to note that our threonine-depleted medium still contains approximately 15 μ M threonine derived from the 10% supplement of fetal calf serum [mammalian blood contains ~ 150 μ M threonine (Cynober, 2002; Ohnishi *et al.*, 2012)]. This suggests that either 15 μ M threonine is sufficient to feed *de novo* lipid biosynthesis or additional carbon source(s) can be used for lipid biosynthesis, such as other ketogenic amino acids present in the standard medium as well as in the insect vector (Balogun *et al.*, 1969; Balogun, 1974), as long as the corresponding degradation pathway is functional in the parasite.

Leishmania genomes do not contain the threonine degradation pathways (orthologues of *TDH* and 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A genes are absent), suggesting that they have developed other acetyl-CoA/acetate production pathway(s). *Leishmania mexicana* promastigotes produce acetate from aspartate (Saunders *et al.*, 2011), although this pathway has not been described in procyclic trypanosomes (Berriman *et al.*, 2005). *Leishmania* promastigotes also produce acetyl-CoA from β -oxidation in their glycosomes (Gannavaram *et al.*, 2012; Colasante *et al.*,

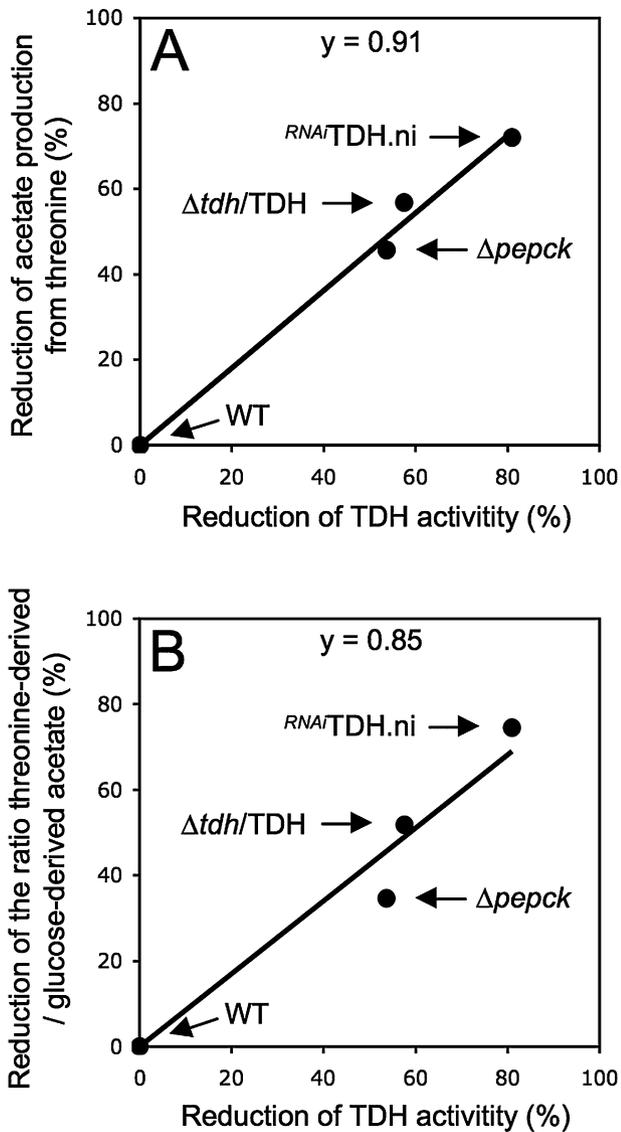


Fig. 8. Correlation between TDH activity and acetate production. These graphs show, the percentage of reduction of acetate production from threonine (panel A) and the percentage of reduction of the ratio between threonine-derived acetate and glucose-derived acetate (panel B), as a function of the TDH activity, in the $\Delta pepck$, $\Delta tdh/TDH$ and $RNAiTDH.ni$ mutants compared with the wild-type cells. The slope of the curves (y) is close to 1, suggesting a direct correlation between TDH activity and acetate production from threonine.

2013), although this pathway has also not been demonstrated in trypanosomes so far (Colasante *et al.*, 2006). In *Leishmania*, it has also been shown that leucine is the main precursor for sterol biosynthesis using an acetyl-CoA independent pathway. The same pathway has been shown to be only weakly active in *T. cruzi* but has not been investigated in *T. brucei* so far (Ginger *et al.*, 1999; 2000). Trypanosomes and *Leishmania* have clearly developed different strategies to provide acetyl-CoA, which is a key metabolite linking many biosynthetic and catabolic pathways.

In wild-type procyclic trypanosomes, a direct correlation is observed between the ratio of the specific activity of TDH and PDH (2.53; 41.0 mU mg⁻¹ of protein *versus* 16.2 mU mg⁻¹ of protein) and between the ratio of the threonine-derived and glucose-derived acetate productions (2.54; 3155 nmol *versus* 1240 nmol of excreted molecules h⁻¹ mg⁻¹ of protein). This suggests that the metabolic flux through the glucose and threonine branches is controlled primarily by PDH and TDH activities. The analysis of the $\Delta tdh/TDH$ cell line, lacking one *TDH* allele, strongly supports this hypothesis since a 58% reduction of the TDH activity leads to a 57% reduction of acetate production from threonine. The same correlation is observed in the $RNAiTDH.ni$ cell line (Fig. 8). A consequence of this metabolic control may be a fine-tuning of acetate production from the main acetate source, i.e. threonine, in

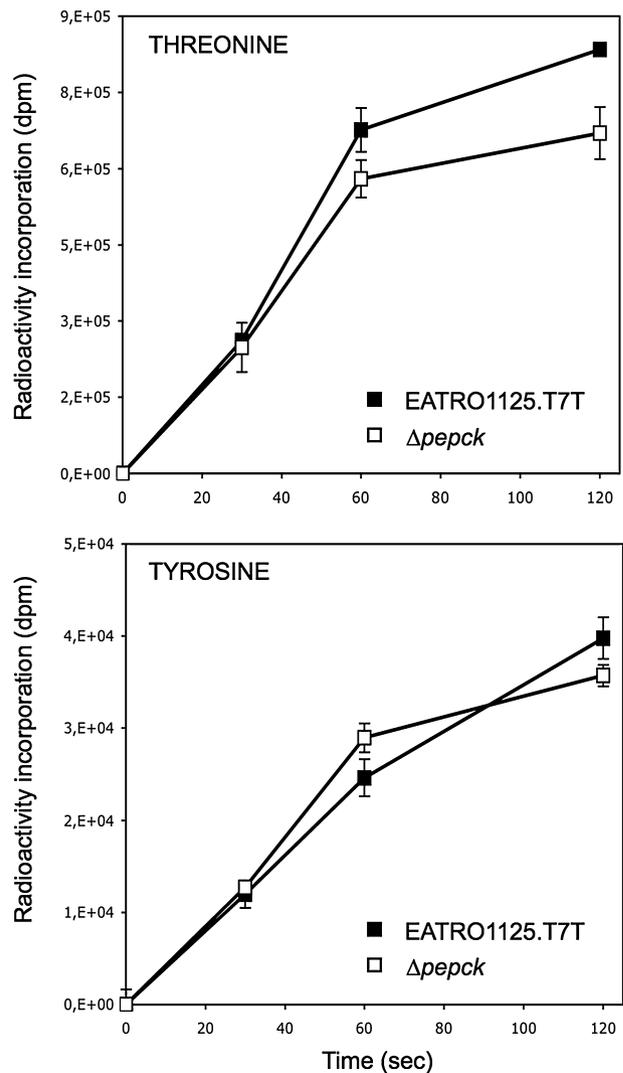


Fig. 9. Threonine uptake. Incorporation of threonine and tyrosine in the EATRO1125.T7T (black squares) and $\Delta pepck$ (white square) cell lines over a two min time period.

response to the cellular acetyl-CoA or acetate demand and/or accumulation. Interestingly, TDH downregulation was observed in the $\Delta pepck$ cell line, which showed a redistribution of the glucose metabolic flux towards acetate excretion, as a consequence of abolition of succinate production from glucose (see Fig. 1) (Ebikeme *et al.*, 2010). As observed for the Δtdh /TDH cell line, the 52% reduction of the TDH activity in the $\Delta pepck$ mutant is correlated with the 46% reduction of threonine-derived acetate production. We propose that redirection of the glycolytic metabolic flux towards acetate production in the $\Delta pepck$ cells induces a signal to downregulate TDH expression, in order to reduce the contribution of threonine to acetyl-CoA and acetate production. Collectively, these data indicate that metabolic flux through the glucose-derived acetate branch downregulates TDH activity, thus reducing the contribution of the threonine degradation pathway in acetyl-CoA and acetate production.

We have previously demonstrated how the availability of glucose causes diminished activity of proline dehydrogenase and proline transport (Lamour *et al.*, 2005). Here it seems that TDH (but not threonine transport) is downregulated when glycolytic flux is redirected towards acetate production. The mechanistic basis of this apparent cross-talk between metabolic pathways has not yet been investigated.

In mammalian cells, TDH is a key enzyme of acetyl-CoA metabolism under tight metabolic control. In the rat liver, for example, regulation of TDH is essential for fatty acid metabolism and the enzyme is a target of feedback inhibition by various compounds derived from its major product, acetyl-CoA (Guerranti *et al.*, 2001), with the ketone body β -hydroxybutyrate being the most efficient. Ketone bodies (β -hydroxybutyrate, acetoacetate and acetone) are water-soluble compounds that are produced as by-products when fatty acids are broken down for energy in the liver. β -hydroxybutyrate and acetoacetate are used as energy sources in the heart and brain while acetone is a waste product excreted from the body. The activity of the *T. brucei* TDH is not affected by up to 10 mM β -hydroxybutyrate, nor acetate, β -hydroxybutyryl-CoA or acetyl-CoA (data not shown), suggesting a mechanism of regulatory control that differs from that in rat liver. Post-transcriptional and post-translational regulation of TDH has recently been described in the mouse embryonic stem cells to modulate somatic cell reprogramming (Han *et al.*, 2013). In *T. brucei* reduced TDH activity is correlated with a reduction of TDH protein amounts in the $\Delta pepck$ cell line, which suggests a post-transcriptional, translational or post-translational regulation of its gene expression. It will be of significant interest to determine the mechanisms underpinning this regulated gene expression. Future metabolomic, proteomic and transcriptomic analyses will be useful in determining mechanisms

that underlie reduced expression of TDH in the $\Delta pepck$ cell line, or reduced proline dehydrogenase and proline uptake in wild-type *T. brucei* procyclics grown in glucose-depleted conditions. It has recently been demonstrated that decarboxylated S-adenosylmethionine (dcAdoMet) contributes directly to regulation of its own cellular abundance in trypanosomes. When levels of this metabolite decrease, a corresponding increase in translation of the RNA encoding the regulatory protein called prozyme occurs and this in turn activates S-adenosylmethionine decarboxylase, the enzyme responsible for production of dcAdoMet (Xiao *et al.*, 2013) thus restoring levels of the diminished metabolite.

Threonine degradation to acetate has also been described previously in bloodstream forms of *T. brucei* (Linstead *et al.*, 1977). To date, the relevance of this pathway to parasite viability and infectivity have not been addressed and equivalent experiments to those described here, on mammalian infective forms of *T. brucei* are presently in progress to explore acetate production in bloodstream form organisms.

Experimental procedures

Growth and maintenance of trypanosomes

The procyclic form of *T. brucei* EATRO1125.T7T (*TetR-HYG T7RNAPOL-NEO*) was cultured at 27°C in SDM79 medium containing 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum and 3.5 mg ml⁻¹ hemin (Brun and Schonberger, 1979) or in a threonine-depleted SDM79, which still contains threonine (~ 15 μ M) but only that coming from heat-inactivated fetal calf serum.

Gene knockout

Replacement of the *PEPCK* gene (Tb927.2.4210, <http://www.genedb.org/genedb/tryp/>) by the blasticidin (BSD) and puromycin (PAC) resistance markers via homologous recombination was described before ($\Delta pepck$ cell line) (Ebikeme *et al.*, 2010). Replacement of the E2 subunit gene of the PDH complex (*PDH-E2*: Tb927.10.7570) by BSD and PAC resistance markers via homologous recombination was performed with DNA fragments containing a resistance marker gene flanked by the PDH-E2 UTR sequences. Briefly, the pGEMt plasmid was used to clone an HpaI DNA fragment containing the BSD and PAC resistance marker gene preceded by the PDH-E2 5'-UTR fragment (565 bp) and followed by the PDH-E2 3'-UTR fragment (464 bp). One allele of the *TDH* gene (Tb927.6.2790) was replaced by the PAC resistance marker via homologous recombination with a DNA fragment containing a resistance marker gene flanked by the TDH 5'-UTR (621 bp) and 3'-UTR (494 bp) sequences. The *PDH-E2* knockout and replacement of one *TDH* allele were generated in the EATRO1125.T7T parental cell line, which constitutively expresses the T7 RNA polymerase gene and the tetracycline repressor under the control of a T7 RNA

polymerase promoter for tetracycline inducible expression (*TetR-HYG T7RNAPOL-NEO*) (Bringaud *et al.*, 2000). Transfection and selection of drug-resistant clones were performed as reported previously (Bringaud *et al.*, 1998). Transfected cells were selected in SDM79 medium containing hygromycin B (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$), neomycin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), blasticidin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and/or puromycin (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$). The selected cell lines *TetR-HYG T7RNAPOL-NEO Δpdh -e2::BSD/ Δpdh -e2::PAC* and *TetR-HYG T7RNAPOL-NEO Δtdh ::PAC/TDH* are called Δpdh and Δtdh /TDH respectively.

Inhibition of gene expression by RNAi

Inhibition of gene expression by RNAi in procyclic forms (Ngo *et al.*, 1998) was performed by expression of stem-loop 'sense/anti-sense' RNA molecules of the targeted sequences (Bringaud *et al.*, 2000) introduced in the pLew100 expression vector (kindly provided by E. Wirtz and G. Cross) (Wirtz *et al.*, 1999), as previously described. To downregulate expression of the *TDH* gene, the pLew-TDH-SAS plasmid was constructed to target a 408 bp fragment of the *TDH* gene (from position 398 bp to 806 bp). Briefly, a PCR-amplified 501 bp fragment, containing the antisense TDH sequence with restriction sites added to the primers was inserted into the HindIII and BamHI restriction sites of the pLew100 plasmid. Then a PCR-amplified fragment containing the sense TDH sequence (429 bp) was inserted upstream of the anti-sense sequence, using HindIII and XhoI restriction sites (XhoI was introduced at the 3'-extremity of the antisense PCR fragment). The resulting plasmid (pLew-TDH-SAS) contains a sense and antisense version of the targeted gene fragment, separated by a 64 bp fragment, under the control of the PARP promoter linked to a prokaryotic tetracycline (Tet) operator. For downregulation of the *PDH-E2* gene expression by RNAi, the 'sense/anti-sense' cassette of the pLew-PDH-E2-SAS plasmid described before (Coustou *et al.*, 2008), was introduced into pHD1336 vector, which contains the blasticidin resistance gene, to generate the pHD-PDH-E2-SAS plasmid. The RNAi TDH and Δpdh / RNAi TDH cell lines were produced by introducing the pLew-TDH-SAS plasmid in the EATRO1125.T7T and Δpdh cell lines respectively. The RNAi TDH/ RNAi PDH double mutant was produced by transfecting the RNAi TDH cell line with the pHD-PDH-E2-SAS plasmid. Transfected cells were selected in SDM79 medium containing, phleomycin (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; RNAi TDH), blasticidin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$; RNAi PDH), phleomycin and blasticidin (RNAi TDH/ RNAi PDH), or puromycin (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$), blasticidin and phleomycin (Δpdh / RNAi TDH), in addition to hygromycin B (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and neomycin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Downregulation by RNAi of the *ASCT* (Tb11.02.0290) gene expression in the ACH (Tb927.3.4260) null background (Δach / RNAi ASCT cell line) is described elsewhere (Millerioux *et al.*, 2012). Induction of double-stranded RNA expression was performed by addition of 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tetracycline.

Enzyme assays

TDH enzyme activity was adapted from Linstead *et al.* (1977) using a spectrophotometric assay. Briefly, cells were washed in PBS and resuspended in hypotonic lysis buffer (5 mM Na_2HPO_4 , 0.3 mM KH_2PO_4) and sonicated (5 sec at 4°C). The

enzyme assay contained 0.5 mM NAD^+ , 200 mM Tris HCl pH 8 and 30 mM threonine. As a control, sonicated crude extracts of trypanosomes were tested for malic enzyme (EC 1.1.1.40) and PDH activities (Klein *et al.*, 1975; Else *et al.*, 1994).

Production of TDH and PDH antibodies

A recombinant fragment containing the full-length *TDH* gene or a fragment of the E1 α subunit gene of the PDH complex (PDH-E1 α : Tb927.3.1790), corresponding to positions 415 to 1138 bp of the PDH-E1 α gene, were inserted into the NdeI and BamHI restriction sites of the pET28a (TDH) and pET16b (PDH-E1 α) expression vectors (Novagen), to express in the BL21 *E. coli* cell the TDH and PDH-E1 α proteins preceded by a N-terminal histidine tag (6 histidine codons). Cells were harvested by centrifugation, and recombinant proteins purified by nickel chelation chromatography (Novagen) from the insoluble fraction according to the manufacturer's instructions. The anti-TDH immune serum was raised in rabbits by five injections at 15 day intervals of 100 μg of TDH-His recombinant nickel-purified proteins, emulsified with complete (first injection) or incomplete Freund's adjuvant (Proteogenix S.A.). For PDH-E1 α antibodies, mice were immunized with 10 μg of recombinant nickel-purified proteins by injection, with complete (first injection) or incomplete Freund's adjuvant, into the peritoneum.

Western blot analyses

Total protein extracts of wild-type or mutant procyclic form of *T. brucei* (5×10^6 cells) were size-fractionated by SDS-PAGE (10%) and immunoblotted on Immobilon-P filters (Millipore) (Harlow and Lane, 1988). Immunodetection was performed as described (Harlow and Lane, 1988; Sambrook *et al.*, 1989) using as primary antibodies, the rabbit anti-TDH (diluted 1:500), the rabbit anti-ASCT (diluted 1:100) (Riviere *et al.*, 2004), the rabbit anti-GPDH (glycerol 3-phosphate dehydrogenase, EC 1.1.1.8; diluted 1:100) (Denise *et al.*, 1999), the mouse anti-hsp60 (diluted 1:10 000) (Bringaud *et al.*, 1995) and the mouse anti-PDH-E2 (diluted 1:500) (Ebikeme *et al.*, 2010) and as secondary antibodies, anti-mouse or anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Bio-Rad, 1:5000 dilution). Revelation was performed using the SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate as described by the manufacturer (Thermo Scientific). Alternatively, for quantitative analyses, revelation was performed using the Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate (Millipore). Images were acquired and analysed with a KODAK Image Station 4000 MM and quantitative analyses were performed with the KODAK MI application.

Immunofluorescence analyses

Log phase cells were fixed with formaldehyde as described before (Bringaud *et al.*, 1998). Slides were incubated with rabbit anti-TDH (diluted 1:100) and Mitotracker®, or mouse anti-PDH-E1 (diluted 1:50) and rabbit anti ASCT (diluted 1:100) (Riviere *et al.*, 2004) followed by ALEXA Fluor® 594-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (diluted 1:100) and/or ALEXA Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit

secondary antibody (diluted 1:100) (Molecular Probes), depending on the analysed cell. Cells were viewed with a Leica DM5500B microscope and images were captured by an ORCA[®]-R² camera (Hamamatsu) and Leica MM AF Imaging System software (MetaMorph[®]) and merged in Adobe Photoshop on a Macintosh iMac computer.

Proteomics analysis by 2D DiGE

Wild-type and $\Delta pepck$ cells were harvested from 4 independent cultures of each line and washed three times in cold phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). Difference gel electrophoresis analysis was performed as previously described (Daneshvar *et al.*, 2012) and 2D gel spots were processed for protein identification as previously described (Bridges *et al.*, 2008).

NMR experiments

The 10^8 *T. brucei* procyclic cells were collected by centrifugation at 1400 *g* for 10 min, washed once/twice with PBS and incubated for 6 h at 27°C in 5 ml of incubation buffer (PBS supplemented with 5 g l⁻¹ NaHCO₃, pH 7.4), with D-[U-¹³C]-glucose (4 mM) in the presence or the absence of threonine (4 mM). The integrity of the cells during the incubation was checked by microscopic observation. Fifty microlitres of maleate (20 mM) were added as internal reference to a 500 μ l aliquot of the collected supernatant and ¹H-NMR spectra were performed at 125.77 MHz on a Bruker DPX500 spectrometer equipped with a 5 mm broadband probe head. Measurements were recorded at 25°C with an ERETIC method. This method provides an electronically synthesized reference signal (Akoka *et al.*, 1999). Acquisition conditions were as follows: 90° flip angle, 5000 Hz spectral width, 32 K memory size, and 9.3 s total recycle time. Measurements were performed with 256 scans for a total time close to 40 min. Before each experiment, phase of ERETIC peak was precisely adjusted. Resonances of obtained spectra were integrated and results were expressed relative to ERETIC peak integration. Protons linked to acetate carbon C2 generates by ¹H-NMR five resonances, a single peak ([¹²C]-acetate) flanked by two doublets ([¹³C]-acetate). When D-[U-¹³C]-glucose is the only carbon source (no threonine), the central resonance (1.88 ppm) corresponding to [¹²C]-acetate, probably derived from an unknown internal carbon source. As a consequence it is not included in the glucose-derived acetate quantitative analyses (Fig. 2A). Similarly, the [¹²C]-succinate resonance (2.35 ppm, annotated S₁₂) observed between both D-[U-¹³C]-glucose-derived [¹³C]-succinate resonances (2.23 ppm and 2.48 ppm, annotated S₁₃) was not considered (Fig. 2A). The linear production of acetate and succinate throughout the experiment was confirmed by ¹H-NMR quantification of the end-products excreted by the wild type trypanosomes incubated for 6 h in PBS containing 4 mM [U-¹³C]-glucose in the presence or absence of 4 mM threonine (Fig. S4). Data were analysed with the StatPlus package (AnalystSoft) of the Microsoft Excel software, using variance analysis followed by Student's *t*-test (unpaired, equal variances) to determine statistical differences in mean values as indicated in the text. Statistical differences are significant for *P*-values < 0.05.

Lipid labelling from D-[¹⁴C]-glucose, L-[¹⁴C]-threonine and [¹⁴C]-acetate

The 10^8 cells in the late exponential phase were incubated for 16 h in 5 ml of modified SDM79 medium containing 4 mM glucose and 4 mM threonine with 25 μ Ci D-[U-¹⁴C]-glucose (300 mCi mmol⁻¹) or 25 μ Ci L-[U-¹⁴C]-threonine (175 mCi mmol⁻¹). Alternatively, the cells were incubated in SDM79 medium containing 4 mM glucose, 4 mM threonine, 1 mM acetate and 10 μ Ci of [¹⁴C]-acetate (55.3 mCi mmol⁻¹). Cells were checked microscopically for viability several times during the incubation. Subsequently, lipids were extracted by chloroform/methanol (2:1, v/v) for 30 min at room temperature, and then washed three times with 0.9% NaCl. The washed lipid extracts were then evaporated and lipids were dissolved in 1 ml of methanol/H₂SO₄ (40:1, v/v). The trans-esterification of the fatty acids of the lipids was done at 80°C for 60 min. After cooling the samples, 400 μ l of hexane (99% pure) and 1.5 ml of H₂O were added, and the mixture was homogenized vigorously during 20 sec. The samples were then centrifuged 5 min at 1000 *g* to separate phases, and the hexane upper phases containing FAMES and sterols were recovered without contact with the lower phases. FAMES and sterols were loaded onto HPTLC plates developed in hexane/ethylether/acetic acid (90:15:2, v/v) and sterols (R_F 0.20) and FAMES (R_F 0.90) were separated. They were identified by co-migration with known standards. Their radiolabelling was then determined with a STORM 860 (GE Healthcare).

Mass spectrometry analysis of [¹⁵N]-threonine incorporation into intracellular metabolites

Procyclic trypanosomes were kept in log phase growth (below 2×10^7 ml⁻¹) in threonine-depleted SDM79 medium containing 5 mM [¹⁵N]-threonine (Cambridge Isotope Laboratories, 98% ¹⁵N-enriched). Intracellular metabolites were extracted by centrifugation as described before (Vincent *et al.*, 2012). Samples were analysed on an Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher) in both positive and negative modes (rapid switching), coupled to a U3000 RSLC HPLC (Dionex) with a ZIC-HILIC column (Sequant) as has previously been described (Vincent *et al.*, 2010). All samples from an individual experiment were analysed in the same analytical batch and the quality of chromatography and signal reproducibility were checked by analysis of quality control samples, internal standards and total ion chromatograms. The few samples that displayed unacceptable analytical variation (retention time drift) were removed from further analysis. A standard mix containing approximately 200 metabolites (including members of the polyamine pathway) was run at the start of every analysis batch to aid metabolite identification. Data processing was performed as described before (Vincent *et al.*, 2012).

Transport assays

Parasites were harvested during the mid-log phase of growth, by centrifugation at 1250 rcf (2500 r.p.m.) for 10 min and washed three times with assay buffer (CBSS) by centrifuga-

tion at 1250 r.p.m. at 4°C. Parasites were resuspended in assay buffer at the density of 2×10^8 cells ml⁻¹ and kept on ice, and brought up to room temperature when the experiment was about to proceed. Uptake of radiolabelled compounds was determined using a derivation of the rapid oil/stop spin protocol, as previously described (Carter and Fairlamb, 1993). Transport was initiated with 100 µl of cells being mixed with 100 µl assay buffer, containing radiolabelled compounds (L-3-³H-threonine was from American Radiolabelled chemicals at 20 Ci mmol⁻¹ and L-3,5-³H-tyrosine from Amersham Radiolabelled Chemicals at 49 Ci mmol⁻¹). To separate trypanosome cells from radiolabelled amino acid solution, oil was used (1-Bromodo-decane, density: 1.066 g cm⁻³). The buffer was layered over a 90 µl cushion of oil. The oil's density, upon centrifugation, separates the trypanosome cells from the radioactive medium containing labelled amino acid. The tube was flash frozen in liquid nitrogen, and the pellet was separated from the remnants of the tube with a tube cutter, and lysed in 200 µl SDS (2%) and mixed with 3 ml scintillation fluid (Ecoscint A, National Diagnostics) and incorporated activity counted after 24 h (to avoid luminescence) using a liquid scintillation counter (Perkin-Elmer, liquid scintillation & luminescence counter, Microbeta). All experiments (at each time point for each substrate) were carried out, at least, in duplicate, and three times independently. Non-transported radiolabelled compounds, associated with cells or in interstitial spaces, were measured by performing control uptake determinations on ice (by commencing the reaction at a zero time point using cells, and buffer kept on ice to ensure, essentially, no uptake).

Acknowledgements

We are extremely grateful to TIGR and the Wellcome Trust Sanger Institute for the chromosome sequences accessible on the *T. brucei* genome database (<http://www.genedb.org/genedb/trypl/>). This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) through grant ACETOTRYP of the ANR-BLANC-2010 call to FB and PM; FB is also supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Bordeaux Segalen, the Conseil Régional d'Aquitaine, the Laboratoire d'Excellence (LabEx) ParaFrap ANR-11-LABX-0024; FB and MPB are also supported by the ParaMet PhD programme of Marie Curie Initial Training Network (FP7). MPB is partly supported by the Wellcome Trust through The Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, which is supported by core funding from the Wellcome Trust (Grant 085349).

References

- Akoka, S., Barantin, L., and Trierweiler, M. (1999) Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Anal Chem* **71**: 2554–2557.
- Alban, A., David, S.O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., and Currie, I. (2003) A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **3**: 36–44.
- Balogun, R.A. (1974) Studies on the amino acids of the tsetse fly, *Glossina morsitans*, maintained on *in vitro* and *in vivo* feeding systems. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **49**: 215–222.
- Balogun, R.A., Hanimann, F., and Chen, P.S. (1969) Separation of free amino acids and derivatives in the tsetse fly *Glossina palpalis* (diptera) by ion-exchange chromatography. *Experientia* **25**: 93–95.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasc, A.C., Cazzulo, J.J., and Krishna, S. (2003) The trypanosomiasis. *Lancet* **362**: 1469–1480.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renault, H., Bartholomeu, D.C., *et al.* (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**: 416–422.
- Bridges, D.J., Pitt, A.R., Hanrahan, O., Brennan, K., Voorheis, H.P., Herzyk, P., *et al.* (2008) Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* **8**: 83–99.
- Bringaud, F., Peyruchaud, S., Baltz, D., Giroud, C., Simpson, L., and Baltz, T. (1995) Molecular characterization of the mitochondrial heat shock protein 60 gene from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **74**: 119–123.
- Bringaud, F., Baltz, D., and Baltz, T. (1998) Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7963–7968.
- Bringaud, F., Robinson, D.R., Barradeau, S., Biteau, N., Baltz, D., and Baltz, T. (2000) Characterization and disruption of a new *Trypanosoma brucei* repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition. *Mol Biochem Parasitol* **111**: 283–297.
- Bringaud, F., Riviere, L., and Coustou, V. (2006) Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* **149**: 1–9.
- Bringaud, F., Ebikeme, C.E., and Boshart, M. (2010) Acetate and succinate production in amoebae, helminths, diplomonads, trichomonads and trypanosomatids: common and diverse metabolic strategies used by parasitic lower eukaryotes. *Parasitology* **137**: 1315–1331.
- Bringaud, F., Barrett, M.P., and Zilberstein, D. (2012) Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Front Biosci* **17**: 349–374.
- Brun, R., and Schonemberger, M. (1979) Cultivation and *in vitro* cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Trop* **36**: 289–292.
- Carrero-Lerida, J., Perez-Moreno, G., Castillo-Acosta, V.M., Ruiz-Perez, L.M., and Gonzalez-Pacanowska, D. (2009) Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol* **39**: 307–314.
- Carter, N.S., and Fairlamb, A.H. (1993) Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature* **361**: 173–176.
- Colasante, C., Ellis, M., Ruppert, T., and Voncken, F. (2006) Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* **6**: 3275–3293.
- Colasante, C., Voncken, F., Manful, T., Ruppert, T., Tielens, A.G., Van Hellemond, J.J., and Clayton, C. (2013) Proteins and lipids of glycosomal membranes from *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei*. *F1000 Research* **2**: 27.

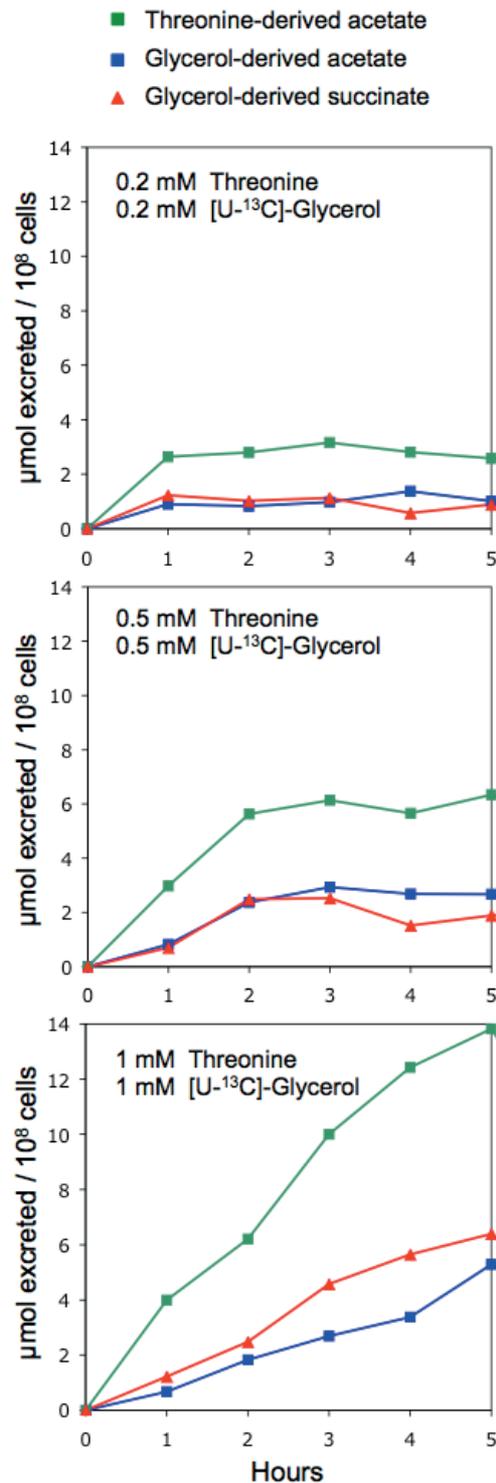
- Coustou, V., Biran, M., Breton, M., Guegan, F., Riviere, L., Plazolles, N., et al. (2008) Glucosed-induced remodelling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **283**: 16342–16354.
- Cross, G.A., Klein, R.A., and Linstead, D.J. (1975) Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. *Parasitology* **71**: 311–326.
- Cynober, L.A. (2002) Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* **18**: 761–766.
- Daneshvar, H., Wyllie, S., Phillips, S., Hagan, P., and Burchmore, R. (2012) Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. *J Proteomics* **75**: 1463–1471.
- Denise, H., Giroud, C., Barrett, M.P., and Baltz, T. (1999) Affinity chromatography using trypanocidal arsenical drugs identifies a specific interaction between glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* and Cymelarsan. *Eur J Biochem* **259**: 339–346.
- Ebikeme, C., Hubert, J., Biran, M., Gouspillou, G., Morand, P., Plazolles, N., et al. (2010) Ablation of succinate production from glucose metabolism in the procyclic trypanosomes induces metabolic switches to the glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate shuttle and to proline metabolism. *J Biol Chem* **285**: 32312–32324.
- Else, A.J., Clarke, J.F., Willis, A., Jackman, S.A., Hough, D.W., and Danson, M.J. (1994) Dihydroliipoamide dehydrogenase in the *Trypanosoma* subgenus, trypanozoon. *Mol Biochem Parasitol* **64**: 233–239.
- Gannavaram, S., Connelly, P.S., Daniels, M.P., Duncan, R., Salotra, P., and Nakhasi, H.L. (2012) Deletion of mitochondrial associated ubiquitin fold modifier protein Ufm1 in *Leishmania donovani* results in loss of beta-oxidation of fatty acids and blocks cell division in the amastigote stage. *Mol Microbiol* **86**: 187–198.
- Ginger, M.L., Chance, M.L., and Goad, L.J. (1999) Elucidation of carbon sources used for the biosynthesis of fatty acids and sterols in the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *Biochem J* **342**: 397–405.
- Ginger, M.L., Prescott, M.C., Reynolds, D.G., Chance, M.L., and Goad, L.J. (2000) Utilization of leucine and acetate as carbon sources for sterol and fatty acid biosynthesis by Old and New World *Leishmania* species, *Endotrypanum monterogeii* and *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem* **267**: 2555–2566.
- Gualdrón-López, M., Brennand, A., Hannaert, V., Quinones, W., Caceres, A.J., Bringaud, F., et al. (2012) When, how and why glycolysis became compartmentalised in the Kinetoplastea. A new look at an ancient organelle. *Int J Parasitol* **42**: 1–20.
- Guerranti, R., Pagani, R., Neri, S., Errico, S.V., Leoncini, R., and Marinello, E. (2001) Inhibition and regulation of rat liver L-threonine dehydrogenase by different fatty acids and their derivatives. *Biochim Biophys Acta* **1568**: 45–52.
- Guler, J.L., Kriegova, E., Smith, T.K., Lukes, J., and Englund, P.T. (2008) Mitochondrial fatty acid synthesis is required for normal mitochondrial morphology and function in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* **67**: 1125–1142.
- Han, C., Gu, H., Wang, J., Lu, W., Mei, Y., and Wu, M. (2013) Regulation of L-threonine dehydrogenase (TDH) in somatic cell reprogramming. *Stem Cells* **31**: 953–965.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Klein, R.A., and Linstead, D.J. (1976) Threonine as a preferred source of 2-carbon units for lipid synthesis in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans* **4**: 48–50.
- Klein, R.A., Linstead, D.J., and Wheeler, M.V. (1975) Carbon dioxide fixation in trypanosomatids. *Parasitology* **71**: 93–107.
- Lamour, N., Riviere, L., Coustou, V., Coombs, G.H., Barrett, M.P., and Bringaud, F. (2005) Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *J Biol Chem* **280**: 11902–11910.
- Linstead, D.J., Klein, R.A., and Cross, G.A. (1977) Threonine catabolism in *Trypanosoma brucei*. *J Gen Microbiol* **101**: 243–251.
- Mazet, M., Harijan, R., Kiema, T., Haapalainen, A., Morand, P., Morales, J., et al. (2011) The characterization and evolutionary relationships of a trypanosomal thiolase. *Int J Parasitol* **41**: 1273–1283.
- Millerioux, Y., Morand, P., Biran, M., Mazet, M., Moreau, P., Wargnies, M., et al. (2012) ATP synthesis-coupled and -uncoupled acetate production from acetyl-CoA by the mitochondrial acetate:succinate CoA-transferase and acetyl-CoA thioesterase in *Trypanosoma*. *J Biol Chem* **287**: 17186–17197.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14687–14692.
- Ohnishi, A., Osaki, T., Matahira, Y., Tsuka, T., Imagawa, T., Okamoto, Y., and Minami, S. (2012) Correlation of plasma amino acid concentrations and chondroprotective effects of glucosamine and fish collagen peptide on the development of osteoarthritis. *J Vet Med Sci* **75**: 497–502.
- Opperdoes, F.R., and Borst, P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* **80**: 360–364.
- Riviere, L., van Weelden, S.W., Glass, P., Vegh, P., Coustou, V., Biran, M., et al. (2004) Acetyl:succinate CoA-transferase in procyclic *Trypanosoma brucei*. Gene identification and role in carbohydrate metabolism. *J Biol Chem* **279**: 45337–45346.
- Riviere, L., Moreau, P., Allmann, S., Hahn, M., Biran, M., Plazolles, N., et al. (2009) Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor of lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 12694–12699.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saunders, E.C., Ng, W.W., Chambers, J.M., Ng, M., Naderer, T., Kromer, J.O., et al. (2011) Isotopomer profiling of *Leishmania mexicana* promastigotes reveals important roles for succinate fermentation and aspartate uptake in tricarboxylic acid cycle (TCA) anaplerosis, glutamate synthesis, and growth. *J Biol Chem* **286**: 27706–27717.
- Tielens, A.G., van Grinsven, K.W., Henze, K., van Hellemond, J.J., and Martin, W. (2010) Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists. *Int J Parasitol* **40**: 387–397.

- Van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R., and Tielens, A.G. (1998) *Trypanosomatidae* produce acetate via a mitochondrial acetate : succinate CoA transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3036–3041.
- Van Weelden, S.W., Fast, B., Vogt, A., Van Der Meer, P., Saas, J., Van Hellemond, J.J., *et al.* (2003) Procyclic *Trypanosoma brucei* do not use Krebs cycle activity for energy generation. *J Biol Chem* **278**: 12854–12863.
- Vigueira, P.A., and Paul, K.S. (2011) Requirement for acetyl-CoA carboxylase in *Trypanosoma brucei* is dependent upon the growth environment. *Mol Microbiol* **80**: 117–132.
- Vincent, I.M., Creek, D., Watson, D.G., Kamleh, M.A., Woods, D.J., Wong, P.E., *et al.* (2010) A molecular mechanism for eflornithine resistance in African trypanosomes. *PLoS Pathog* **6**: e1001204.
- Vincent, I.M., Creek, D.J., Burgess, K., Woods, D.J., Burchmore, R.J., and Barrett, M.P. (2012) Untargeted metabolomics reveals a lack of synergy between nifurtimox and eflornithine against *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1618.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., and Cross, G.A. (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **99**: 89–101.
- Xiao, Y., Nguyen, S., Kim, S.H., Volkov, O.A., Tu, B.P., and Phillips, M.A. (2013) Product feedback regulation implicated in translational control of the *Trypanosoma brucei* S-adenosylmethionine decarboxylase regulatory subunit prozyme. *Mol Microbiol* **88**: 846–861.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

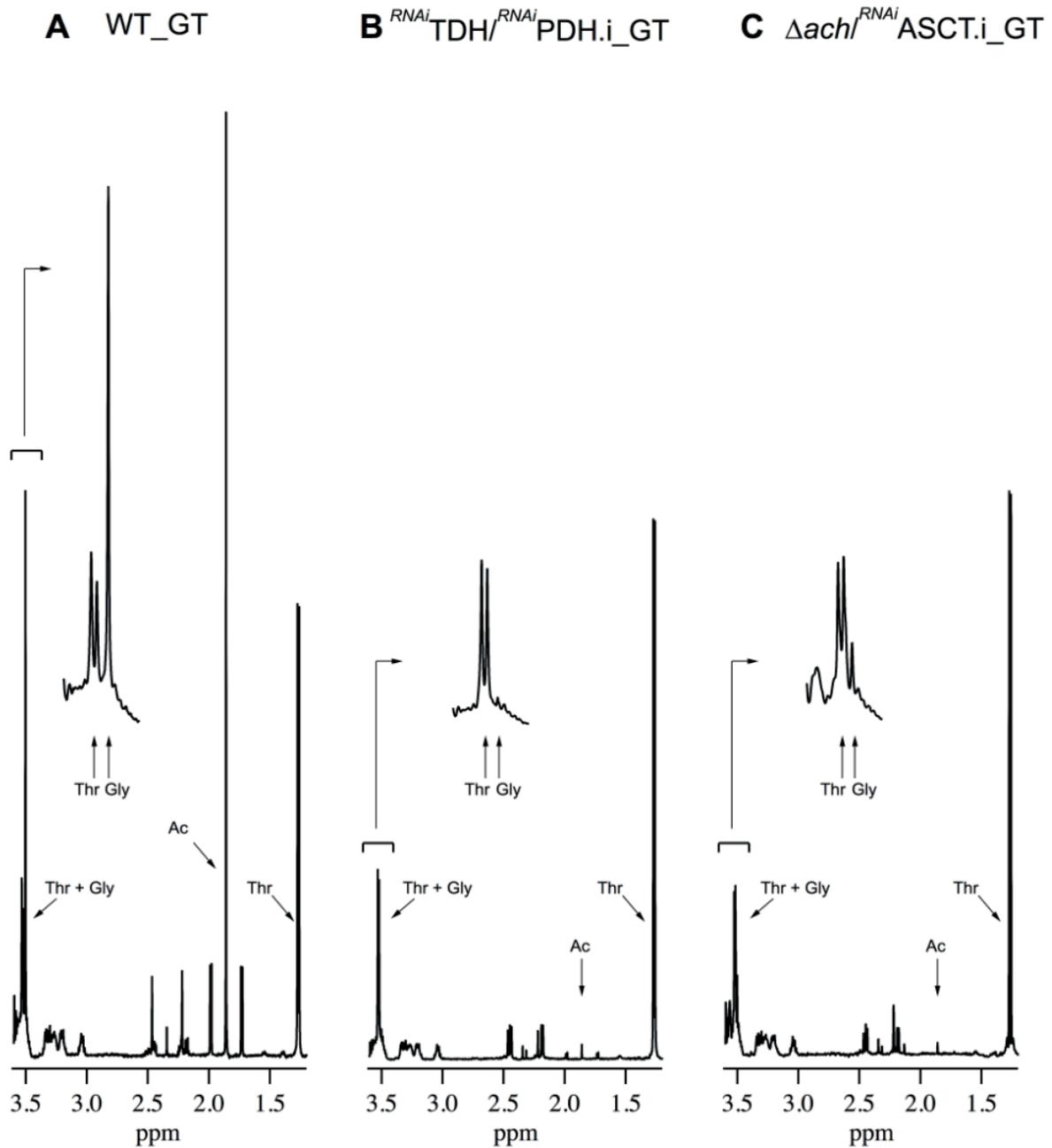
Figure S1



Kinetic of acetate and succinate production from low amounts of threonine and glycerol.

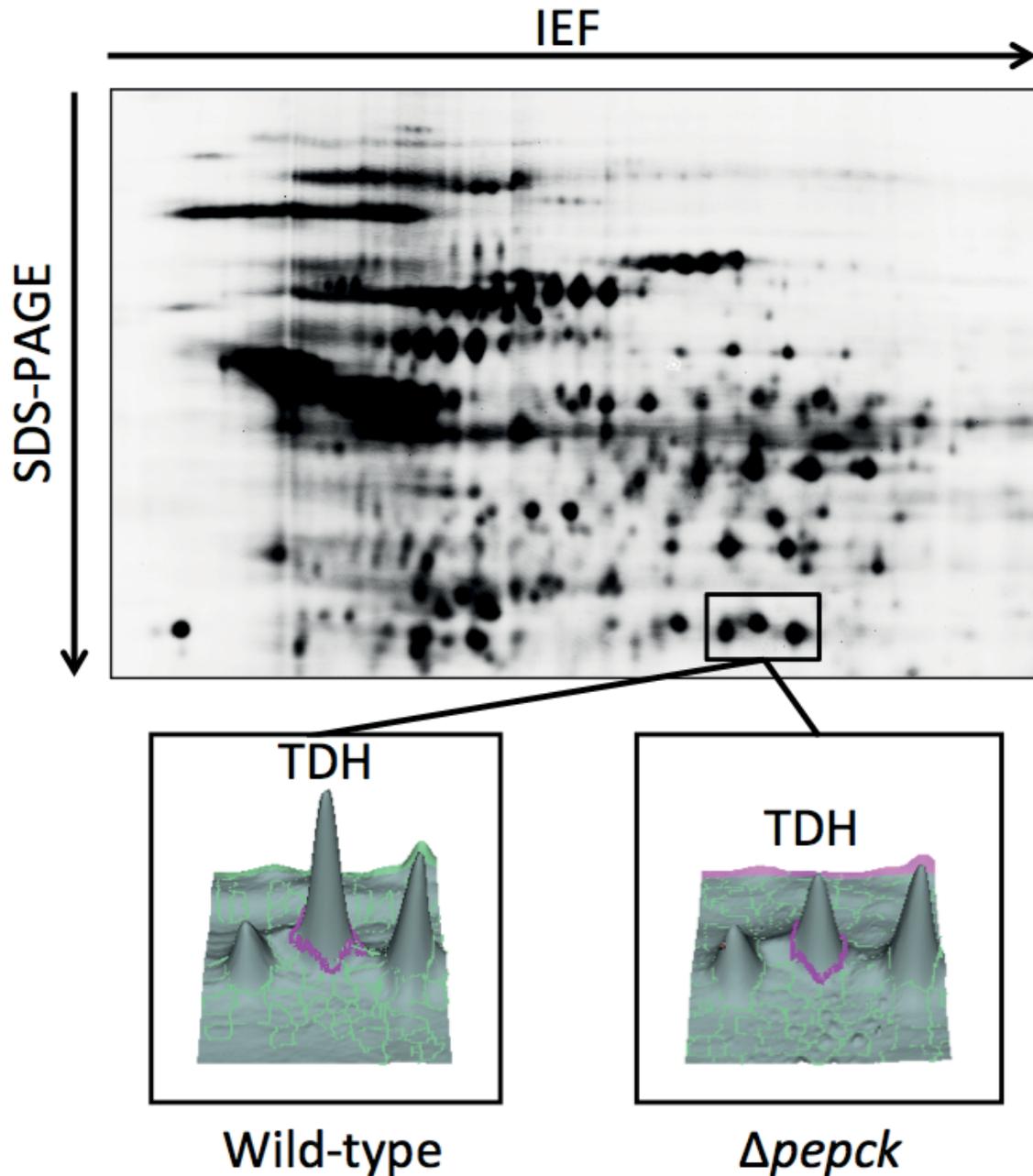
The amounts of acetate and succinate produced by the wild type trypanosomes incubated in PBS containing 0.2, 0.5 or 1 mM of [U-¹³C]-glycerol and threonine were determined by ¹H-NMR every hour during 5 h. The initial rate of acetate production for threonine is in the same range regardless of the amounts of carbon sources.

Figure S2



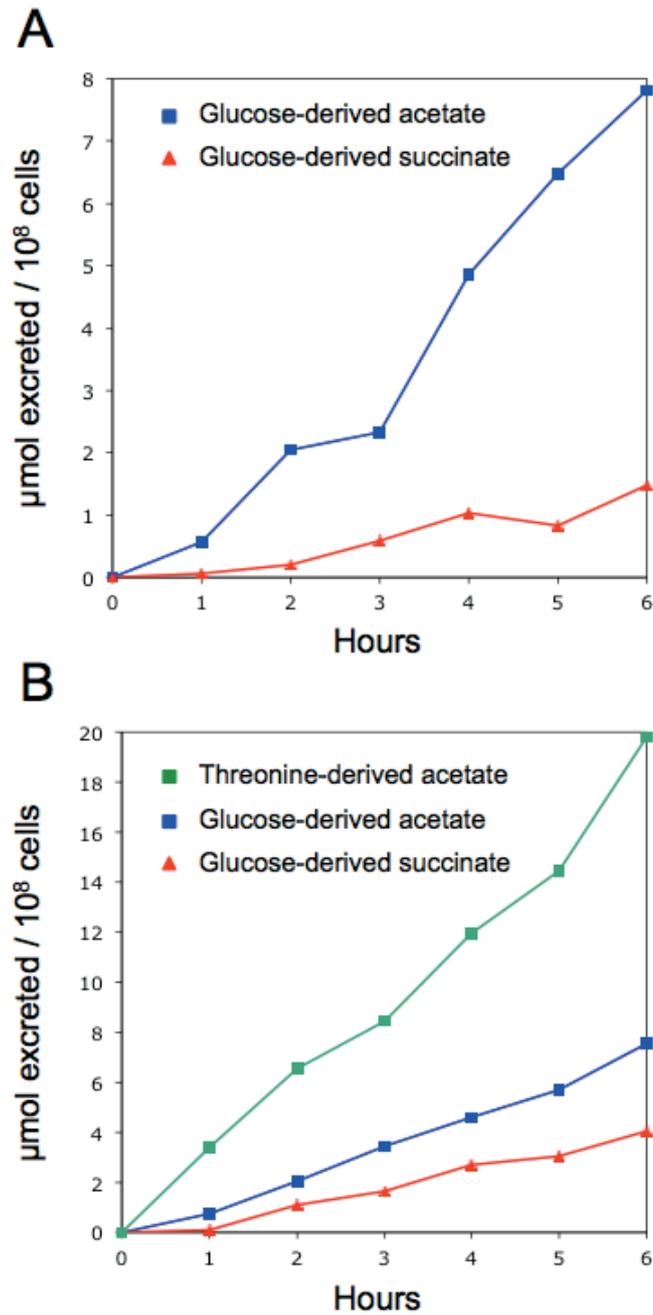
Production of glycine from threonine. Metabolic end-products (in particular acetate and glycine) excreted by the procyclic wild type cell line (A), the ^{RNAi}TDH/^{RNAi}PDH.i (B) and Δ ach/^{RNAi}ASCT.i (C) mutant from D-[U-¹³C]-glucose and threonine was determined by ¹H-NMR. For more details see Fig. 2. A part of each spectrum ranging from 1.2 to 3.6 ppm is shown. A high resolution of the 3.5-3.6 ppm area is shown in the inset to separate the threonine doublet and the glycine singlet.

Figure S3



Difference gel electrophoresis (DIGE) analysis of wild type and $\Delta pepck$ procyclic form *T. brucei*. Four biological replicates of each line were compared by multiplex DIGE analysis, utilizing a pooled internal standard. A protein spot that was found to be down regulated in the $\Delta pepck$ by 1.5 fold ($p=4.0 \times 10^{-6}$; $n=4$) was identified as threonine dehydrogenase (TDH). Fold change indicates average change in standardized abundance. A representative 2D gel spot map is shown, with an inset box showing the location of the spot identified as TDH. The difference in spot intensity between wild type and $\Delta pepck$ is illustrated by 3 dimensional representations of spot volume.

Figure S4



Kinetic of acetate and succinate production. The amounts of acetate and succinate produced by the wild type trypanosomes incubated in PBS containing [U- ^{13}C]-glucose (A) or [U- ^{13}C]-glucose and threonine (B) were determined by $^1\text{H-NMR}$ every hour during 6 h. Production of the excreted end product is linear during the whole experiment.

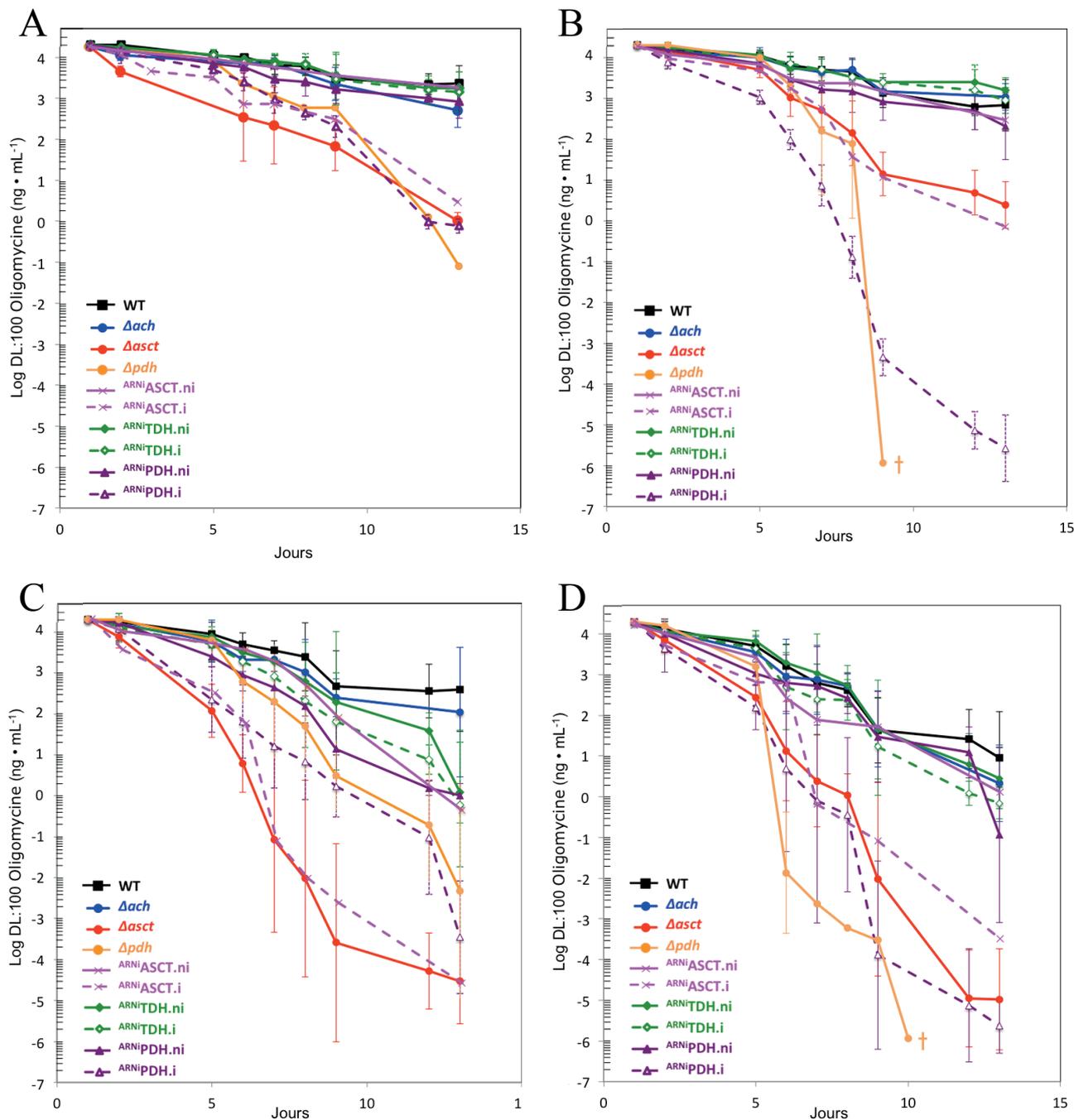


Figure 28 : Sensibilité à l'oligomycine de la EATRO1125.T7T et des mutants Δach , $\Delta asct$, $ARNi$ -TDH et $ARNi$ -PDH en présence ou en absence de glucose ou de thréonine.

5×10^5 cellules de chaque souche sont incubées dans le milieu SDM79 complet (A), le milieu SDM79 sans thréonine (B), le milieu SDM79 sans glucose (C) ou le milieu SDM79 sans glucose ni thréonine (D). Le logarithme de la concentration (en $ng \cdot mL^{-1}$) d'oligomycine requise pour tuer toutes les cellules (DL:100, dose létale 100) est représentée en fonction du temps d'incubation (en jours). Chaque point représente la moyenne du logarithme de la DL:100 \pm l'écart type en fonction du temps ($n \geq 3$).

2.3 Production d'acétate et production d'ATP : vers un *channeling* métabolique

Chez la forme procyclique de *T. brucei*, le glucose et la thréonine contribuent donc à la production d'acétate dans la mitochondrie. Cette biosynthèse d'acétate s'accompagne d'une production d'ATP par le cycle ASCT/SCoAS, essentielle en absence de phosphorylation oxydative. La thréonine est par ailleurs la principale source de carbone utilisée par le parasite pour la production d'acétate et pour la biosynthèse *de novo* des acides gras. Nous avons montré que les voies de dégradation du glucose et de la thréonine partageaient la dernière étape de production d'acétate catalysée par l'ACH et l'ASCT. Nous nous sommes ensuite demandé quelle est la contribution de ces deux sources de carbone dans la production de l'ATP mitochondrial par phosphorylation au niveau du substrat.

Afin d'étudier la contribution de la dégradation du glucose et de la thréonine dans la synthèse d'ATP au sein de la mitochondrie de la forme procyclique de *T. brucei*, nous avons dans un premier temps comparé la sensibilité à l'oligomycine, inhibiteur spécifique de la F₀/F₁-ATP_e, de la souche parentale EATRO1125.T7T (WT), des mutants Δach , $\Delta asct$, Δpdh , ^{ARNi}ASCT, ^{ARNi}PDH et ^{ARNi}TDH dans le milieu SDM79 (Fig. 28A). Les mutants sont ceux décrits dans Millerioux et al. 2012 (Δach et $\Delta asct$) et Millerioux et al. 2013 (Δpdh , ^{ARNi}PDH et ^{ARNi}TDH). Les différentes souches ont été soumises à des concentrations décroissantes d'oligomycine (de 20 µg.ml⁻¹ à 0,012 pg.ml⁻¹). Nous avons ensuite relevé toutes les 48 heures et durant 13 jours la concentration requise pour tuer toutes les cellules de chaque souche, comme précédemment décrit (Millerioux, Morand et al. 2012). La figure 28A présente le logarithme de la dose létale 100 d'oligomycine (en ng.ml⁻¹) en fonction du temps et ce pour chacune des souches étudiées. Nous avons déjà montré que le mutant $\Delta asct$ est ~1000 fois plus sensible à l'inhibiteur que le WT et le Δach (Millerioux, Morand et al. 2012). Les mêmes résultats ont été obtenus avec le mutant ^{ARNi}ASCT induit (^{ARNi}ASCT.i). Nous avons observé que le mutant ^{ARNi}PDH induit (^{ARNi}PDH.i) et le Δpdh sont également ~1000 fois plus sensibles à l'oligomycine que le mutant non induit (^{ARNi}PDH.ni) et le WT. En revanche, le mutant ^{ARNi}TDH non induit (.ni) et induit (.i) est aussi peu sensible à l'oligomycine que le WT, le Δach et les mutants ^{ARNi}PDH.ni et ^{ARNi}ASCT non induit (^{ARNi}ASCT.ni). L'inhibition de l'expression de la TDH après induction par ajout de tétracycline dans le milieu de culture a été vérifiée par Western blot pour chaque expérience réalisée (contrôle non montré).

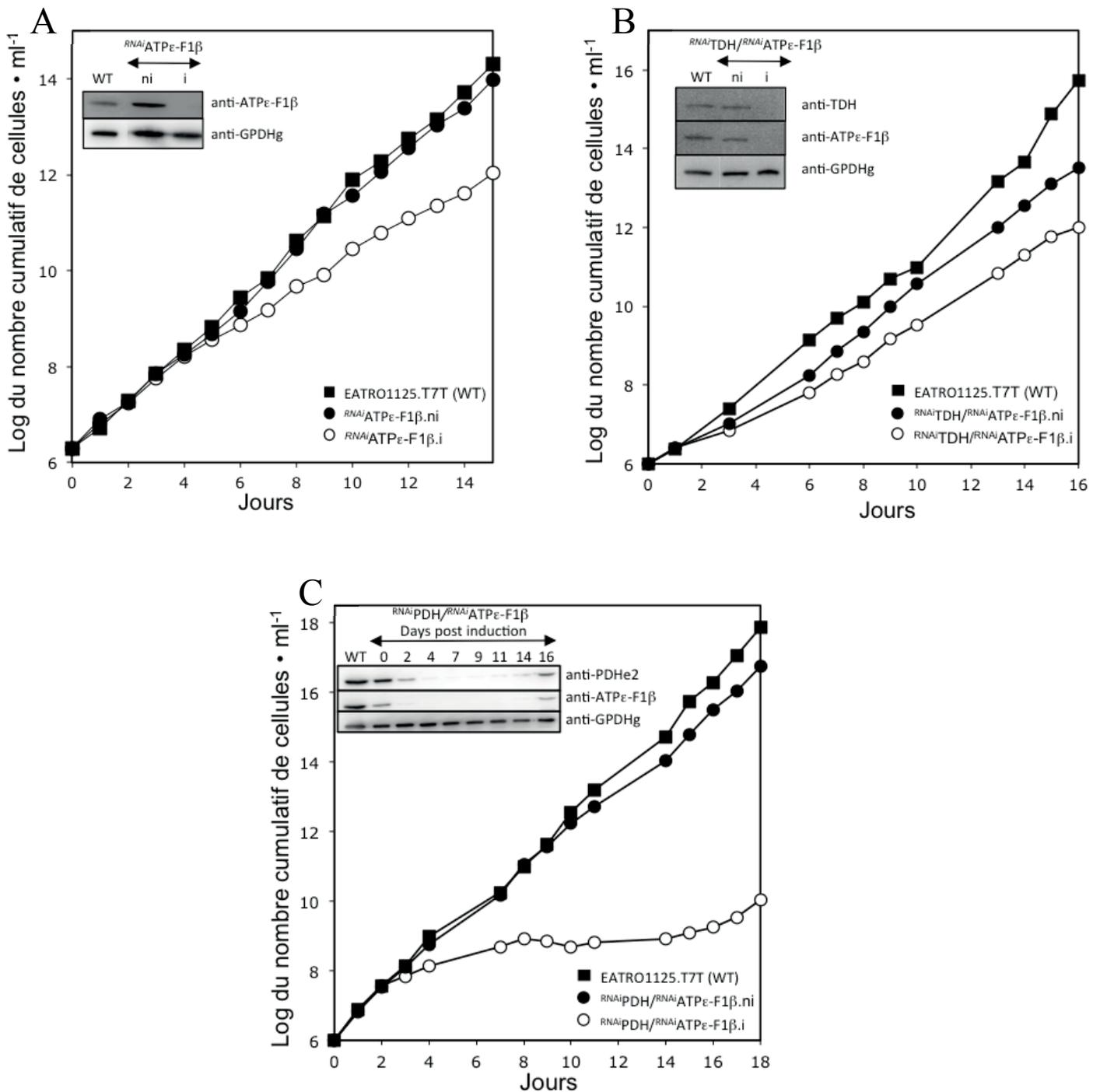


Figure 29 : Courbes de croissance des mutants $ARNiF1\beta$ -ATP synthase, $ARNiTDH/ARNiF1\beta$ -ATP synthase et $ARNiPDH/ARNiF1\beta$ -ATP synthase

Les courbes de croissance des mutants $ARNiF1\beta$ -ATP synthase (A), $ARNiTDH/ARNiF1\beta$ -ATP (B) et $ARNiPDH/ARNiF1\beta$ -ATP synthase (C) non induits (●) et induits (○) par la tétracycline sont comparées à la courbe de croissance de la souche EATRO1125.T7T (■). Les cellules sont maintenues en phase exponentielle (entre 10^6 et 10^7 cellules. ml^{-1}) dans du milieu SDM79 par des dilutions quotidiennes. Les courbes représentent le logarithme du nombre cumulé de cellules en fonction du temps (en jours). Les encarts de chaque courbe montre les analyses par western blot de l'expression de la F1 β -ATP synthase et de la TDH ou la PDH-E2 après induction des mutants avec la tétracycline. L'anticorps anti-GPDHg est utilisé comme contrôle.

Ces résultats indiquent que la PDH, mais pas la TDH, est essentielle à la production d'ATP quand la F_0/F_1 -ATP ϵ est inhibée. Pour confirmer ces résultats, nous avons généré deux doubles mutants dans lesquels l'expression de la sous unité F1 β de la F_0/F_1 -ATP ϵ ainsi que celle de la TDH ou de la sous unité E2 de la PDH est simultanément inhibée par ARNi. Pour cela, le mutant $^{ARNi}TDH/^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1\beta}$ a été produit en introduisant le vecteur pHD1336- $F_{1\beta}$ -ATP ϵ -SAS (SAS pour sens-antisens) dans la lignée cellulaire ^{ARNi}TDH décrite dans Millerioux et al. 2013, qui avait été produite avec le plasmide pLew100-TDH-SAS. Cette combinaison est possible puisque les vecteurs pLew100 et pHD1336 contiennent les gènes de résistance à la phléomycine (BLE) et à la blasticidine (BLA), respectivement. Le double mutant $^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1\beta}/^{ARNi}PDH$ a été généré en introduisant le vecteur pHD1336-PDH-SAS dans le simple mutant $^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1\beta}$, qui avait été produit avec le plasmide pLew100-ATP ϵ - $F_{1\beta}$ -SAS (Coustou, Biran et al. 2008). Comme nous pouvons le voir sur les courbes de croissance de la figure 29 le double mutant $^{ARNi}TDH/^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1\beta}.i$ (Fig. 29B) présente un léger retard de croissance, similaire à celui observé pour le simple mutant $^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1\beta}.i$ (Fig. 29A). Il est à noter que la TDH et l'ATP ϵ - $F_{1\beta}$ ne sont plus détectables par western blot après induction de la lignée $^{ARNi}TDH/^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1\beta}.i$ (encart de la Fig. 29B). En revanche, 3 jours après induction, le double mutant $^{ARNi}ATP\epsilon-F_{1\beta}/^{ARNi}PDH.i$ cesse de se multiplier quand la PDH-E2 et l'ATP ϵ - $F_{1\beta}$ ne sont plus détectables par western blot (Fig. 29C). Cependant, 15 jours après induction, les cellules expriment à nouveau la PDH-E2 et l'ATP ϵ - $F_{1\beta}$ et les cellules se divisent à nouveau. D'après ces résultats, lorsque la forme procyclique est incubée dans un milieu riche contenant le glucose et la thréonine, la voie métabolique contenant la PDH est impliquée dans la production de l'ATP mitochondrial, contrairement à celle contenant la TDH.

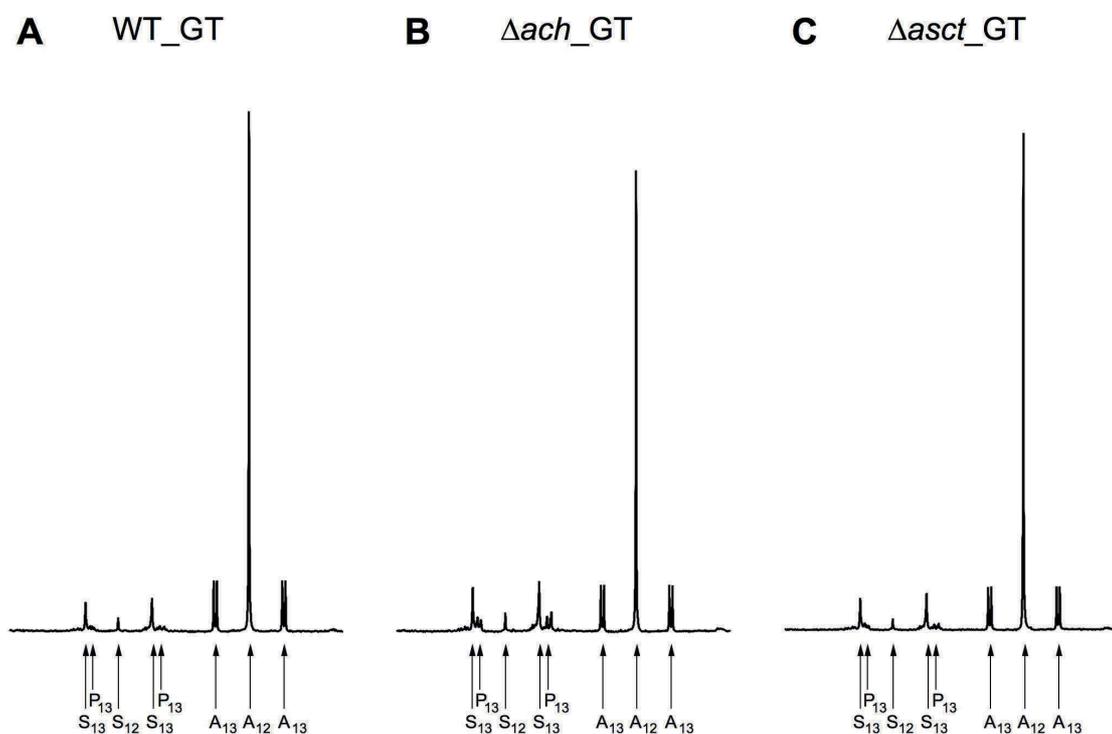
Nous avons également incubé les différentes souches en présence des mêmes concentrations d'oligomycine que précédemment dans un milieu SDM79 sans thréonine contenant 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (Fig. 28B). En dehors des mutants $^{ARNi}PDH.i$ et Δpdh qui présentent une très forte sensibilité à l'oligomycine, les différentes souches sont dans ce milieu sans thréonine aussi sensibles que dans le milieu SDM79 complet. L'apparente sensibilité accrue des mutants $^{ARNi}PDH.i$ et Δpdh résulte de leur létalité en absence de thréonine, que la F_0/F_1 -ATP ϵ soit exprimée ou non, comme cela a été montré plus haut (Fig. 5E dans Millerioux, Morand et al. 2013). La létalité de ces mutants dans ce milieu n'est pas liée à la production d'ATP, mais à l'absence de production d'acétate à partir de glucose et de thréonine.

Cette analyse montre que la sensibilité à l'oligomycine des lignées cellulaires analysées ne semble pas être affectée par l'absence de thréonine, suggérant ainsi que la thréonine ne contribue pas ou peu à la production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat.

Le WT et les simples mutants Δach , $\Delta asct$, Δpdh , ^{ARNi}TDH , ^{ARNi}PDH et $^{ARNi}ASCT$ ont ensuite été soumis aux mêmes concentrations d'oligomycine que précédemment, dans un milieu SDM79 dépourvu de glucose contenant 10% de SVF. Du N-acétyl-D-glucosamine (50 mM) est ajouté au milieu de culture afin d'empêcher le glucose provenant du SVF d'être transporté dans la cellule (Allmann, Morand et al. 2013). En effet, cet analogue non métabolisé du glucose inhibe l'incorporation du glucose en se fixant aux transporteurs d'hexoses (Azema, Claustre et al. 2004, Ebikeme, Peacock et al. 2008). De façon générale, les différentes souches sont plus sensibles à l'oligomycine qu'en présence de glucose (Fig. 28C). Ceci est dû à une augmentation de la contribution de la phosphorylation oxydative lorsque la proline devient la principale source de carbone en l'absence de glucose (Lamour, Rivière et al. 2005, Coustou, Biran et al. 2008). Deux groupes de lignées cellulaires se détachent en fonction de leur sensibilité à l'oligomycine, celles présentant une sensibilité modérée (WT, Δach , $^{ARNi}TDH.ni$, $^{ARNi}TDH.i$, $^{ARNi}PDH.ni$ et $^{ARNi}ASCT.ni$) et celles présentant une grande sensibilité, environ 10^7 fois supérieure à celle de la souche parentale ($\Delta asct$, $^{ARNi}ASCT.i$, Δpdh et $^{ARNi}PDH.i$). Comme observé dans les deux autres conditions, la voie métabolique impliquant la PDH et le cycle de l'ASCT sont essentiels à la production d'ATP lorsque la F_0/F_1 -ATP ϵ est inhibée.

La même expérience a également été conduite dans le milieu SDM79 sans glucose ni thréonine contenant 50 mM N-acétyl-D-glucosamine. Comme observé ci-dessus dans les conditions sans glucose, deux groupes de lignées se détachent très clairement, en plus du Δpdh qui meurt après quelques jours d'incubation les mutants : les mutants $\Delta asct$, $^{ARNi}PDH.i$ très sensibles à l'oligomycine et les autres souches environ 10^6 fois moins sensibles (Fig. 28D). Les résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus dans les conditions sans glucose.

Les données de cette série d'expériences peuvent être interprétés en invoquant la notion de channeling (ou tunneling) métabolique, qui est un mécanisme par lequel un intermédiaire réactionnel est directement transmis d'un site actif à un autre. Le terme de métabolon a été proposé pour désigner l'association de différentes enzymes d'une même voie métabolique (Robinson and Srere 1985). Dans le cas de la forme procyclique de *T. brucei*, l'ATP est produit au sein de la mitochondrie par phosphorylation oxydative et par phosphorylation au niveau du substrat grâce à la SCoAS. La biosynthèse d'acétate contribue à cette production d'ATP par l'intermédiaire du cycle ASCT/SCoAS.



Lignée cellulaire ^a	n ^b	Acétate excrété à partir de la thréonine ^g	Molécules excrétées à partir du [13C-U]-Glucose ^c					Ratio acétate (Thr)/(Glu) ^f
			Acétate	Succinate	Pyruvate	Alanine	TOTAL	
			nmol / h / mg de protéine (% de molécules excrétées)					
WT ^d	9	3872 ± 333	1244 ± 215 (55.1)	650 ± 129 (28.7)	378 ± 116 (12.3)	87 ± 73 (3.9)	2259 ± 167 (100)	3.11
Δach	6	3409 ± 368	1327 ± 147 (36.2)	1254 ± 205 (34.2)	958 ± 94 (26.1)	130 ± 44 (3.5)	3669 ± 341 (100)	2.57
$\Delta asct$	9	3304 ± 365	1070 ± 163 (53.2)	624 ± 180 (31.0)	320 ± 84 (15.9)	ND ^e	2014 ± 242 (100)	3.09

Figure 30 et tableau II: Analyse par RMN du proton des produits finaux excrétés à partir du métabolisme du glucose et de la thréonine

L'excrétion d'acétate, de succinate et de pyruvate à partir du glucose et de la thréonine a été analysée chez la souche EATRO1125.T7T (WT, A) et les mutants Δach (B) et $\Delta asct$ (C) par RMN du proton. Les cellules sont incubées durant 6 h dans du PBS contenant 4 mM de D-[U-13C]-glucose et 4 mM de thréonine. Chaque spectre est représentatif d'une série de 3 expériences distinctes. Une partie des spectres (de 1.65 à 2.55 ppm) est montrée. Les flèches désignent les résonances des différents produits : A13, acétate enrichie en C13; P12, pyruvate; P13, pyruvate enrichie en C13; S12, succinate; S13, succinate enrichie en C13.

Le tableau II montre les quantités de produits finaux excrétés à partir de la dégradation du D-[U-13C]-glucose et d'acétate à partir de la thréonine.

^a Cellules incubées dans du PBS contenant 4 mM de [U-13C]-glucose et 4 mM de thréonine

^b Nombre d'expériences

^c Moyenne ± écart-type de 6 à 9 expériences (nmol/h/mg de protéine) et pourcentage de chaque molécule excrétée (valeur entre parenthèses)

^d Lignée cellulaire EATRO1125.T7T

^e Non détectable

^f Ratio entre l'acétate excrété à partir de la dégradation du glucose et de la thréonine

^g Moyenne ± écart-type de 6 à 9 expériences (nmol/h/mg de protéine)

En revanche, la réaction catalysée par l'ACH, autre enzyme responsable de la production d'acétate dans la mitochondrie de ces parasites, ne produit pas d'ATP. Nous avons montré que l'absence de glucose ou l'inhibition de la voie de dégradation de cette source carbonée au niveau de la PDH est néfaste lorsque la F_0/F_1 -ATP ϵ est inhibée. En revanche, l'absence de thréonine ou l'inhibition de la dégradation de cet acide aminé dans le mutant ARNi TDH ne semble pas affecter la production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat dans la mitochondrie du parasite. Ces résultats suggèrent que la voie de dégradation du glucose est impliquée dans la production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat *via* le cycle ASCT/SCoAS, alors que la dégradation de la thréonine ne participe pas à cette production d'ATP. En d'autres termes, ces résultats sont en faveur d'une association, d'une part entre la PDH et l'ASCT, et d'autre part entre la TDH, l'AKCA et l'ACH. Cette observation est en faveur de l'existence d'un phénomène de micro-compartmentalisation ou de channeling des voies de dégradation du glucose, d'une part, et de la dégradation de la thréonine, d'autre part, au sein de la mitochondrie.

Les données présentées ci-dessus montrent que la dégradation de la thréonine n'est pas impliquée dans la production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat. Cependant, une analyse de la production d'acétate à partir du glucose et de la thréonine par les mutants Δach et $\Delta asct$ suggèrent que l'ASCT peut être utilisée pour la dégradation de la thréonine et l'ACH pour celle du glucose. En effet, nos analyses par RMN du proton en présence de [U- ^{13}C]-glucose et de thréonine nous montrent que l'acétate est toujours produit à partir de la thréonine dans le mutant Δach (3409 ± 368 nmol/h/mg de protéine *versus* 3872 ± 333 nmol/h/mg de protéine pour le WT; Fig. 30 et Tableau II). De la même façon, l'acétate est toujours produit à partir du glucose dans le mutant $\Delta asct$ (1070 nmol/h/mg de protéine *versus* 1244 nmol/h/mg de protéine pour le WT; Fig. 30 et Tableau II). S'il existe un channeling, les associations PDH-ASCT et TDH-AKAT-ACH pourraient être rompues ou les métabolites pourraient être redirigés en fonction du contexte cellulaire et éventuellement environnemental. Dans le cas du mutant Δach , il est envisageable que l'acétyl-CoA produit à partir de la thréonine quitte "son métabolon" en absence d'ACH pour être pris en charge par l'ASCT. Le même modèle peut être appliqué au mutant $\Delta asct$ pour expliquer la production d'acétate à partir de glucose. Ces analyses par RMN ne remettent pas en cause l'interprétation des résultats présentés ci-dessus (effet de l'oligomycine et doubles mutants) ni l'existence d'une éventuelle dissociation des voies PDH-ASCT et TDH-AKAT-ACH.

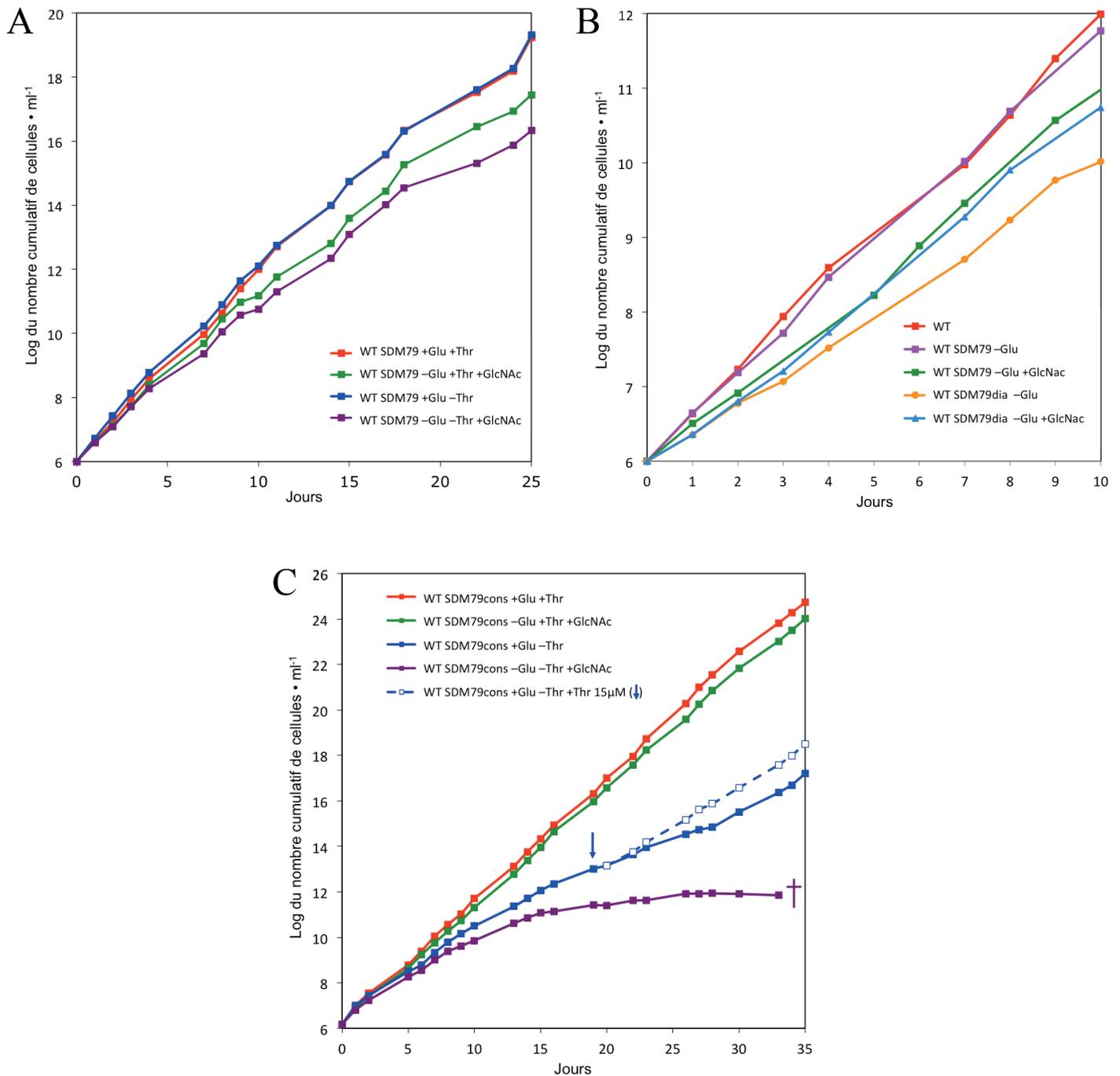


Figure 31 : Courbes de croissances de la lignée cellulaire EATRO1125.T7T en présence ou en absence de glucose et de thréonine

Les cellules EATRO1125.T7T (WT) sont maintenues en phase exponentielle (entre 10^6 et 10^7 cellules.ml⁻¹) dans du milieu de culture par des dilutions quotidiennes. Les courbes représentent le logarithme du nombre cumulé de cellules en fonction du temps (en jours). La courbe A a été réalisée dans du milieu SDM79 avec ou sans glucose (Glu) et thréonine (Thr). Pour les conditions sans glucose, du N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc ; 50 mM) a été ajouté au milieu de culture contenant 0.5 mM glucose (contribution du SVF). La figure B représente les courbes de croissance des cellules dans du milieu SDM79 sans glucose contenant 10% de SVF (SDM79) ou 1% de SVF+9% de SVF dialysé (SDM79dia). 50 mM de GlcNAc sont ajoutés au milieu quand indiqué dans la légende. La figure C représente les courbes de croissance des cellules dans du milieu SDM79 « consommé » (SDM79cons), avec ou sans glucose et thréonine. Pour les conditions sans glucose, nous avons ajouté 50 mM de GlcNAc. A partir du 19^{ème} jour (flèche bleue), la population de cellules cultivées avec glucose mais sans thréonine a été divisée en 2 et nous avons ajouté 15 μ M de thréonine à chaque dilution d'une de ces sous-populations.

La thréonine peut-elle être utilisée pour la production d'ATP via l'ASCT dans certaines conditions ?

D'après nos résultats, dans les conditions classiques de culture, la thréonine ne semble pas contribuer à la production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat. Nous nous sommes demandé si dans certaines conditions, la thréonine pouvait malgré tout contribuer à cette synthèse d'ATP. Nous avons ainsi envisagé la production d'un mutant $\Delta ach/^{ARNi}PDH$ dans lequel la cellule devra utiliser la thréonine pour produire de l'ATP, *via* l'ASCT, lors de la conversion de l'acétyl-CoA en l'acétate. En effet, l'inhibition de l'expression de la PDH-E2 empêchera l'utilisation du glucose pour la production d'acétyl-CoA, lequel sera uniquement converti en acétate par l'ASCT, en l'absence d'ACH. Si ce mutant est viable, ce qui en théorie devrait être le cas, nous pourrions bloquer la production d'ATP par phosphorylation oxydative en inhibant la F_0/F_1 -ATP ϵ avec l'oligomycine, pour éventuellement observer la contribution de la dégradation de la thréonine dans la production d'ATP *via* l'ASCT. Si tel est le cas, ce mutant devrait être modérément sensible à l'oligomycine, comme le sont les mutants ^{ARNi}TDH et Δach . J'ai récemment transfecté le mutant Δach avec le vecteur pLew100-PDH-E2-SAS et obtenu plusieurs clones. Cependant, aucun de ces clones ne présentait de diminution significative de l'expression de la PDH-E2 après induction par la tétracycline. De nouvelles lignées cellulaires $\Delta ach/^{ARNi}PDH$ devront être produites.

Existe-il d'autres sources d'acétyl-CoA qui pourraient être utilisées pour produire l'acétate ?

Pour répondre à cette question, il est nécessaire de cultiver la forme procyclique WT dans un milieu dépourvu de glucose et/ou de thréonine. Etant donné que nous ajoutons du SVF dans les milieux de culture et que le sang des mammifères contient environ 5 mM de glucose et 0,15 mM de thréonine (Creek, Nijagal et al. 2013, Ohnishi, Osaki et al. 2013), nous avons réalisé des courbes de croissances du WT dans différents milieux SDM79 avec ou sans glucose et thréonine en utilisant différentes stratégies. Nous avons comparé 3 approches différentes pour limiter au maximum l'implication du glucose dans le métabolisme du parasite, (i) le milieu SDM79 sans glucose supplémenté avec 10% (v/v) de SVF et 50 mM de GlcNAc, qui est un inhibiteur compétitif du transporteur de glucose non métabolisé par le parasite (milieu SDM79-glu), (ii) le même milieu contenant, à la place du SVF (10%), 1% de SVF et 9% de SVF dialysé (milieu SDM79dia-glu) et (iii) le milieu SDM79-glu dont le glucose a été consommé par le parasite (SDM79cons-glu). La figure 31A montre un léger retard de croissance du WT cultivé dans le milieu SDM79-glu. Dans le même milieu, lorsqu'on enlève la thréonine, le retard de croissance est plus important mais les cellules se multiplient toujours.

Le fait d'enlever uniquement la thréonine du milieu SDM79 classique n'a aucun effet sur la croissance des cellules (Fig. 31A). Nous avons ensuite effectué des courbes de croissance du WT dans un milieu SDM79dia sans glucose contenant 1% de SVF et 9% de SVF dialysé, avec ou sans GlcNAc. L'utilisation de SVF dialysé permet de diminuer d'environ trois fois la quantité de glucose apportée au milieu par le sérum. Les cellules WT sont viables dans ce milieu et l'utilisation de SVF dialysé n'entraîne pas d'effet supplémentaire significatif sur la croissance des cellules (Fig. 31B). D'après ces résultats, lorsque le glucose, la thréonine ou les deux ne sont pas présents dans le milieu de culture, les cellules peuvent toujours se multiplier. Pourtant, lorsqu'on inhibe les voies de dégradation des deux sources de carbone dans le mutant ^{ARNi}PDH/^{ARNi}TDH, les cellules ne sont pas viables. Il faut cependant noter que quelques soient les milieux présentés ci-dessus, le SVF ajouté au milieu apporte du glucose et de la thréonine. Même en faibles quantités, ces apports pourraient être suffisants pour les fonctions vitales des cellules, dont la production d'ATP. Afin de s'affranchir des apports en sources de carbone du SVF, nous avons généré un milieu SDM79 dont les sources de carbones ont été consommées par le parasite (milieu SDM79cons). Des cellules parentales EATRO1125.T7T sont cultivées pendant 72 h dans du milieu SDM79 sans glucose ni thréonine contenant 20% (v/v) de SVF. Durant ce laps de temps, les cellules consomment tout le glucose et la thréonine apportés par le SVF. Le milieu est ensuite centrifugé, filtré et complété par le même volume de SDM79 sans SVF, glucose ni thréonine. La quantité de glucose contenu dans ce milieu a été analysée par RMN-2D et spectrométrie de masse par l'équipe de Jean-Charles Portais (INSA-CNRS UMR 5504, INRA UMR 792, Toulouse) et ces analyses ont montré qu'il n'y a plus de glucose dans ce milieu consommé (données non montrées, seuil de détection: 5 µM). J'ai donc effectué des courbes de croissance du WT dans le milieu SDM79cons contenant ou pas du glucose, de la thréonine et/ou du GlcNAc (Fig. 31C). Dans le milieu SDM79cons supplémenté en glucose et thréonine avec les mêmes concentrations que dans le milieu SDM79 standard (10,3 mM et 3,4 mM respectivement) on observe un temps de doublement identique à celui observé dans le milieu SDM79. Lorsque ce milieu est uniquement supplémenté avec la thréonine et 50 mM de GlcNAc, on n'observe aucun phénotype de croissance. En revanche, quand on ajoute uniquement du glucose dans ce milieu, on observe une réduction importante de la croissance. La croissance des cellules peut cependant être restaurée par l'ajout de 15 µM de thréonine (quantité théoriquement apportée par le SVF). Ces résultats suggèrent que la thréonine est essentielle à la croissance de la forme procyclique de *T. brucei*, probablement pour la biosynthèse des protéines car le génome de *T. brucei* ne contient pas les gènes impliqués dans la synthèse *de novo* de cet acide aminé.

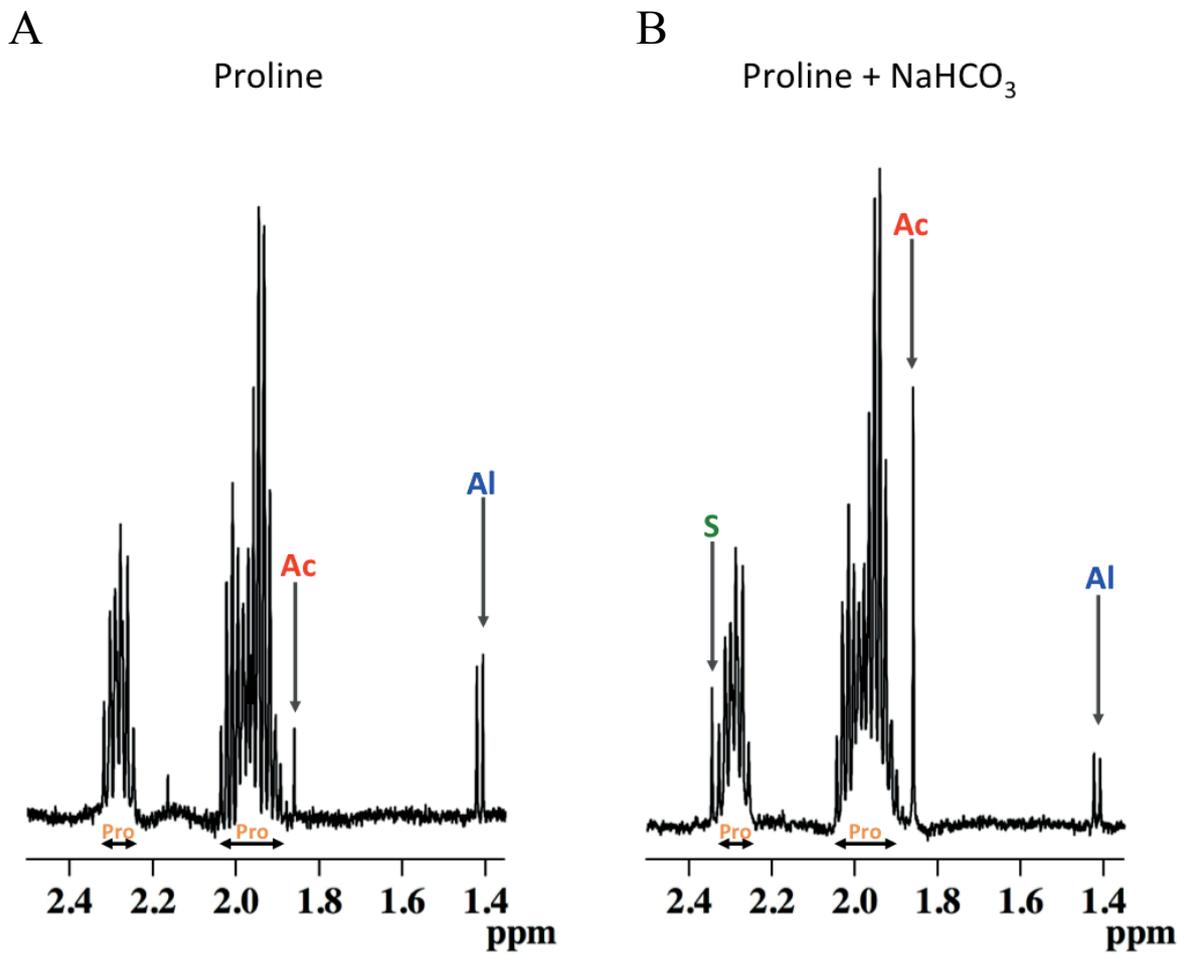


Figure 32 : Analyse par RMN du proton des produits finaux excrétés à partir du métabolisme de la L-proline

L'excrétion d'acétate (Ac), de succinate (S) et d'alanine (Al) à partir de L-Proline (Pro) a été analysée chez la souche EATRO1125.T7T. Les cellules sont incubées durant 6 h dans du PBS contenant 4 mM de L-Proline sans (A) ou avec 5 g/l de NaHCO₃ (B). Une partie des spectres (de 1,35 à 2,5 ppm) est montrée. Les flèches désignent les résonances des différents produits.

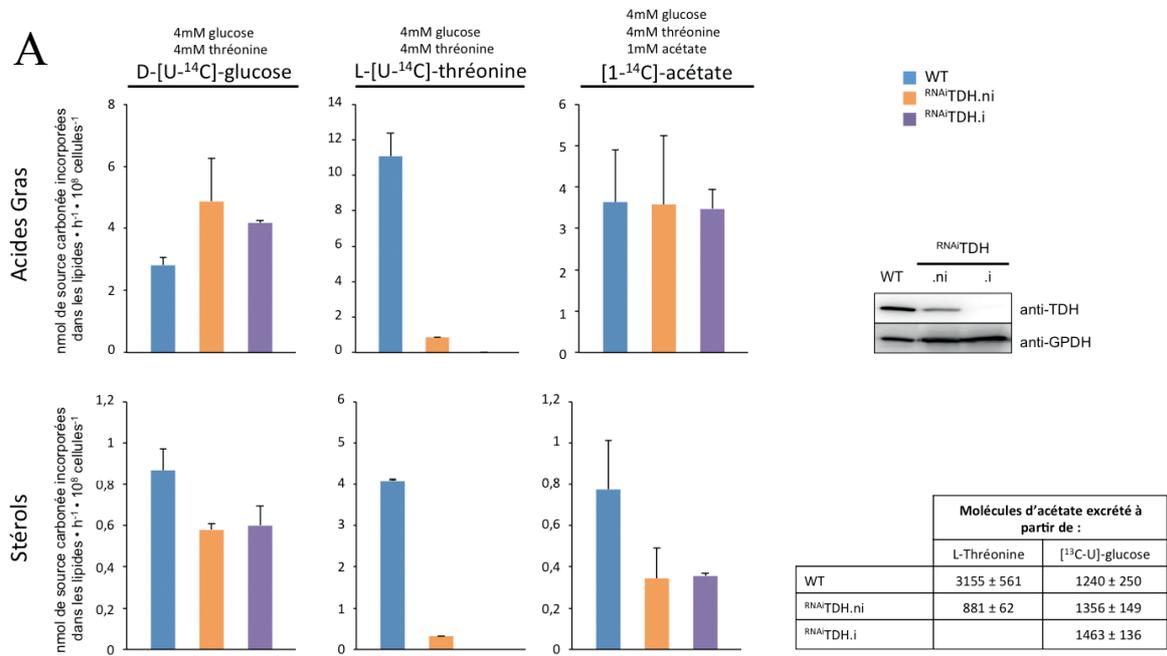
Cette hypothèse est en accord avec la même vitesse de croissance observée pour le mutant ^{ARNi}TDH.i et le WT cultivé dans un milieu SDM79-glu (donnée non montrée). Enfin, dans le milieu SDM79cons sans glucose ni thréonine avec 50 µM de GlcNAc, les cellules ne se multiplient plus au bout d'environ 15 jours et finissent par mourir. Bien que nous n'ayons pas essayé de restaurer la croissance du parasite en ajoutant 15 µM de thréonine, cela suggère que la carence en thréonine est plus problématique pour le parasite cultivé en l'absence de glucose. Ces données suggèrent qu'en absence de glucose et en présence d'une très faible quantité de thréonine (15 µM), la forme procyclique utilise une ou plusieurs autre(s) source(s) de carbone pour la production d'acétate. Il a été montré qu'en présence de glucose, le métabolisme de la L-proline était réprimé (Lamour, Rivière et al. 2005). Si théoriquement la proline peut être utilisée pour produire de l'acétate, une autre étude a montré par des analyses par RMN du carbone avec de la [1-¹³C]-L-Proline que la dégradation de cet acide aminé, en absence de hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃), aboutit majoritairement à la synthèse de succinate et de L-glutamate en présence de glucose et à la synthèse d'alanine en absence de glucose. Dans les deux cas, la synthèse d'acétate est minime, de l'ordre de 5% des produits excrétés (Coustou, Biran et al. 2008). Dans cette série d'analyse, le NaHCO₃ n'avait pas été ajouté dans le milieu car il occasionne une carbamylation des acides aminés produits à partir de la proline (alanine et glutamate) entraînant un dédoublement des signaux lors de l'analyse par RMN du C13. Or 40 mM de NaHCO₃ sont systématiquement ajoutés, pour favoriser la production de succinate à partir du glucose qui nécessite une étape de carboxylation (PEPCK) et se rapprocher des conditions rencontrées dans le milieu SDM79 qui contient 20 mM de NaHCO₃. Nous avons donc analysé les produits excrétés à partir du métabolisme de la proline par RMN du proton en présence et en absence de NaHCO₃. Dans la première expérimentation, nous avons incubé 10⁸ cellules EATRO1125.T7T pendant 6 h dans 5 ml de PBS contenant 4 mM de proline. L'analyse par RMN a révélé que le produit excrété le plus abondant est l'alanine (261 nmol.h⁻¹.mg⁻¹ de protéine), puis l'acétate (46 nmol.h⁻¹.mg⁻¹ de protéine) sans qu'il y ait de production détectable de succinate (Fig. 32A). Nous avons ensuite effectué la même analyse en ajoutant 50 mM de NaHCO₃ en plus des 4 mM de proline dans le PBS d'incubation. Dans ces conditions, le principal produit excrété est l'acétate (305 nmol.h⁻¹.mg⁻¹ de protéine) puis l'alanine (92 nmol.h⁻¹.mg⁻¹ de protéine) et le succinate (72 nmol.h⁻¹.mg⁻¹ de protéine) (Fig. 32B). Il semble donc qu'en absence de glucose et de thréonine, la proline puisse contribuer grandement à la production d'acétate. Bien que ces résultats soient préliminaires et devront être confirmés et approfondis, il semble que l'ajout de NaHCO₃ modifie considérablement le métabolisme de la proline en conduisant à une augmentation importante de la production d'acétate.

En l'absence de glucose (et probablement de thréonine) l'ATP est principalement produit par phosphorylation oxydative grâce aux nombreux équivalents réduits (NADH, FADH₂) produits par la voie de dégradation de la proline (Lamour et al 2005, Coustou et al. 2008). Il est donc peu probable que l'augmentation de la production d'acétate soit nécessaire à la production de l'ATP, bien que le cycle de l'ASCT/SCoAS y contribue.

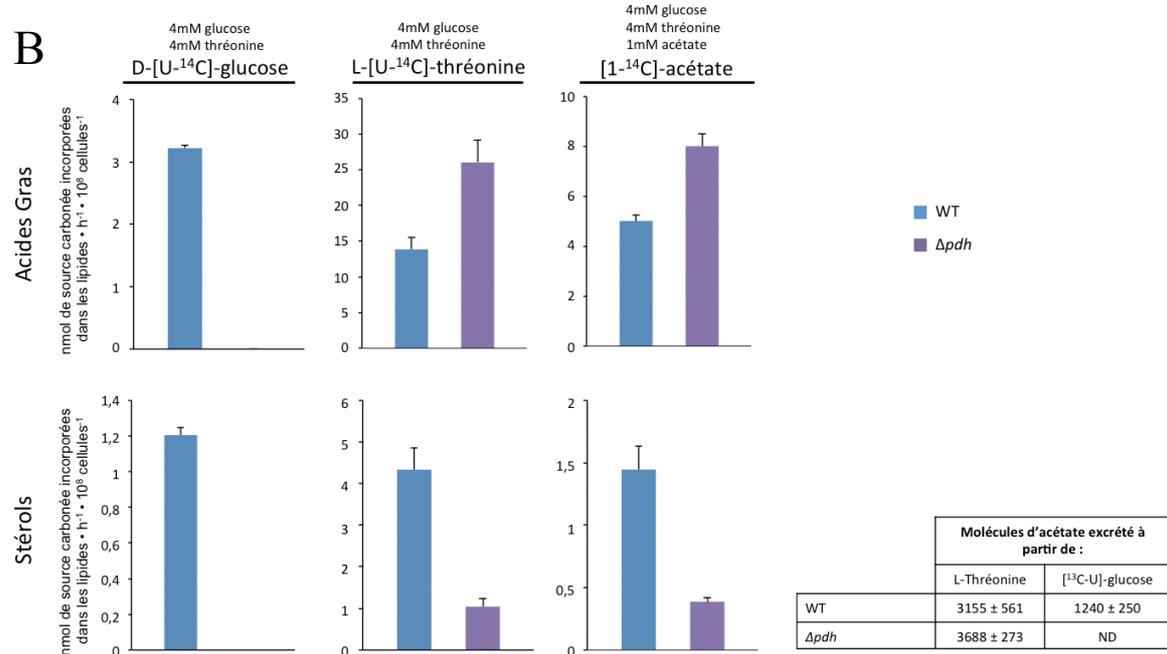
2.4 Analyse de la biosynthèse *de novo* des acides gras et des stérols à partir du glucose et de la thréonine

Nous avons vu dans les chapitres précédents que la dégradation du glucose et la thréonine contribuent à la biosynthèse *de novo* des acides gras et des stérols, la thréonine étant la source de carbone préférée par la forme procyclique de *T. brucei* pour ces biosynthèses. L'acétyl-CoA, produit de la dégradation du glucose et de la thréonine, est converti par l'ASCT et l'ACH en acétate qui rejoint le cytosol pour produire l'élongateur de la biosynthèse des acides gras, grâce à l'AceCS (Millerioux, Ebikeme et al. 2013). L'étude des mutants ^{ARNi}AceCS.i et Δach /^{ARNi}ASCT.i a en effet permis de montrer que l'AceCS (Millerioux, Ebikeme et al. 2013) et le couple ACH/ASCT (données non montrées, obtenues avec l'équipe de Patrick Moreau) sont essentiels à la biosynthèse des acides gras à partir de l'acétate. Cependant, la production des stérols à partir de l'acétate n'est pas affectée dans ces deux mutants. Des données préliminaires, qui seront complétées, ont également montré que l'incorporation du [¹³C]-glucose dans les stérols n'est pas affectée chez le mutant Δach /^{ARNi}ASCT.i, alors que l'incorporation dans les acides gras diminue considérablement. Ces résultats sont en accord avec nos connaissances du métabolisme du trypanosome, puisque les premières étapes de la biosynthèse des stérols à partir de l'acétyl-CoA se situent dans la mitochondrie du parasite (Carrero-Lerida, Perez-Moreno et al. 2009). Pour poursuivre l'étude de la biosynthèse des lipides, nous avons analysé la production des acides gras et des stérols dans les mutants qui ne produisent plus l'acétyl-CoA à partir du glucose et de la thréonine (Δpdh , ^{ARNi}TDH et ^{ARNi}PDH/^{ARNi}TDH) en collaboration avec l'équipe de Patrick Moreau (CNRS, Bordeaux). Pour toutes les analyses, les cellules ont été incubées pendant 16 h dans du milieu SDM79 contenant 4 mM de glucose, 4 mM de thréonine contenant 5 μ Ci de D-[U-¹⁴C]-glucose ou 2,5 μ Ci de L-[U-¹⁴C]-thréonine. Lorsque les cellules sont incubées en présence de 10 μ Ci de [1-¹⁴C]-acétate, 1 mM d'acétate est ajouté au milieu. Les mutants ARNi sont induits pendant 7 jours avant l'incubation avec la source radioactive. Les lipides sont extraits au chloroforme/méthanol. Les acides gras sont ensuite trans-estérifiés par ajout d'un mélange méthanol/H₂SO₄ pour donner des esters méthylique d'acides gras. La réaction est effectuée à 80°C pendant 60 min. De l'hexane et de l'eau sont ensuite ajoutés aux échantillons, le mélange est homogénéisé puis centrifugé pour séparer les phases.

A



B



C

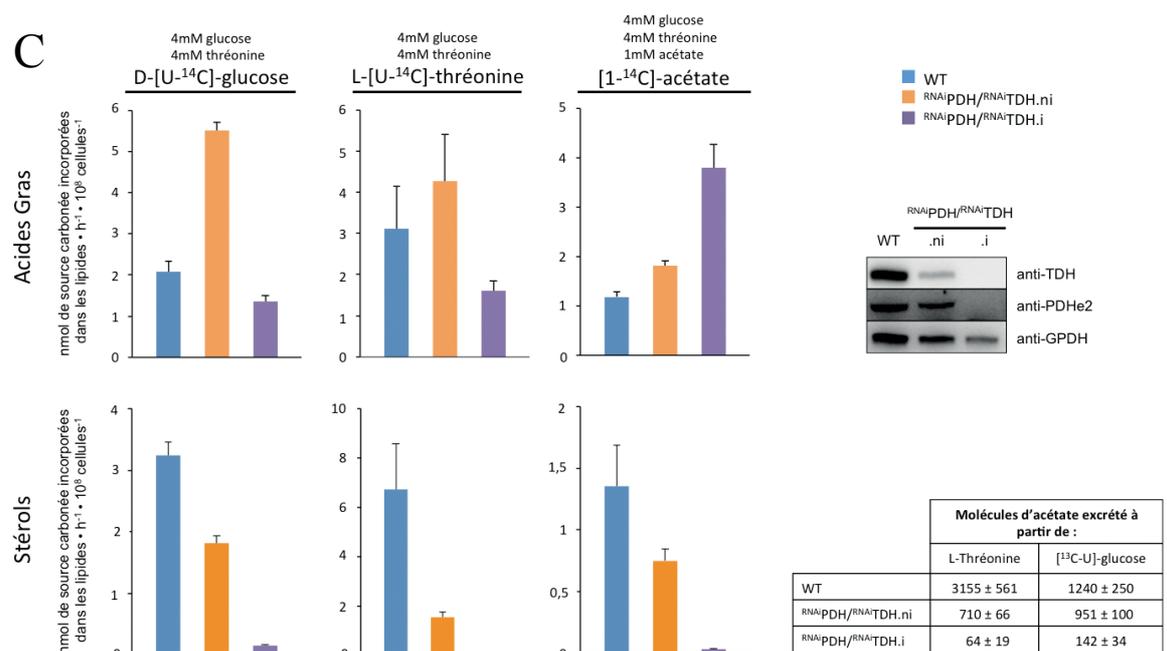


Figure 33 : Incorporation du D-[U-¹⁴C]-glucose, de la L-[U-¹⁴C]-thréonine ou du [1-¹⁴C]-acétate dans les acides gras et les stérols de la souche EATRO1125.T7T et des mutants ^{ARNi}TDH, Δpdh et ^{ARNi}PDH/^{ARNi}TDH

10⁸ cellules procycliques sauvages EATRO1125.T7T (WT) et mutantes ^{ARNi}TDH non induites (.ni) et induites (.i) (A), Δpdh (B) et ^{ARNi}PDH/^{ARNi}TDH.ni et .i (C) sont incubées pendant 16 h à 27°C dans 5 ml de SDM79 contenant 4 mM de glucose et 4 mM de thréonine. Dans ce milieu, nous avons ajouté 5 μ Ci de D-[U-¹⁴C]-glucose, 2,5 μ Ci de L-[U-¹⁴C]-thréonine ou 1 mM d'acétate avec 10 μ Ci de [1-¹⁴C]-acétate. Les lipides sont ensuite extraits, transestérifiés puis les esters méthyliques d'acides gras et les stérols sont séparés sur des plaques HPTLC. Ils sont identifiés par co-migration avec des marqueurs connus. Leur radioactivité est ensuite analysée par phosphoimageur. Les données sont exprimées en nmol d'acétate (radioactif et non radioactif) incorporées par heure dans les acides gras ou les stérols de 10⁸ cellules. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type de 3 expériences indépendantes. Dans la partie droite de chaque figure, le tableau montre les quantités d'acétate excrétées à partir du métabolisme du glucose et de la thréonine en nmol h⁻¹ mg⁻¹ de protéine par les différents mutants (données extraites de Millerioux et al., 2013). L'expression des protéines ciblées par ARNi a été analysée par western blot (figures A et C). Les anticorps anti-GPDH sont utilisés comme contrôle.

La phase supérieure contenant l'hexane, les esters méthyliques d'acides gras et les stérols est extraite, les lipides sont séparés par HPTLC (High performance thin layer chromatography) et leur radioactivité est analysée par phosphoimager comme décrit précédemment (Millerieux, Ebikeme et al. 2013) L'inhibition de l'expression des protéines ciblées par ARNi est systématiquement vérifiée par western blot. Comme attendu, le mutant ^{ARNi}TDH induit (.i) n'incorpore plus la thréonine radio-marquée dans les stérols et les acides gras, puisque la TDH n'est plus exprimée (Fig. 33A). La très forte diminution d'incorporation dans le mutant ^{ARNi}TDH non induit (.ni) est certainement due à une fuite importante observée par western blot, qui occasionne une réduction de l'activité TDH de 80% (Millerieux, Ebikeme et al. 2013) L'incorporation de la radioactivité provenant du glucose dans les lipides est sensiblement affectée dans le mutant ^{ARNi}TDH.i, avec une augmentation de 70% dans les acides gras qui semble être corrélée avec une diminution de 30% dans les stérols. Ces résultats nous suggèrent que lorsque la biosynthèse des lipides à partir de la thréonine est inhibée, la cellule redirige le flux de production de l'acétyl-CoA à partir du glucose vers la biosynthèse *de novo* des acides gras entraînant une diminution du flux de production des stérols. Les résultats sont un peu plus contrastés lorsque l'acétate radio-marqué est utilisé, cependant l'incorporation dans les stérols est également diminuée (57%), alors que l'incorporation dans les acides gras n'est pas affectée.

Des résultats comparables ont été obtenus avec le mutant *Apdh*. En l'absence d'activité PDH, l'incorporation de la radioactivité provenant du [¹⁴C]-glucose dans les acides gras et les stérols est totalement abolie (Fig. 33B). Comme observé pour le mutant ^{ARNi}TDH.i, l'incorporation dans les lipides de la source de carbone consommée (ici la [¹⁴C]-thréonine) est affectée, avec une augmentation pour les acides gras (80%) et une diminution pour les stérols (76%). Les mêmes résultats sont observés avec l'acétate radioactif (augmentation de 60% pour les acides gras et diminution de 75% pour les stérols). Ainsi, lorsque la production d'acétyl-CoA à partir du glucose est inhibée, le flux de production à partir de la thréonine semble être redirigé vers la biosynthèse des acides gras, au détriment des stérols. Dans le mutant *Apdh*, la radioactivité provenant de l'acétate est préférentiellement incorporée dans les acides gras. L'incorporation est diminuée dans les stérols. L'acétate présent dans le milieu est donc principalement utilisé pour la biosynthèse des acides gras et non pour les stérols.

Enfin, dans le double mutant ^{ARNi}PDH/^{ARNi}TDH.ni, on observe une augmentation de l'incorporation de la radioactivité dans les acides gras et une diminution dans les stérols, quelque soit la source de carbone radio-marquée utilisée (Fig. 33C). Ceci est certainement dû à la fuite observée (voir western blot) avec une diminution modérée de l'expression de la PDH et une forte diminution de l'expression de la TDH.

Dans ce cas, la diminution relativement importante (62%) de la production globale d'acétate dans la mitochondrie (Tableau de la Fig. 33C) peut expliquer la redistribution globale du flux métabolique vers la biosynthèse des acides gras, quelque soit la source de carbone. Cependant, l'incorporation de la radioactivité provenant du glucose et de la thréonine dans les stérols et les acides gras est fortement diminuée après induction du double mutant, puisque les voies de dégradation de ces deux sources carbonées sont inhibées, avec une production d'acétate réduite de 95% (Tableau de la Fig. 33C). Là encore, la radioactivité provenant de l'acétate est préférentiellement incorporée dans les acides gras et devient pratiquement indétectable dans les stérols produits par le double mutant induit. L'augmentation importante de l'incorporation de l'acétate dans les acides gras, alors que celle du glucose et de la thréonine diminue est certainement due à l'addition de 1 mM acétate dont l'incorporation dans les lipides n'est pas affectée par l'inhibition de l'expression de la PDH-E2 et de la TDH.

L'ensemble de ces résultats nous montre que lorsqu'une voie de production d'acétate est inhibée (à partir du glucose ou de la thréonine), le flux de dégradation de l'autre voie est redirigé en priorité vers la biosynthèse des acides gras. En conséquence, le flux métabolique dans la voie de biosynthèse des stérols s'en retrouve fortement diminué. Cette diminution est d'autant plus importante que la réduction de la production d'acétate dans la mitochondrie est réduite. Lorsque les voies de dégradation du glucose et de la thréonine sont inhibées dans le double mutant ^{ARNi}PDH/^{ARNi}TDH.i, il n'y a plus de production de stérols et le peu d'acétate qui est produit (l'inhibition de l'expression des protéines TDH et PDH n'étant probablement pas totale dans ce mutant) est utilisé pour la biosynthèse des acides gras. La redirection des flux métaboliques vers la biosynthèse des acides gras ne signifie pas qu'il y a augmentation de la production de ces lipides. La cellule compense la diminution de production des acides gras à partir d'une source de carbone en redirigeant le flux de l'autre voie de dégradation vers la biosynthèse des acides gras, au détriment de la biosynthèse des stérols. Cette préférence est probablement liée à une demande importante des cellules en acides gras, qui entrent dans la composition des principaux composants des membranes biologiques, les phospholipides. Cette demande supérieure en acides gras est d'ailleurs illustrée par la différence d'incorporation du glucose, de la thréonine et de l'acétate dans les acides gras qui est 3 fois supérieure à celle des stérols (Millerioux, Ebikeme et al., 2013).

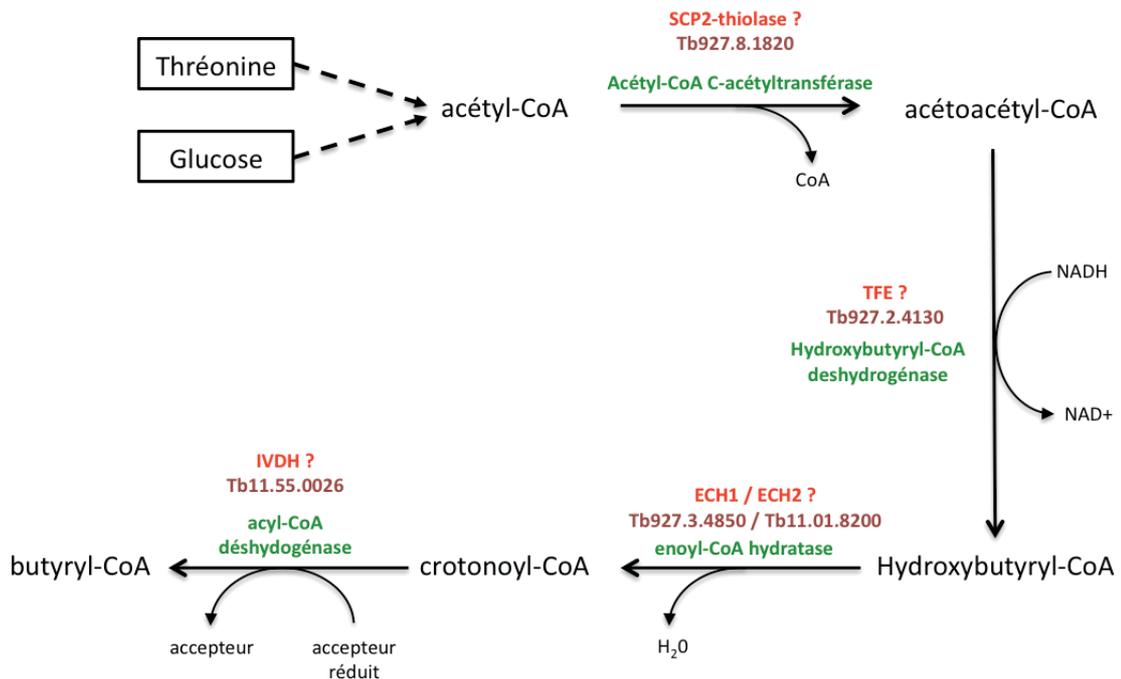


Figure 34 : Voie de biosynthèse du butyryl-CoA

Sur cette représentation schématique de la voie de biosynthèse du butyryl-CoA à partir de l'acétyl-CoA, les sources de carbones externes sont encadrées en noir et les intermédiaires métaboliques sont indiqués en noir. Les activités requises à chaque étape sont indiquées en vert, les enzymes putatives en rouge et en marron les numéros d'identification des gènes candidats identifiés dans le génome de *T. brucei*. Abréviations : SCP2-thiolase, sterol carrier protein type-2 thiolase ; TFE, trifunctional enzyme ; ECH, enoyl-CoA hydratase ; IVDH, isovaléryl-CoA déshydrogénase.

2.5 Biosynthèse du butyryl-CoA

Les trypanosomes ont la capacité de synthétiser *de novo* les acides gras. Bien que ces parasites possèdent un système d'acides gras synthase de type II (FAS II) mitochondrial, ils ont développé un système unique, le système élongases. Les activités enzymatiques de la voie élongases sont identiques à celles du système FAS II mais les groupements acyles et le malonyl, l'élongateur, sont liés au coenzyme A et non à une ACP. Chez les autres organismes, les élongases sont utilisées pour l'élongation des acides gras préexistants. Les trypanosomes ont donc adapté ce système. L'autre différence réside dans la nature du précurseur de cette biosynthèse. Alors que l'acétyl-CoA est le précurseur communément rencontré dans la nature, les trypanosomes utilisent le butyryl-CoA. La voie de biosynthèse du butyryl-CoA n'étant à l'heure actuelle pas connue, nous avons voulu identifier les gènes codant les enzymes potentiellement impliquées dans cette voie et je me suis particulièrement concentré sur la caractérisation de la dernière enzyme de cette voie putative, l'isovaléryl-CoA déshydrogénase (IVDH).

2.5.1 La voie de biosynthèse

Nous avons dans un premier temps cherché à reconstituer une voie de production du butyryl-CoA à partir de l'acétyl-CoA en utilisant des données du génome de *T. brucei* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Comme nous l'avons déjà vu, l'acétyl-CoA est principalement produit dans la mitochondrie du parasite à partir du glucose et de la thréonine. Cet acétyl-CoA peut théoriquement être converti en acétoacétyl-CoA par la SCP2-thiolase (Tb927.8.2540) récemment décrite chez la forme procyclique de *T. brucei*, dans le cadre d'une collaboration entre les équipes de Paul Michels (Bruxelles, Belgique), Rik Wierenga (Oulu, Finlande) et la notre (Mazet et al. 2011). Cette enzyme localisée dans la mitochondrie pourrait condenser deux molécules d'acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA. Le génome de *T. brucei* contient un gène codant pour une enzyme trifonctionnelle (TFE, Tb927.2.4130) qui coderait les activités enoyl-CoA hydratase, enoyl-CoA isomérase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. L'activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase permettrait de convertir l'acétoacétyl-CoA en hydroxybutyryl-CoA. Les banques de données de *T. brucei* contiennent également deux homologues de l'énoyl-CoA hydratase (ECH1, Tb927.3.4850 et ECH2, Tb11.01.8200), permettant la conversion de l'hydroxybutyryl-CoA en crotonoyl-CoA. Enfin, un homologue d'une isovaléryl-CoA déshydrogénase (IVDH, Tb11.55.0026) a été identifié (Fig. 34).

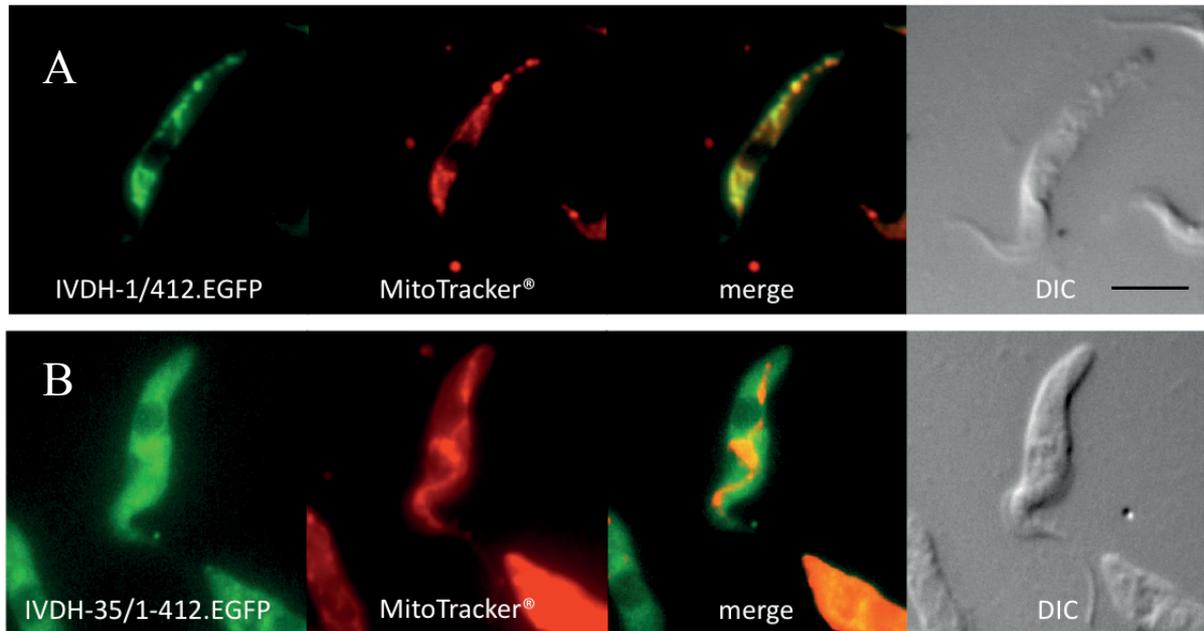


Figure 35 : Localisation de l'IVDH

Les cellules procycliques exprimant IVDH-1/412.EGFP (A) et IVDH-35/412.EGFP (B) ont été incubées en présence de MitoTracker® avant d'être fixés et observés. La superposition des fluorescences verte et rouge est montrée sur les images indexées "merge". A droite de chaque figure, l'image présente le contraste interférentiel des cellules (DIC, differential interference contrast). Barre d'échelle, 5 μ m.

Cette enzyme pourrait catalyser la réaction de conversion du crotonoyl-CoA en butyryl-CoA. Je me suis intéressé à la caractérisation de ces trois dernières enzymes, mais seule l'étude de l'IVDH a donné des résultats exploitables.

2.5.2 L'isovaléryl-CoA déshydrogénase

L'isovaléryl-CoA déshydrogénase est une acyl-CoA déshydrogénase FAD-dépendante dont le rôle est de convertir l'isovaléryl-CoA en 3-méthylcrotonyl-CoA dans la mitochondrie. Elle intervient notamment dans la voie de dégradation de la leucine. Cette activité enzymatique a notamment été décrite chez l'Homme et son déficit héréditaire est responsable d'une maladie rare, l'acidémie isovalérique (Jerry Vockley, 2006). Cette enzyme a également été identifiée chez d'autres organismes comme les plantes (Daschner, K, 2001) ou les bactéries (Zhang et al., 1999, Karin Förster-Fromme, 2008). L'IVDH peut avoir d'autres substrats que l'isovaléryl-CoA, comme par exemple le butyryl-CoA (Förster-Fromme K, 2008). C'est cette dernière analyse qui nous a conforté dans notre intérêt pour le gène Tb11.55.0026.

2.5.3 Localisation de l'IVDH chez *T.brucei*

D'après la base de données TriTrypDB, le gène *IVDH*, identifié dans le génome de *T. brucei* code pour un polypeptide d'une masse de 44,8 kDa. D'après le programme MitoProt II (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>), la séquence protéique de l'IVDH contient un peptide d'adressage mitochondrial en position N-terminale (probabilité 0,96). Afin de confirmer cette localisation, nous avons généré un mutant exprimant l'IVDH avec ou sans le peptide d'adressage à la mitochondrie couplée à l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Pour cela, les fragments PCR correspondant à l'IVDH (pLew100-IVDH-1/412.EGFP) ou la même séquence sans les 34 premiers résidus (pLew100-IVDH-35/412.EGFP) ont été insérés entre les sites de restriction XhoI et XbaI du plasmide pLew100-EGFP1. Les plasmides ont ensuite été linéarisés par NotI puis individuellement utilisés pour transférer la souche parentale procyclique EATRO1125.T7T. Après induction de l'expression de la protéine recombinante par addition de tétracycline, l'observation de la fluorescence au microscope a révélé que l'IVDH couplée à l'EGFP (souche IVDH-1/412) est exprimée dans la mitochondrie (Fig. 35A). En effet, la fluorescence verte de l'EGFP, colocalise avec la fluorescence rouge du MitoTracker®, marqueur de la mitochondrie.

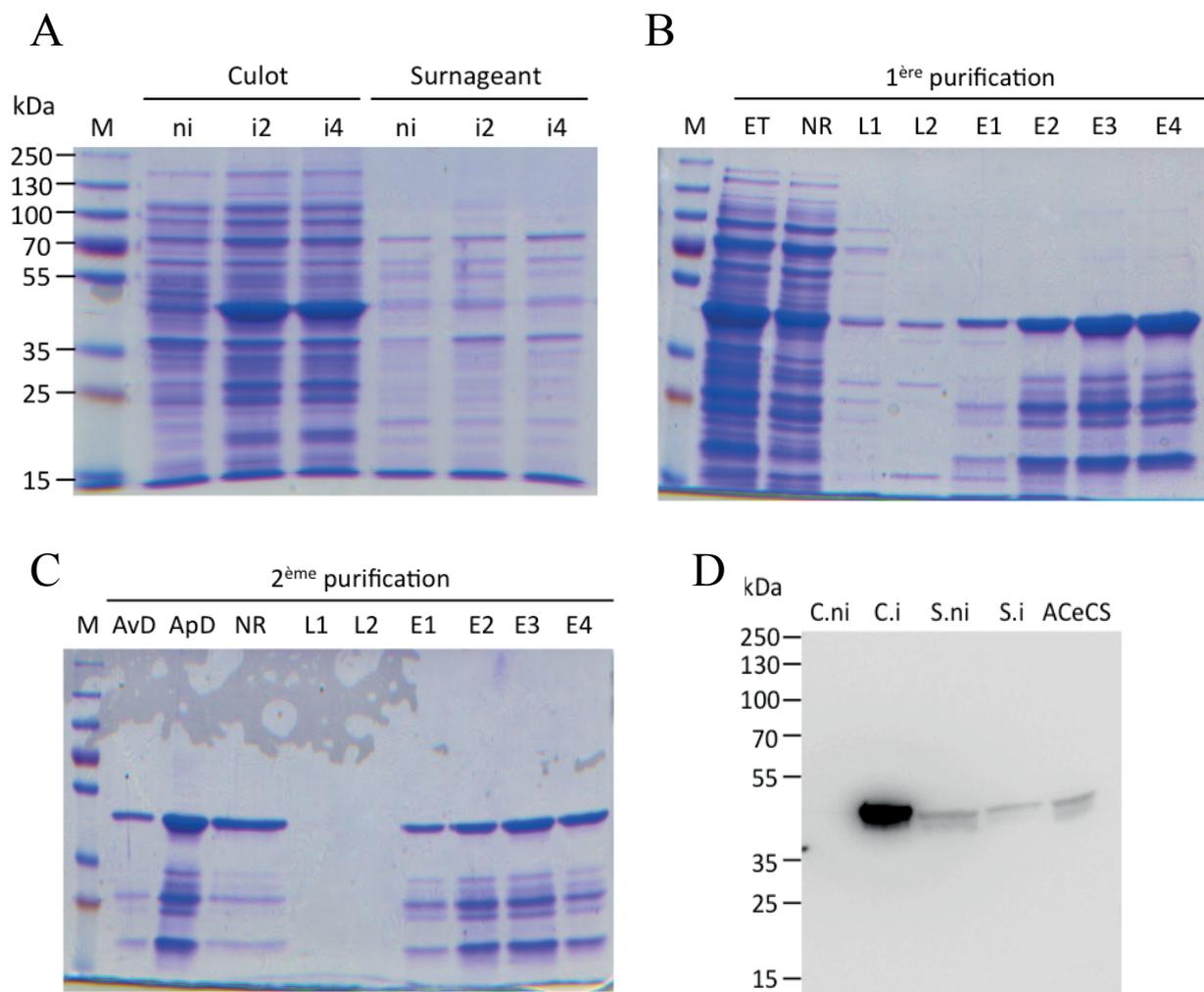


Figure 36 : Expression d'une IVDH recombinante chez *Escherichia coli* BL21(DE3) et purification par chromatographie d'affinité au nickel

Les protéines des surnageants et des culots correspondants aux cellules d'*Escherichia coli* BL21(DE3) exprimant l'IVDH de *T. brucei* recombinante (protéine entière) possédant une étiquette histidine à l'extrémité N-terminale non-induites (ni), induites par l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) pendant 2 h (.i2) ou 4 h (.i4) sont séparées par SDS-PAGE. Les protéines sont visualisées après coloration du gel de polyacrylamide avec du bleu de Coomassie (A). La protéine IVDH recombinante a ensuite été purifiée sur la résine Ni-NTA His•Bind® chargée au nickel (Novagen). Les protéines des différentes fractions (ET, extrait total ; NR, non retenue sur la colonne ; L1 et L2, 1^{er} et 2^{ème} lavages ; E1 à E4, fractions d'élution 1 à 4) sont séparées par SDS-PAGE puis visualisées par coloration au bleu de Coomassie (B). Les 4 fractions d'élutions sont mélangées, dialysées dans une solution d'urée 6 M puis passées sur une deuxième colonne de nickel. Les protéines des différentes fractions (AvD, fractions d'élutions avant dialyse ; ApD, fractions d'élution dialysées ; NR ; L1 et L2 ; E1 à E4) sont séparées par SDS-PAGE puis visualisées par coloration au bleu de Coomassie (C). Les culots et surnageants non induits et induits de la souche BL21(DE3)pet28a-IVDH et le surnageant non induit de la souche BL21(DE3)pet28a-ACeCS ont été analysés par western blot avec les anticorps anti-IVDH produits par immunisation de lapin avec la protéine recombinante IVDH. Les poids moléculaires en kDa des bandes du marqueur de taille (M) sont indiquées dans la partie gauche des figures A et D.

En revanche, la fluorescence émise par la souche exprimant l'IVDH sans les 34 premiers résidus (IVDH-35/412) est diffuse dans le cytoplasme du parasite, ce qui confirme la présence d'un peptide d'adressage mitochondrial en position N-terminale de l'IVDH (Fig. 35B).

2.5.4 Expression hétérologue de l'IVDH dans *E. coli*

Afin de produire des anticorps anti-IVDH, un fragment correspondant au gène *IVDH* complet a été inséré entre les sites de restrictions NdeI et BamHI du vecteur d'expression pET28a (Novagen) pour exprimer l'IVDH recombinante contenant une étiquette histidine (6 codons histidine) à l'extrémité terminale dans la souche *Escherichia coli* BL21(DE3). Les cellules ont été cultivées à 37°C et induites par addition d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) pendant 2 h (i2) ou 4 h (i4). Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans du Tris 10 mM, soniqué puis centrifugé à nouveau. Au surnageant est ajouté du SDS pour obtenir une concentration finale de 2% et le culot est resuspendu dans une solution de 10 mM Tris/2% SDS. Les protéines des culots et des surnageants des cellules non-induites (ni), i2 et i4 sont séparées par SDS-PAGE et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie (Fig. 36A). Une bande d'intensité plus importante correspondant à la taille attendue (~45 kDa) est présente dans les culots des cellules induites. La protéine IVDH recombinante étant exprimée dans la fraction insoluble, cette dernière a ensuite été purifiée à partir des culots de cellules induites 2 h par chromatographie d'affinité sur la résine Ni-NTA His•Bind® chargée au nickel selon les recommandations du fabricant du kit (Novagen). Les protéines des différentes fractions obtenues sont séparées par SDS-PAGE puis visualisées par coloration au Bleu de Coomassie (Fig. 36B). Afin de purifier l'IVDH recombinante le mieux possible, les fractions d'élution sont ensuite mélangées, dialysées dans une solution d'urée 6M puis de nouveau soumises à la chromatographie d'affinité au nickel. Les protéines des différentes fractions sont séparées et visualisées comme précédemment (Fig. 36C). Les fractions d'élution contiennent une protéine de taille attendue (~45 kDa) ainsi que des peptides de plus petite taille correspondant probablement à des produits de dégradation de l'IVDH recombinante. En effet, ces derniers peptides ont été purifiés après 2 passages successifs sur la résine Ni-NTA His•Bind® chargée au nickel et contiennent certainement les 6 résidus histidine. Les fractions d'élution ont été utilisées pour immuniser des lapins et produire des anticorps anti-IVDH. Les culots et surnageants non induits et induits de BL21(DE3)pet28a-IVDH et le surnageant non induit de BL21(DE3)pet28a-ACeCS (qui n'expriment donc pas l'IVDH) ont été analysés par western blot avec les anticorps anti-IVDH (Fig. 36D).

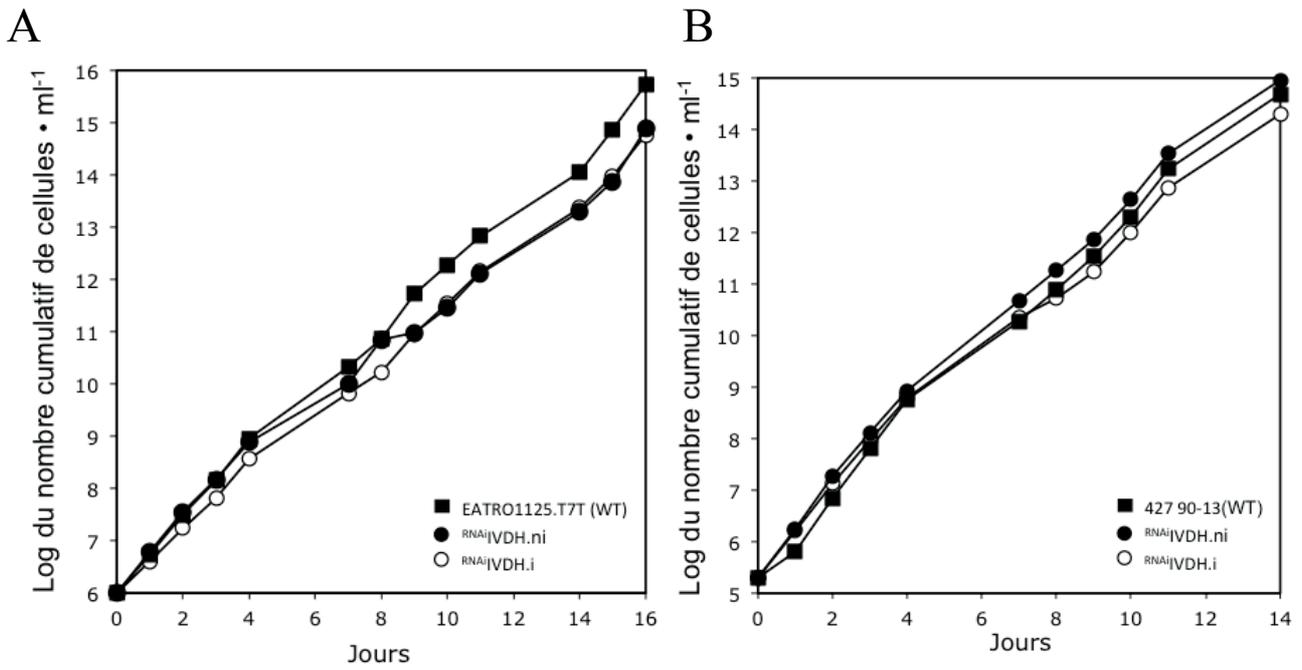


Figure 37 : Courbes de croissance des mutants ARNi IVDH

Les courbes de croissance des mutants ARNi IVDH non induits (●) et induits (○) par la tétracycline sont comparées à la courbe de croissance de la souche sauvage (■). Les cellules procycliques sont maintenues en phase exponentielle (entre 10^6 et 10^7 cellules. ml^{-1}) dans du milieu SDM79 par des dilutions quotidiennes (A). Les cellules sanguines sont maintenues en phase exponentielle (entre 2.10^5 et 2.10^6 cellules. ml^{-1}) dans du milieu IMDM par des dilutions quotidiennes (B) Les courbes représentent le logarithme du nombre cumulé de cellules en fonction du temps (en jours).

Les anticorps reconnaissent bien l'ICDH recombinante dans les culots d'extraits de bactéries induites. Cependant la protéine de même taille également retrouvée dans le surnageant des mêmes cellules induites correspond probablement à une réaction croisée, puisque le même signal est retrouvé dans le surnageant de cellules non induites et d'un autre clone d'*E. coli* non induit transformé avec un plasmide contenant le gène de l'AceCS. La protéine IVDH recombinante étant insoluble il n'a pas été possible de déterminer expérimentalement son activité IVDH *in vitro*. Afin d'obtenir une protéine IVDH recombinante soluble, j'ai cultivé les cellules BL21(DE3)pet28a-IVDH pendant 5 h à 20°C. Malheureusement, dans ces conditions, la protéine n'est toujours pas exprimée dans le surnageant des cellules non induites et induites par l'IPTG et je n'ai donc pas obtenu de protéine IVDH recombinante soluble dans sa forme active.

2.5.5 Analyse de la croissance du mutant ^{ARNi}IVDH

Afin d'étudier le rôle de l'IVDH chez la forme procyclique et les formes sanguines de *T. brucei*, nous avons généré des mutants ^{ARNi}IVDH. Pour cela, un fragment de 595 pb contenant la séquence antisens de l'*ivdh* a été inséré entre les sites de restriction HindIII et BamHI du plasmide pLew100. Un autre fragment de 515 pb correspondant à une partie antiparallèle du fragment antisens de l'*ivdh* a ensuite été inséré en amont de la séquence antisens entre les sites de restriction HindIII et XhoI (XhoI ayant été préalablement ajouté à l'extrémité 3' du fragment PCR antisens). Le plasmide résultant, plew100-IVDH-SAS, exprime de manière inductible par la tétracycline un ARN de ~1,1 kb contenant les versions sens et antisens d'une partie du gène *IVDH* (515 bp) séparées par 80 bp, qui forme une structure tige-bouche reconnue par la machinerie ARNi. Le plasmide plew100-IVDH-SAS a été linéarisé par NotI puis utilisé pour transférer la souche procyclique EATRO1125.T7T ou sanguine 427 90-13. Le mutant ^{ARNi}IVDH après induction par la tétracycline ne présente pas de phénotype de croissance significatif dans le milieu SDM79 pour la forme procyclique ou dans le milieu IMDM pour la forme sanguine (Fig. 37). En effet, les courbes de croissance des mutants induits et non induits se superposent et l'inhibition de l'expression de l'IVDH ne provoque pas ou peu de retard de croissance par rapport à la souche parentale. Ainsi, l'IVDH ne semble pas essentielle au parasite dans ces conditions que ce soit chez les formes procyclique (Fig. 37A) ou sanguines (Fig. 37B).

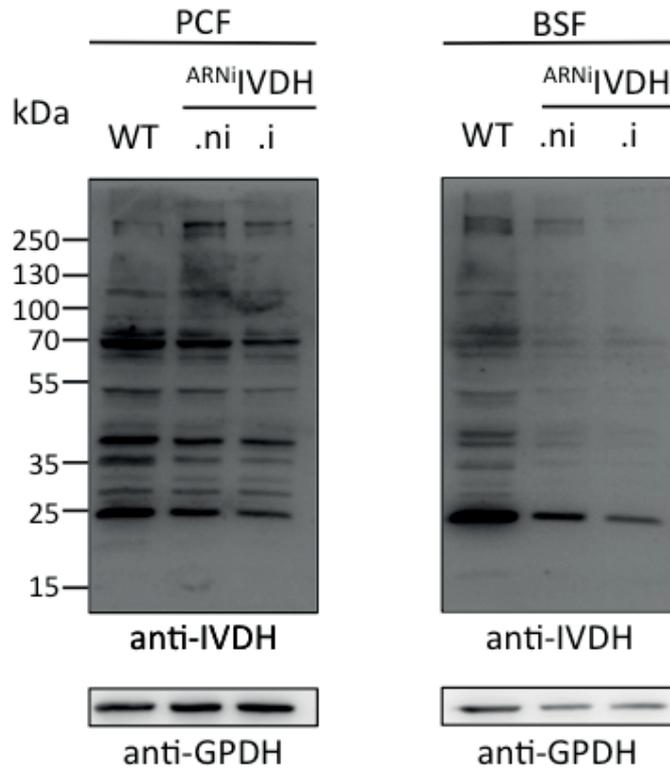


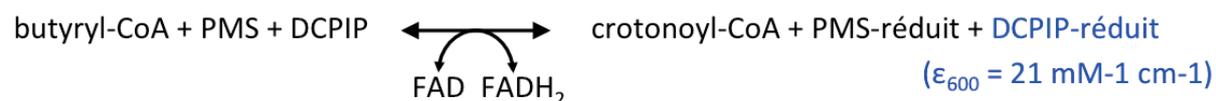
Figure 38 : Western blot anti-IVDH des cellules sauvages et des mutants^{ARNi}IVDH des formes procyclique et sanguines

L'expression de l'ICDH a été analysée par western blot avec l'immunsérum anti-IVDH sur les lysats des cellules sauvages et des mutants^{ARNi}IVDH de la forme procyclique (PCF) et des formes sanguines (BSF). Les anticorps anti-GPDH ont été utilisés comme contrôle. Les poids moléculaires en kDa des bandes du marqueur de taille (M) sont indiqués dans la partie gauche de la figure.

Afin de vérifier l'efficacité de l'inhibition de l'expression de l'IVDH dans ces mutants ARNi, nous avons analysé les extraits totaux de protéines des cellules parentales et des mutants ^{ARNi}IVDH non induits (.ni) et induits (.i) des formes procyclique et sanguines par western blot avec les anticorps anti-IVDH que nous avons produits (Fig. 38). De nombreuses bandes sont reconnues par ces anticorps chez les deux formes du parasite. Cependant, on observe une importante diminution globale de l'expression des protéines reconnues par ces anticorps dans les mutants induits comparativement aux cellules parentales. L'expression de la protéine contrôle (GPDH) n'est pas significativement différente entre la souche parentale et les mutants induits et non induits des deux formes du parasite. Bien que la détection de nombreuses bandes avec l'immun-sérum anti-IVDH soit surprenante et inexpliquée, ces résultats semblent indiquer que l'expression de l'IVDH a bien été inhibée dans les mutants ^{ARNi}IVDH des formes procyclique et sanguines. L'induction par la tétracycline n'apporte pas d'effet supplémentaire sur l'inhibition de l'expression de la protéine. La protéine IVDH des parasites pourrait être dégradée lors de la préparation des lysats de parasite et de l'électrophorèse ce qui pourrait expliquer la multiplicité des bandes sur les Western Blot. Les anticorps pourraient aussi reconnaître des protéines de manière non spécifique et nous avons déjà vu que ces anticorps reconnaissaient une protéine exprimée par *E. coli*.

2.5.6 Test d'activité IVDH

Nous avons mesuré l'activité IVDH d'après le protocole développé par Hall et al., 1978 et modifié par Ikeda et al., 1983 (Hall 1978, Ikeda and Tanaka 1983). La réaction est la suivante:



2×10^8 cellules procycliques (EATRO1125.T7T) sont resuspendues dans 1 ml de tampon phosphate potassium 100 mM puis soniquées brièvement. Le mélange réactionnel contient 7,5 μL de DCPIP 10 mM (2,6-dichlorophenol-indophenol), 5 μL de PMS 100 μM (Phenazine méthosulfate), 5 μL de FAD 1 mM (Flavine adénine dinucléotide), 50 μL d'extrait cellulaire et 427,5 μL de tampon phosphate potassium 100 mM (pH 7). La réaction débute par l'ajout de 5 μL de butyryl-CoA 5 mM ou 5 μL de butyryl-CoA 15mM, pour une concentration finale de 50 μM ou 150 μM de butyryl-CoA respectivement. La réduction du DCPIP ($\epsilon_{600} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) est suivie par spectrophotométrie à 600 nm, 25°C. Le PMS et le DCPIP sont respectivement des accepteurs intermédiaire et final d'électrons.

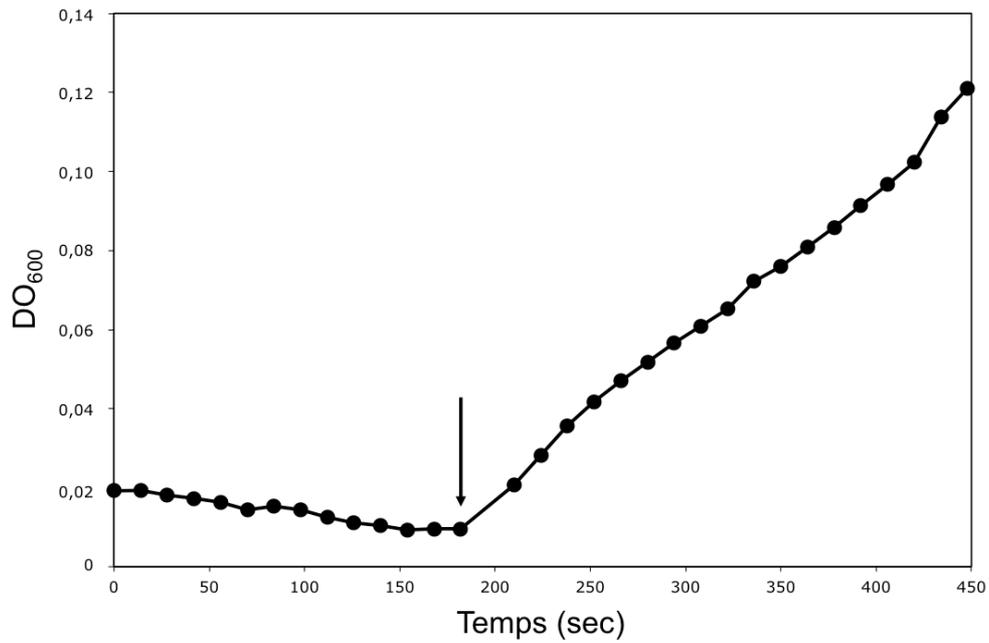


Figure 39 : Mesure de l'activité IVDH de la souche EATRO1125.T7T

La réduction du DCPIP ($\epsilon_{600} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) est suivie par spectrophotométrie à 600 nm et 25°C pendant 180 secondes avant l'ajout de butyryl-CoA (flèche noire, concentration finale de 150 μM) et pendant 270 secondes après l'ajout du substrat. L'essai est réalisé sur un extrait cellulaire total de la souche EATRO1125.T7T contenant $\sim 90 \mu\text{g}$ de protéines.

Aucune activité n'a été détectée avec 50 μM de butyryl-CoA. En revanche, nous avons observé une activité faible (~ 5 mU/mg de protéine avec 150 μM de substrat) (Fig. 39).

2.5.7 Effet de l'inhibition de l'expression de l'IVDH sur la biosynthèse des acides gras et des stérols

Les trypanosomes utilisent le butyryl-CoA comme précurseur de la biosynthèse des acides gras. Nous avons étudié l'effet de l'inhibition de l'IVDH, potentiellement impliquée dans la production de ce précurseur, sur la production des acides gras et des stérols, en collaboration avec l'équipe de Patrick Moreau (CNRS, Bordeaux). Pour cela, des cellules parentales EATRO1125.T7T de la forme procyclique et le mutant $^{\text{ARNi}}$ IVDH non induit et induit ont été incubés dans du milieu SDM79 dans lequel est ajouté 1 mM d'acétate et 10 μCi de $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate. Les lipides ont ensuite été extraits, transestérifiés et séparés par HPTLC comme décrit précédemment (Millerioux, Morand et al. 2012) (Fig. 40A). Chez le mutant $^{\text{ARNi}}$ IVDH non induit, on observe une diminution de l'incorporation de la radioactivité provenant de l'acétate dans les acides gras (environ deux fois moins que dans la souche parentale). En revanche, l'incorporation de cette radioactivité dans les stérols est légèrement augmentée par rapport à ce qui est observé chez la souche parentale (1,3 fois). Dans le mutant induit, les effets observés pour le mutant non induit sont amplifiés : l'incorporation de ^{14}C dans les acides gras est environ divisée par 3 et multipliée par 1,5 dans les stérols comparé à la souche parentale. La production des acides gras est donc considérablement affectée lorsque l'expression de l'IVDH est inhibée (ou diminuée), ce qui est en accord avec notre hypothèse de départ, c'est-à-dire que l'IVDH est impliquée dans la production du précurseur de la biosynthèse des acides gras, le butyryl-CoA.

La même expérience a été réalisée sur les cellules parentales (427 90-13) et mutantes $^{\text{ARNi}}$ IVDH non induites et induites des formes sanguines. Ces cellules sont incubées pendant 16 h à 37°C dans du milieu IMDM modifié sans thréonine, pyruvate, leucine, isoleucine, valine et contenant 25 mM de glucose, 100 μM d'acétate et 40 μCi de $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate. Les lipides sont analysés de la même façon que pour les cellules procycliques (Fig. 40B). Nous avons observé une diminution de l'incorporation de la radioactivité dans le mutant $^{\text{ARNi}}$ IVDH non induit et induit (environ 1,6 fois moins que dans la souche parentale). Cette diminution observée à la fois dans le mutant induit et non induit est peut-être liée à la forte fuite observée par western blot avant induction (Fig. 38), bien que ce contrôle soit à prendre avec beaucoup de précautions. Contrairement au même mutant de la forme procyclique, l'inhibition de l'expression de l'IVDH n'a aucun effet significatif sur la production des stérols.

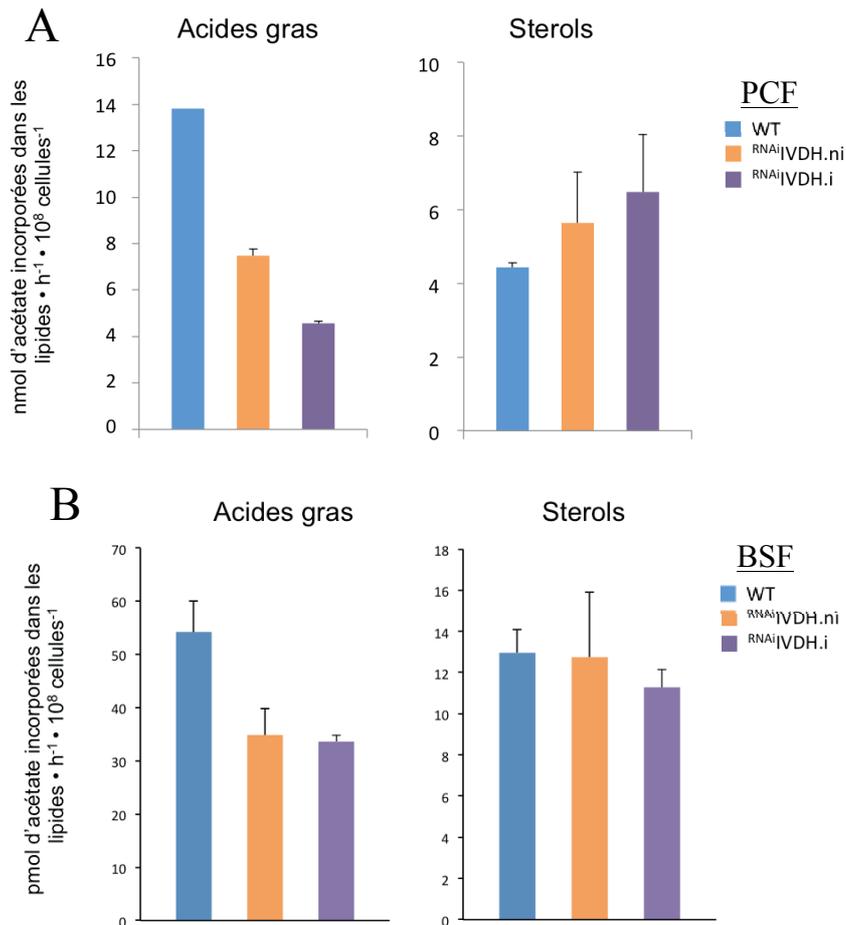


Figure 40 : Incorporation du [1-¹⁴C]-acétate dans les acides gras et les stérols de la souche EATRO1125.T7T et du mutant ARNi IVDH

(A), 10⁸ cellules procycliques EATRO1125.T7T (WT, Bleu), ARNi IVDH non induites (.ni, orange) et induites (.i, violet) sont incubées pendant 16 h à 27°C dans 5 ml de SDM79 contenant 4 mM de glucose, 4 mM de thréonine, 1 mM d'acétate et 10 µCi de [1-¹⁴C]-acétate. (B) 5.10⁷ cellules sanguines *T. brucei* 427 90-13 (WT), .ni et .i sont incubées 16 h dans 10 mL de milieu IMDM modifié sans thréonine, pyruvate, leucine, isoleucine, valine et contenant 25 mM de glucose, 100 µM d'acétate et 40 µCi de [1-¹⁴C]-acétate. Les lipides sont ensuite extraits, transestérifiés puis les esters méthyliques d'acides gras et les stérols sont séparés sur des plaques HPTLC. Ils sont identifiés par co-migration avec des marqueurs connus. Leur radioactivité est ensuite analysée par phosphoimageur. Les données sont exprimées en nmol d'acétate (radioactif et non radioactif) incorporées par heure dans les acides gras ou les stérols de 10⁸ cellules pour la forme procyclique et en pmol d'acétate (radioactif et non radioactif) incorporées par heure dans les acides gras ou les stérols de 10⁸ cellules pour les formes sanguines. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type de 3 expériences indépendantes.

2.5.8 Conclusion

Les résultats présentés ici, bien que préliminaires, sont très encourageants, car ils semblent indiquer que l'IVDH est impliquée dans la biosynthèse des acides gras en produisant le butyryl-CoA. Cependant, un certain nombre de points méritent d'être confirmés et/ou approfondis avant d'en tirer des conclusions. Tout d'abord, nous n'avons aucune certitude quant au niveau d'expression de l'IVDH dans les mutants ARNi analysés, car les profils d'expression obtenus par western blot avec l'immunsérum utilisé sont difficilement interprétables. Le niveau d'expression du gène *IVDH* dans les mutants sera estimé par northern blot et/ou par RT-PCR quantitative. Quoiqu'il en soit, nous devons générer des anticorps anti-IVDH plus spécifiques de la protéine d'intérêt. Nous pourrions par exemple produire des nouveaux anticorps en immunisant les lapins avec des peptides de synthèse produits à partir de la séquence de l'IVDH, lesquels seront purifiés contre les mêmes peptides. De tels anticorps dirigés contre d'autres protéines ont récemment été produits par la société Proteogenix et sont spécifiques de la protéine contre laquelle ils sont dirigés. S'il s'avère que la protéine est toujours exprimée dans le mutant pLew100 IVDH, comme la figure 38 semble l'indiquer, nous envisageons l'utilisation d'un autre vecteur pour augmenter l'inhibition de l'expression de l'IVDH, tel que le vecteur double promoteur p2T7-177 exprimant la cassette sens-antisens insérée dans le plasmide plew100-IVDH-SAS. En effet, il a été montré au laboratoire que l'expression d'une cassette sens-antisens dans un vecteur double promoteur est beaucoup plus efficace que l'expression de la même cassette dans un vecteur simple promoteur (résultats non publiés). Une alternative sera la production d'un mutant knock-out en délétant les deux allèles du gène *IVDH*. Par ailleurs, nous n'avons actuellement aucune évidence que l'IVDH contient l'activité acyl-CoA déshydrogénase. Nous avons détecté cette activité, bien que relativement faible, dans des extraits cellulaires totaux de la forme procyclique. Mais le lien entre cette activité enzymatique et l'IVDH reste à établir. Lorsque nous aurons obtenu un mutant n'exprimant plus l'IVDH, nous pourrions comparer les activités enzymatiques de ce mutant à celles de la souche parentale. Nous pourrions également surexprimer l'IVDH dans la forme procyclique de *T. brucei* (ou dans la forme promastigote de *Leishmania tarentolae*), afin de la purifier dans sa forme active pour déterminer son activité enzymatique, ses caractéristiques cinétiques et sa spécificité de substrat.

Néanmoins, des données intéressantes semblent se dégager de cette série d'expériences. Le résultat le plus encourageant est la diminution de l'incorporation de la radioactivité du [^{14}C]-acétate dans les acides gras observée pour les mutants ARNiIVDH générés aussi bien dans la forme procyclique que dans les formes sanguines. Dans ces mutants, la biosynthèse des acides gras est diminuée mais pas abolie et ces résultats peuvent s'expliquer de plusieurs façons. Comme discuté plus haut, il est possible que l'inhibition de l'expression de l'IVDH dans les mutants ARNiIVDH ne soit pas totale, ce qui expliquerait également l'absence de phénotype de croissance, bien que la biosynthèse des acides gras soit essentielle à la viabilité du parasite. Par ailleurs, nous pourrions envisager le fait que les acides gras produits dans le mutant ARNiIVDH pourraient provenir du système FAS II mitochondrial. Cependant, la voie des élongases est essentielle chez la forme procyclique du parasite (Lee, Stephens et al. 2006), donc la production d'acides gras par le système FAS II ne peut pas compenser l'absence de la voie des élongases. Or le mutant ARNiIVDH ne présente pas de phénotype de croissance chez la forme procyclique, la voie des élongases doit toujours être active dans ce mutant. Donc si l'inhibition de l'expression de la protéine est efficace dans ce mutant, il est probable que la voie des élongases utilise un autre précurseur que le butyryl-CoA pour la biosynthèse des acides gras, mais moins efficace, lorsque celui-ci n'est pas produit. Dans ce cas, la biosynthèse des acides gras pourrait se faire par addition de malonyl-CoA (élongateur) toujours produit dans le cytosol, à partir d'acétyl-CoA (précurseur alternatif) produit à la fois dans le cytosol et la mitochondrie. La production d'un mutant n'exprimant plus l'IVDH, tel qu'un mutant knock out, permettra de répondre à cette question. Chez les formes sanguines, les simples mutants knock-out des ELO 1 à 4 ne présentent pas de phénotype de croissance dans un milieu contenant des lipides. La voie n'est peut être donc pas essentielle dans un milieu riche en lipides ou les autres élongases pourraient compenser la perte de l'une d'entre elles. Si tel est le cas, là encore la voie des élongases du mutant ARNiIVDH utiliserait un autre précurseur que le butyryl-CoA. Le second élément que nous apportent nos résultats est que dans le mutant ARNiIVDH , la production des stérols est augmentée. Ainsi, lorsque la voie de biosynthèse du butyryl-CoA est inhibée, il y aurait une accumulation d'acétoacétyl-CoA qui serait alors redirigé vers la production des stérols (voir Fig. 25). Cette interprétation est en accord avec la localisation mitochondriale de l'IVDH, comme montré avec l'expression de la protéine fusionnée à la GFP avec ou sans le motif d'adressage à la mitochondrie (Fig. 35). En effet, la localisation dans le même compartiment subcellulaire des premières étapes de la voie de biosynthèse des stérols et probablement la totalité de la voie de synthèse du butyryl-CoA faciliterait la redistribution des flux métaboliques lors du blocage d'une des 2 voies.

III - DISCUSSION GENERALE

3.1 Rôles de la production d'acétate dans la mitochondrie des trypanosomes

3.1.1 Forme procyclique

L'acétate est l'un des principaux produits excrétés par le métabolisme glucidique de la forme procyclique de *T. brucei*. Et comme nous l'avons vu ici, l'acétate est un métabolite clé du métabolisme énergétique de la forme procyclique de *T. brucei*. A travers la navette acétate, cet acide permet d'alimenter la biosynthèse *de novo* des acides gras (Rivière, Moreau et al. 2009). Nous avons montré que la production d'acétate est impliquée dans la production d'ATP dans la mitochondrie *via* le cycle ASCT/SCoAS par phosphorylation au niveau du substrat. La contribution de cette production d'ATP est équivalente à la production par phosphorylation oxydative et est essentielle lorsque la F_0-F_1 ATP ϵ est inhibée (Millerioux, Morand et al. 2012). Par ailleurs, la production d'acétate est essentielle à la survie du parasite. Le caractère essentiel de cette production a été proposé il y a quelques années lorsqu'une étude a montré que l'acétyl-CoA produit par le métabolisme du glucose n'était pas métabolisé par le cycle de Krebs (van Weelden, Fast et al. 2003). Par la suite, il a été montré que l'ASCT est impliquée dans la production d'acétate à partir d'acétyl-CoA (Rivière, van Weelden et al. 2004). Cependant, les mutants de cette enzyme sont viables et produisent toujours de l'acétate. Les parasites utiliseraient donc une activité enzymatique alternative permettant de produire l'acétate. Cette observation renforça l'hypothèse du caractère essentiel de la production de cet acide. Nous avons identifié cette activité alternative. L'ACH permet ainsi de produire de l'acétate à partir de l'acétyl-CoA dans la mitochondrie du parasite sans générer d'ATP. Nous avons ainsi démontré que la production d'acétate est essentielle au parasite puisque le double mutant Δach^{RNAi} ASCT.i n'est pas viable et ne produit plus d'acides gras à partir du glucose. Cependant, si l'acétate est nécessaire pour la biosynthèse *de novo* des acides gras chez la forme procyclique de *T. brucei*, il semble que ce soit sa production dans la mitochondrie qui soit essentielle à sa survie. En effet, l'ajout d'acétate dans le milieu de culture ne restaure pas la croissance du double mutant Δach^{RNAi} ASCT.i, bien que l'acétate extracellulaire soit incorporé dans les acides gras. La létalité du double mutant Δach^{RNAi} ASCT.i n'est également pas due à un déficit de production d'ATP puisqu'il peut toujours être produit par phosphorylation oxydative, comme l'a montré la viabilité du mutant $\Delta asct$ (Rivière, van Weelden et al. 2004). La raison de la létalité du mutant ne produisant plus d'acétate dans la mitochondrie n'est donc toujours pas connue.

A l'heure actuelle, nous ne savons pas comment l'acétate traverse la membrane mitochondriale pour rejoindre le cytosol. L'acétate pourrait sortir en utilisant un transporteur ou un échangeur mais pourrait également passer la membrane par simple diffusion sous sa forme protonée. Ainsi, lors de sa sortie, l'acétate pourrait libérer un proton dans l'espace intermembranaire mitochondrial et participer à la génération du gradient de proton. La production d'acétate pourrait donc être importante pour le maintien du potentiel de membrane mitochondrial. La contribution de l'excrétion de métabolites dans la génération d'un gradient de proton a été proposée par Michels et al. en 1979 et étudié par Ten Brink et Konings en 1980 avec l'excrétion du lactate à travers la membrane chez *E. coli* (Michels, Michels et al. 1979, Ten Brink and Konings 1980). En fonction du pH extérieur, le lactate protoné est exporté et peut contribuer au gradient de proton. Ce phénomène a été ensuite observé chez d'autres bactéries (Otto, Lageveen et al. 1982). Si l'excrétion d'acétate contribue à générer un gradient de proton, les mutants ne produisant plus d'acétate (ACH/ASCT ou PDH/TDH) devraient voir leur potentiel de membrane mitochondrial diminuer. Afin de le démontrer, nous avons envisagé de comparer le potentiel de membrane mitochondrial de ces doubles mutants avec celui de mutants de la chaîne respiratoire pour lesquels ce potentiel est affecté. Aucun gène codant les sous-unités impliquées dans le transport des protons du complexe I de la chaîne respiratoire n'a été identifié dans le génome de *T. brucei* (Opperdoes and Michels 2008). Ceci implique qu'au sein de la chaîne respiratoire, seuls les complexes III et IV sont responsables de la génération du potentiel de membrane mitochondrial. Cependant, une étude a montré que les mutants ARNi des sous unités *ApoC1* et *RIESKE* du complexe III de la chaîne respiratoire sont viables et leur potentiel de membrane mitochondrial n'est que peu affecté (Horváth, Horáková et al. 2005). Ces résultats sont probablement dus à l'expression résiduelle des protéines ciblées observée chez ces mutants. Au laboratoire, nous avons généré et étudié plusieurs clones du mutant ^{ARNi}ApoC1, mais très peu présentaient une extinction quasiment totale de l'expression de la protéine. Le clone le plus intéressant obtenu montrait une fuite très importante avec une expression de l'ApoC1 très diminuée avant induction, associée à une réduction importante de la croissance. Après induction, la protéine était indétectable par western blot et la croissance du mutant s'arrêtait et s'inversait au bout de quelques jours, avant qu'il ne réverte par réexpression de l'ApoC1 après 20 jours d'induction. Le potentiel mitochondrial de ce mutant et d'un autre clone dont la croissance était très affectée, mesuré par cytométrie en flux en utilisant la sonde JC-1 (Molecular Probes®), était très affecté avant induction, et l'induction provoquait l'effondrement de ce potentiel.

La morphologie des cellules est profondément modifiée : elles deviennent plus fines que les cellules sauvages et s'allongent pour devenir jusqu'à une dizaine de fois plus longues que les

cellules sauvages. Le phénotype de croissance et la morphologie du double mutant $\Delta ach/^{ARNi}ASCT.i$, qui ne produit plus d'acétate, sont similaires à ceux du mutant $^{ARNi}ApoC1$. Les cellules s'allongent, ne se divisent plus après 13 jours d'induction mais ne meurent qu'après plusieurs semaines. Une analyse préliminaire du potentiel de membrane mitochondrial de ce double mutant a montré une diminution en fonction du temps d'induction. Ainsi, après 14 jours d'induction, lorsque l'ASCT n'est plus détectable par western blot, le potentiel de membrane mitochondrial s'effondre. Ces premiers résultats confortent notre hypothèse selon laquelle la production d'acétate contribuerait au maintien du potentiel de membrane de la mitochondrie puisque le mutant ne produisant plus d'acétate voit son potentiel de membrane diminué, de la même façon que le mutant du complexe III de la chaîne respiratoire. Suite à des problèmes d'adaptation et de réversion des mutants rencontrés après décongélation des lignées cellulaires, j'ai généré de nouveaux mutants $^{ARNi}ApoC1$, $^{ARNi}Rieske$ et $\Delta ach/^{ARNi}ASCT$. Bien que l'expression des protéines ciblées ne soit plus détectable par western blot et que j'ai retrouvé les mêmes phénotypes de croissance qu'auparavant pour ces différents mutants, je n'ai pas retrouvé la diminution du potentiel de membrane mitochondrial que nous avons observé auparavant. L'analyse de ces mutants devra se poursuivre en utilisant d'autres marqueurs de potentiel de membrane mitochondrial.

3.1.1 Formes sanguines

Chez la forme sanguine proliférative long-slender, le pyruvate est considéré depuis longtemps comme étant le seul produit du métabolisme glucidique (Clarkson and Brohn 1976, Visser and Opperdoes 1980). Cette forme du parasite est dépendante de la glycolyse pour la production d'ATP au niveau de la dernière étape de la voie de dégradation du glucose en pyruvate, catalysée par la pyruvate kinase cytosolique. Les traces d'autres produits finaux excrétés à partir de la dégradation du glucose rapportées lors de différentes études (Ryley 1956, Ryley 1962) sont souvent attribuées à la forme sanguine short-stumpy, forme non multiplicative dont le métabolisme est pré-adapté à l'environnement intestinal de l'insecte, qui peut "contaminer" même faiblement les cultures de long-slender (van Grinsven, Van Den Abbeele et al. 2009, Creek, Anderson et al. 2012). Cependant, une étude récente réalisée au laboratoire (Mazet, Morand et al. 2013) sur une souche long-slender monomorphe (427 90-13) ayant perdu la capacité de se différencier en forme short-stumpy, montre que l'acétate est produit par la forme long-slender et est essentielle à la survie du parasite.

La quantité d'acétate excrétée à partir du métabolisme du glucose est uniquement deux fois moins importante que chez la forme procyclique. Comme chez la forme présente chez l'insecte, les formes long-slender expriment l'ACH et l'ASCT, mais l'ASCT est beaucoup moins exprimée que chez la forme procyclique. Dans les années 70, des travaux ont montré que comme la forme procyclique, les formes sanguines pouvaient dégrader la thréonine en acétate (Linstead, Klein et al. 1977). Les analyses par RMN du proton à partir de [¹³C]-glucose et de thréonine effectuées par notre équipe sont en accord avec ce qui a été précédemment montré. En revanche, contrairement à la forme procyclique, la forme sanguine long-slender utilise préférentiellement le glucose à la thréonine pour produire l'acétate, lorsqu'ils sont en quantité équivalente dans le milieu de culture. Comme la quantité de glucose présente dans le sang de l'hôte mammifère est environ 30 fois supérieure à celle de la thréonine (5 mM *versus* 0,15 mM) (Creek, Nijagal et al. 2013, Ohnishi, Osaki et al. 2013), il est probable qu'*in vivo*, les formes sanguines utilisent principalement le glucose pour la production d'acétate. Comme chez la forme procyclique, le double mutant TDH/PDH est létal et ne produit plus d'acétate à partir du glucose et de la thréonine (les formes long-slender expriment également la TDH et la PDH). Par ailleurs, cette forme sanguine exprime aussi l'AceCS cytosolique, essentielle à la survie du parasite et à la biosynthèse *de novo* des acides gras. Ces résultats montrent que la production d'acétate chez la forme sanguine long-slender, bien que nettement inférieure à la production de pyruvate, est essentielle pour le parasite. De plus, cette forme utilise tout comme la forme procyclique une "navette acétate" pour transférer l'acétyl-CoA de la mitochondrie vers le cytosol pour initier la biosynthèse *de novo* des acides gras. Il est également à noter que la croissance du mutant Δtdh^{RNAi} PDH.i n'est pas restaurée par addition de 4 mM acétate dans le milieu de culture, suggérant que, comme pour la forme procyclique, la production mitochondriale d'acétate n'est pas uniquement essentielle pour la biosynthèse des lipides. Le mutant $\Delta asct$ de la souche 427 90-13 étant viable (M. Mazet et al., résultats non publiés), la production d'acétate ne semble pas essentielle pour la production mitochondriale d'ATP, et pourrait éventuellement contribuer à la génération du potentiel de membrane mitochondrial.

En conclusion, les formes long-slender et procyclique de *T. brucei* ont développé et maintenu les mêmes voies métaboliques pour la production mitochondriale d'acétate, qui est essentielle à la croissance de ces 2 formes parasitaires, pour la biosynthèse des acides gras, mais également pour au moins une autre fonction cellulaire qui reste à déterminer et à étudier. Notre principale hypothèse en cours d'investigation est son rôle dans la génération du potentiel de membrane mitochondrial.

3.2 Channeling mitochondrial ?

Comme nous l'avons discuté plus haut, nos résultats suggèrent que la voie mitochondriale de dégradation du glucose en acétate est impliquée dans la production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat dans ce compartiment, ce qui n'est pas le cas de la voie de dégradation de la thréonine. Nous avons évoqué l'hypothèse de deux channeling : l'un impliquant la PDH et l'ASCT pour la voie de dégradation du glucose et qui contribuerait à la production d'ATP par le cycle ASCT/SCoAS, et l'autre impliquant la TDH, l'AKCL et l'ACH pour la voie de dégradation de la thréonine et qui ne participerait pas à la production d'ATP. Le channeling (ou tunneling) métabolique est un mécanisme par lequel un intermédiaire réactionnel est directement transmis d'un site actif à un autre. Ces sites actifs peuvent être localisés dans différents domaines d'une enzyme multifonctionnelle ou d'un complexe multienzymatique, ou encore de différentes enzymes impliquées dans une même voie métaboliques. Plusieurs mécanismes de ce type ont été décrits. Le plus fréquemment rencontré se produit lorsqu'une cavité présente dans une enzyme permet la séquestration d'un intermédiaire et son déplacement vers les différents sites actifs de l'enzyme. C'est le cas de la tryptophane synthase (Hyde, Ahmed et al. 1988). Un autre mécanisme utilise un cofacteur pour le transfert du substrat vers les différents sites actifs, c'est le cas du complexe PDH qui utilise l'acide lipoïque comme cofacteur (Perham 2000). Un troisième mécanisme identifié fait intervenir des interactions électrostatiques de la surface de l'enzyme pour guider le substrat vers les différents sites actifs comme cela a été décrit pour le complexe dihydrofolate réductase-thymidylate synthase notamment de *Leishmania major* et *Toxoplasma gondii* (Knighton, Kan et al. 1994). Ce mécanisme est probablement impliqué dans les cas de channeling mitochondrial impliquant plusieurs enzymes d'une même voie métabolique. Le terme de métabolon a été proposé pour désigner ce type d'association (Robinson and Srere 1985). Le channeling présente de nombreux avantages, comme la diminution du temps des réactions, ou la prévention des risques de dégradation des substrats labiles ou d'éviter que les substrats réagissent avec d'autres substrats ou d'autres enzymes. Enfin, ce mécanisme permet également de fournir aux intermédiaires un environnement favorable (Ovádi 1991). La glycolyse est une succession de 10 réactions permettant la formation de pyruvate à partir de glucose. Si plusieurs études ont montré l'association de deux enzymes successives de la glycolyse, l'existence d'un métabolon pour cette voie n'a été décrit que chez les plantes où les 10 enzymes sont retrouvées solubles ou associées à la membrane mitochondriale chez *Arabidopsis* et les pommes de terre (Giegé, Heazlewood et al. 2003, Graham, Williams et al. 2007).

Ces études ont montré sur mitochondries isolées que cette voie est fonctionnelle. La formation du métabolite est alors un phénomène dynamique associé à la respiration mitochondriale : la stimulation de la respiration augmente la formation du métabolite, l'inhibition de la respiration diminue l'association. Le pyruvate produit lors de la glycolyse permet d'alimenter, après décarboxylation, le cycle de l'acide tricarboxylique et donc la respiration mitochondriale. Ainsi, la formation du métabolite des enzymes de la glycolyse pourrait être modulé en fonction des demandes de la mitochondrie (Degenring, Röhl et al. 2004). Il est à noter, que l'hypothèse du channeling des enzymes de la glycolyse dans les glycosomes de *T. brucei* a été avancée. Une étude publiée en 1981 a montré en utilisant du [U-¹⁴C]-glucose qu'il existe deux « pools » de métabolites issus de la glycolyse. L'un radio-marqué très rapidement (15 sec), représente 20 à 30% des intermédiaires de la glycolyse et correspond aux métabolites issus de la glycolyse effectuée dans les glycosomes. L'autre pool, radio-marqué plus lentement (14 min), représente 70 à 80% des métabolites cellulaires et correspond probablement aux intermédiaires de la glycolyse produits dans les glycosomes et diffusant dans le cytosol. Les auteurs en ont conclu que la membrane glycosomale est peu perméable pour les intermédiaires de la glycolyse (Visser, Opperdoes et al. 1981). Or, une étude a récemment montré que la membrane glycosomale possède des pores dont la taille permettrait le passage par simple diffusion des intermédiaires phosphorylés de la glycolyse (Gualdrón-López, Vapola et al. 2012). Par conséquent, l'hypothèse de la faible perméabilité de la membrane glycosomale aux intermédiaires de la glycolyse ne permet pas d'expliquer les données de marquage obtenues par Visser et al. (Visser, Opperdoes et al. 1981), alors qu'un channeling métabolique de la glycolyse serait compatible avec ces deux études. Cette dernière hypothèse a d'ailleurs été avancée en 1985 par Aman et al. en montrant par un procédé de cross-linking chimique introduisant des liaisons covalentes entre les protéines que les enzymes de la glycolyse sont très proches les unes des autres dans les glycosomes, et pourraient ainsi former un channeling métabolique de la glycolyse (Aman, Kenyon et al. 1985). Cependant, cette même équipe a ensuite écarté cette hypothèse en observant que le temps de latence entre l'ajout du glucose et l'oxydation du NADH par la glycérol-3-phosphate déhydrogénase n'est pas diminuée lorsque les enzymes glycolytiques isolées des glycosomes sont physiquement associées par cross-linking (Aman and Wang 1986). Les auteurs ont donc proposé que la forte concentration des enzymes de la glycolyse dans les glycosomes expliquerait leur cross-linking, sans qu'il y ait pour autant de channeling métabolique. Néanmoins, le channeling métabolique de la glycolyse chez les trypanosomes reste actuellement l'hypothèse la plus probable pour expliquer la relativement faible dispersion des intermédiaires glycolytiques.

Le channeling des enzymes du cycle TCA a par ailleurs été rapporté chez de nombreux organismes (Vélot, Mixon et al. 1997, Williams, Sweetlove et al. 2011).

Comment détecter les interactions entre les protéines ?

La mise en évidence d'un métabolite n'est pas évidente. Dans le cas des protéines impliquées dans la glycolyse, si la présence des enzymes de cette voie à la surface de la membrane mitochondriale chez certains organismes a pu être démontrée, ces études n'ont pas révélé d'interactions protéine-protéine (Giegé, Heazlewood et al. 2003, Graham, Williams et al. 2007). En effet, la mise en évidence de tels complexes dépend notamment de la force des liaisons entre les protéines. Il existe différentes techniques permettant la détection de telles interactions comme la co-immunoprécipitation avec ou sans cross-linking, le TAP-tagging (Tandem affinity purification), le système double-hybride, le FRET (fluorescence resonance energy transfer) ou encore l'utilisation de gels natifs (Berggård, Linse et al. 2007, Miernyk and Thelen 2008). La co-immunoprécipitation est considérée comme étant hautement spécifique puisque la technique repose sur la reconnaissance antigène-anticorps. Cependant, il n'est pas toujours facile d'obtenir un anticorps qui soit très spécifique et cette technique requiert des quantités importantes de protéines. Cette dernière approche peut-être optimisée, par exemple pour des interactions faibles ou transitoires entre les protéines, en introduisant des liaisons covalentes entre les protéines par cross-linking chimique. Ainsi, les protéines se situant à proximité se trouvent liées de façon stable, ce qui permet de détecter des interactions difficilement détectables par la co-immunoprécipitation classique. Les gels natifs sont faciles à mettre en place mais nécessitent des interactions assez fortes entre les protéines pour éviter la dissociation des complexes lors de la migration. Le TAP-tagging permet de réduire les interactions non spécifiques en utilisant deux étapes de purification. De plus cette technique permet d'isoler des complexes formés *in vivo* à partir de protéines maturées. Néanmoins, le fait de multiplier les purifications et l'implication de lavages assez stringents augmentent considérablement les risques de perdre les interactions faibles. Le système double-hybride est relativement simple à mettre en place et permet la détection de complexes faiblement liés. Mais cette approche ne permet la détection des interactions qu'entre deux protéines et génère beaucoup de faux positifs. Une alternative serait de mesurer les interactions entre deux partenaires protéiques en utilisant le FRET et la détection par microscopie à fluorescence. Cette technique permet de détecter la proximité de deux fluorophores, par transfert d'une partie de l'énergie émise par le fluorophore donneur (par exemple Cy3) excité à un fluorophore accepteur (par exemple Cy5) qui émettra à une longueur d'onde particulière.

Dans le cas de la détection d'interactions entre protéines, les deux fluorophores peuvent être fixés sur des anticorps secondaires dirigés contre les anticorps spécifiques des protéines étudiées. Il est possible de distinguer les protéines qui interagissent (observation du phénomène FRET) des simples co-localisations (s'il y a colocalisation des fluorescences détectées suite à l'excitation du donneur puis de l'accepteur mais pas de phénomène FRET). Ces différentes techniques présentent toutes des avantages et des inconvénients. Ainsi, quelque soit la méthode utilisée, il est important de confirmer l'interaction entre les protéines par d'autres techniques. Dans le cas qui nous intéresse ici et qui impliquerait un channeling des enzymes PDH-ASCT d'une part et TDH-AKCL-ACH d'autre part, les liaisons entre les protéines sont probablement faibles et transitoires. Nous envisageons donc dans un premier temps d'étudier les interactions entre ces protéines par co-immunoprécipitation après cross-linking chimique.

3.3 Les sources d'acétyl-CoA

Durant ma thèse, j'ai étudié les phénotypes de différents mutants impliqués dans les voies de dégradation du glucose et de la thréonine. Ainsi, nous avons vu que le double mutant $\Delta ach^{RNAi}ASCT.i$ est létal, car il ne peut plus convertir l'acétyl-CoA en acétate pour, entre autres, alimenter la biosynthèse *de novo* des acides gras (Millerioux, Morand et al. 2012). Le double mutant $\Delta pdh^{ARNi}TDH$ est également létal. Cependant, le simple mutant $^{RNAi}TDH.i$ est viable en absence de glucose et en présence de thréonine, et ne présente aucun phénotype de croissance (données non montrées), ce qui suggère qu'il existe une autre source d'acétyl-CoA qui permettrait la biosynthèse d'acétate en absence de glucose et d'une voie de dégradation fonctionnelle de la thréonine. La question qui se pose maintenant est quelle(s) est(sont) cette(ces) source(s) alternative(s) d'acétyl-CoA et quelle(s) voie(s) métabolique(s) emprunte(nt)-elle(s)? Cette analyse nécessite l'utilisation d'un milieu de culture dépourvu autant que possible de thréonine et de glucose, tel qu'un milieu préparé à partir du SDM79cons, afin de minimiser, voire d'abolir, la contribution de ces deux sources majeures d'acétyl-CoA. Or nous avons observé que la souche EATRO1125.T7T n'est pas capable de se multiplier dans le milieu SDM79cons sans glucose ni thréonine. Nous pouvons supposer que ce phénotype est dû à l'absence de thréonine pour la synthèse des protéines, car le parasite est probablement incapable de synthétiser cet acide aminé *de novo*, vu qu'il ne contient pas les gènes correspondants. En effet, cette même souche présente un retard de croissance important lorsque cultivée dans le milieu SDM79cons sans thréonine, en présence de glucose.

La croissance du parasite est alors restaurée par l'ajout de 15 μM de thréonine, ce qui est probablement suffisant pour la biosynthèse des protéines. Il s'avère que les simples mutants *RNAi*PDH.i et Δpdh ne sont pas viables dans un milieu où le seul apport de thréonine provient du SVF (15 μM), ce qui est en faveur d'une source de carbone alternative dont la voie de dégradation en acétyl-CoA passe par la PDH. Parmi toutes les sources de carbones produisant de l'acétyl-CoA *via* la PDH, la proline est de toute évidence la meilleure candidate. En présence de glucose, le métabolisme de la proline est réprimé mais en son absence la dégradation de la proline peut aboutir à la production d'acétate (Lamour, Rivière et al. 2005). Ces expériences de RMN du carbone ^{13}C , effectuées en absence de carbonate de sodium, avaient cependant montré que peu d'acétate était produit à partir de la proline par le parasite cultivé en absence de glucose (environ 5% des produits excrétés). Nous avons de nouveau effectué des analyses préliminaires par RMN du proton pour observer qu'en présence d'une quantité de carbonate de sodium équivalente à celle rencontrée dans le milieu de culture, la forme procyclique produit beaucoup d'acétate à partir de la proline, en absence de glucose. La proline serait donc la principale source alternative d'acétyl-CoA.

Il est cependant important de mentionner que d'autres sources de carbone pourraient être utilisées pour produire l'acétyl-CoA, sans l'implication de la PDH. Le génome de *T. brucei* contient des gènes potentiellement impliqués dans la β -oxydation qui permet de produire de l'acétyl-CoA à partir de la dégradation des acides gras, mais cette voie n'a pas été démontrée chez *T. brucei*. La forme promastigote de *Leishmania mexicana* produit de l'acétate à partir de l'aspartate (Saunders, Ng et al. 2011), mais cette voie n'a pas non plus été identifiée chez les trypanosomes. Les Leishmanies utilisent la leucine comme précurseur de la biosynthèse des stérols et cette voie, bien que moins active, a également été décrite chez *T. cruzi* (Ginger, Chance et al. 1999, Ginger, Prescott et al. 2000). Chez *T. brucei* cette voie n'a pas été caractérisée. Les voies de dégradation de la valine et de l'isoleucine ont été identifiées dans le génome de ce parasite et peuvent théoriquement aboutir à la production d'acétyl-CoA (Berriman, Ghedin et al. 2005). La première étape enzymatique des voies de dégradation de ces 2 acides aminés et de la leucine est commune et catalysée par la BCAT (branched-chain amino acid aminotransferase). Deux homologues de la BCAT ont été identifiés dans le génome de *T. brucei* (Tb927.2.4590 et Tb927.2.4610) (Berriman, Ghedin et al. 2005) et des analyses protéomiques ont révélé que ces protéines étaient exprimées chez les formes sanguines et la forme procyclique (Jones, Faldas et al. 2006, Vertommen, Van Roy et al. 2008, Urbaniak, Guther et al. 2012). Cependant, les voies de dégradation de ces acides aminés n'ont jusqu'à lors pas été explorées chez ce parasite. Enfin, nous avons vu que la radioactivité provenant de l'acétate est incorporée dans les stérols (Millerieux, Ebikeme et al. 2013).

D'après le modèle actuel, cela implique que l'acétate peut entrer dans la mitochondrie puis être converti en acétyl-CoA pour alimenter la voie de biosynthèse des stérols et la biosynthèse du précurseur des acides gras, le butyryl-CoA. Mais, la production d'acétyl-CoA dans la mitochondrie à partir d'acétate extracellulaire n'a pas été élucidée à ce jour.

3.4 Le précurseur de la biosynthèse des acides gras de la voie des élongases

En 2000, Morita et al. ont montré que le butyryl-CoA est le précurseur de la biosynthèse des acides gras chez les trypanosomes (Morita, Paul et al. 2000). Cependant, les étapes enzymatiques permettant la production du butyryl-CoA ainsi que le compartiment cellulaire impliqué, ne sont à l'heure actuelle pas connus. Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à la dernière étape catalysée par l'IVDH de la voie hypothétique reconstituée à partir de l'acétyl-CoA, en utilisant les données du génome. Nos résultats préliminaires sont en accord avec l'implication de cette enzyme mitochondriale dans la voie de biosynthèse du butyryl-CoA. La caractérisation de cette enzyme et l'analyse de cette voie de biosynthèse devront se poursuivre comme nous l'avons discuté plus haut en optimisant l'inhibition de l'IVDH (ARNi en utilisant d'autres vecteurs et/ou KO), en obtenant des anticorps plus spécifiques, en déterminant l'activité enzymatique de l'IVDH et également en caractérisant les autres enzymes de la voie de biosynthèse du butyryl-CoA à partir de l'acétyl-CoA.

Afin d'alimenter la biosynthèse des acides gras, le butyryl-CoA produit dans la mitochondrie doit quitter cet organelle pour rejoindre le réticulum endoplasmique et le système élongases. Ce métabolite sous sa forme CoA ne peut pas traverser la membrane mitochondriale librement. Dès lors, le butyryl-CoA doit utiliser un système de transport ou d'échange lui permettant de rejoindre le cytosol. Pour ce faire, deux systèmes de transfert peuvent théoriquement exister chez les trypanosomes, une "navette butyrate" comparable à la "navette acétate" décrite chez *T. brucei* et un système d'échange impliquant la carnitine (système acyl-carnitine transférase). L'hypothétique "navette butyrate" nécessiterait une enzyme mitochondriale permettant la conversion du butyryl-CoA en butyrate et une enzyme cytosolique effectuant la réaction inverse. Dans la mitochondrie, la première étape de cette navette pourrait être catalysée par l'ACH, car nous avons montré que cette enzyme est capable d'hydrolyser les acyl-CoA en C4 dont le butyryl-CoA (Millerieux, Morand et al. 2012).

L'activité détectée avec ce substrat est d'ailleurs plus importante qu'avec l'acétyl-CoA. Si l'ACH est utilisée dans cette navette, il existe une alternative puisqu'il n'y a pas de diminution de la biosynthèse d'acides gras à partir du glucose, de thréonine ou d'acétate dans le mutant *Δach*. Les données récentes obtenues par l'équipe de Kiyoshi Kita (Université de Tokyo, Japon) avec laquelle nous collaborons, suggèrent que l'ASCT n'est pas un bon candidat pour cette alternative, bien que l'ASCT soit apparentée à la SCOT qui utilise comme substrats les acyl-CoA en C4, tels que l'acétoacétyl-CoA. En effet, l'étude de l'activité enzymatique et de la spécificité de substrat de l'ASCT ont pu être déterminées à partir de l'enzyme de *T. brucei* exprimée dans *E. coli* BL21star(DE3) en utilisant un nouveau test d'activité nettement plus sensible que celui utilisé précédemment (Van Hellemond, Opperdoes et al. 1998). Ce test repose sur les réactions du cycle ASCT/SCoAS présent dans la mitochondrie de *T. brucei*. L'ASCT transfère le groupement CoA de l'acétyl-CoA sur le succinate pour produire du succinyl-CoA et de l'acétate. Le succinyl-CoA est alors converti en succinate et CoA-SH par la succinyl-CoA synthase. Le groupement thiol du CoA-SH réagit avec le DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)) pour former du TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid) dont on la formation est mesurée par spectrophotométrie à 412 nm. Grâce à ce test, l'équipe de Kiyoshi Kita a montré que l'ASCT est spécifique des acyl-CoA en C2 (acétyl-CoA) et n'utilise pas comme substrats les acyl-CoA en C4, dont le butyryl-CoA (activité non détectable, au moins 1000 fois inférieure à celle mesurée avec l'acétyl-CoA). L'ASCT n'interviendrait donc probablement pas dans l'hypothétique navette butyrate. Cette équipe a également montré que l'ASCT est organisée en octamères (données non publiées). Le même travail de caractérisation est actuellement effectué par l'équipe japonaise pour l'AceCS. Dans le cytosol, l'AceCS pourrait convertir le butyrate en butyryl-CoA et ainsi intervenir dans la navette butyrate. Comme l'acétate, le butyrate est un acide faible lipophile sous sa forme protonée. Il pourrait donc traverser la membrane mitochondriale par simple diffusion pour rejoindre le cytosol puis le réticulum endoplasmique. La deuxième possibilité pour transférer le butyryl-CoA produit dans la mitochondrie vers le cytosol serait le système acyl-carnitine transférase, comparable à celui décrit chez de nombreux eucaryotes (Strijbis, Vaz et al. 2010). Dans ce système, une acyl-carnitine transférase de la membrane interne de la mitochondrie permettrait de transférer le groupement butyryl du butyryl-CoA sur la carnitine. Un transporteur permettrait ensuite au butyryl-carnitine de traverser la membrane mitochondriale. Le butyryl-carnitine serait enfin converti en butyryl-CoA par une acyl-carnitine transférase dans le cytosol. Trois gènes codant pour une protéine apparentée à la famille des carnitine-O palmitoyltransférases ont été identifiés dans le génome de *T. brucei*.

Les protéines correspondants à deux de ces gènes ont été retrouvées dans le protéome de la mitochondrie de la forme procyclique (Tb927.3.3900 et Tb927.7.2250) (Panigrahi, Ogata et al. 2009) et possèdent une séquence d'adressage à la mitochondrie d'après le programme MitoprotII (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>). La troisième protéine (Tb927.8.590) a été retrouvée dans le protéome des glycosomes (Colasante et al, 2006, et résultats du laboratoire non publiés) et se termine par le signal d'adressage peroxisomal PTS1 canonique (SKL). Le génome de *T. brucei* contient un gène correspondant à la carnitine-O acétyltransférase (Tb927.11.2230), dont la protéine correspondante possède un éventuel signal d'adressage peroxysomal PTS1 (PNL). Cependant, cette protéine n'a pas été retrouvée dans le protéome des glycosomes (Colasante et al, 2006, et résultats du laboratoire non publiés), et pourrait être la composante cytosolique de l'éventuel système acyl-carnitine transférase. Aucune de ces protéines n'a jusqu'alors été étudiée.

IV - BIBLIOGRAPHIE

Aceti, D. J. and J. G. Ferry (1988). "Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. Evidence for regulation of synthesis." J Biol Chem **263**(30): 15444-15448.

Adl, S. M., A. G. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel and M. F. Taylor (2005). "The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists." J Eukaryot Microbiol **52**(5): 399-451.

Agabian, N. (1990). "Trans splicing of nuclear pre-mRNAs." Cell **61**(7): 1157-1160.

Aksoy, S., W. C. Gibson and M. J. Lehane (2003). "Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis." Advances in parasitology **53**: 1-83.

Alexeieff, A. (1917). "Mitochondries et corps parabasal chez les flagellés." Comptes Rendus de la Société de Biologie **80**: 358-361.

Allmann, S., P. Morand, C. Ebikeme, L. Gales, M. Biran, J. Hubert, A. Brennand, M. Mazet, J. M. Franconi, P. A. Michels, J. C. Portais, M. Boshart and F. Bringaud (2013). "Cytosolic NADPH homeostasis in glucose-starved procyclic *Trypanosoma brucei* relies on malic enzyme and the pentose phosphate pathway fed by gluconeogenic flux." J Biol Chem **288**(25): 18494-18505.

Alsford, S., B. Wickstead, K. Ersfeld and K. Gull (2001). "Diversity and dynamics of the minichromosomal karyotype in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **113**(1): 79-88.

Aman, R. A., G. L. Kenyon and C. C. Wang (1985). "Cross-linking of the enzymes in the glycosome of *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **260**(11): 6966-6973.

Aman, R. A. and C. C. Wang (1986). "Absence of substrate channeling in the glycosome of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **19**(1): 1-10.

Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." Nature **431**(7006): 350-355.

Anderson, S. A., V. Carter, C. B. Hagen and M. Parsons (1998). "Molecular cloning of the glycosomal malate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **96**(1-2): 185-189.

Aphasizhev, R. and I. Aphasizheva (2011). "Mitochondrial RNA processing in trypanosomes." Res Microbiol **162**(7): 655-663.

Aslett, M., C. Aurrecochea, M. Berriman, J. Brestelli, B. P. Brunk, M. Carrington, D. P. Depledge, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, M. J. Gardner, A. Gingle, G. Grant, O. S. Harb, M. Heiges, C. Hertz-Fowler, R. Houston, F. Innamorato, J. Iodice, J. C. Kissinger, E. Kraemer, W. Li, F. J. Logan, J. A. Miller, S. Mitra, P. J. Myler, V. Nayak, C. Pennington, I. Phan, D. F. Pinney, G. Ramasamy, M. B. Rogers, D. S. Roos, C. Ross, D. Sivam, D. F. Smith, G. Srinivasamoorthy, C. J. Stoeckert, S. Subramanian, R. Thibodeau, A. Tivey, C. Treatman, G. Velarde and H. Wang (2010). "TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D457-462.

- Atteia, A., R. van Lis, G. Gelius-Dietrich, A. Adrait, J. Garin, J. Joyard, N. Rolland and W. Martin (2006). "Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas mitochondria*." J Biol Chem **281**(15): 9909-9918.
- Aubry, P. (2010). "Trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil."
- Autio, K. J., J. L. Guler, A. J. Kastaniotis, P. T. Englund and J. K. Hiltunen (2008). "The 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase of mitochondrial fatty acid synthesis in *Trypanosoma brucei*." FEBS Lett **582**(5): 729-733.
- Azema, L., S. Claustre, I. Alric, C. Blonski, M. Willson, J. Perie, T. Baltz, E. Tetaud, F. Bringaud, D. Cottem, F. R. Opperdoes and M. P. Barrett (2004). "Interaction of substituted hexose analogues with the *Trypanosoma brucei* hexose transporter." Biochem Pharmacol **67**(3): 459-467.
- Barnes, R. L., H. Shi, N. G. Kolev, C. Tschudi and E. Ullu (2012). "Comparative genomics reveals two novel RNAi factors in *Trypanosoma brucei* and provides insight into the core machinery." PLoS Pathog **8**(5): e1002678.
- Barrett, J., G. C. Coles and K. G. Simpkin (1978). "Pathways of acetate and propionate production in adult *Fasciola hepatica*." Int J Parasitol **8**(2): 117-123.
- Barrett, M. P. (1997). "The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa." Parasitol Today **13**(1): 11-16.
- Barrett, M. P., E. Tetaud, A. Seyfang, F. Bringaud and T. Baltz (1998). "Trypanosome glucose transporters." Mol Biochem Parasitol **91**(1): 195-205.
- Barry, J. D. (1997). "The relative significance of mechanisms of antigenic variation in African trypanosomes." Parasitol Today **13**(6): 212-218.
- Bateman, K. S., E. R. Brownie, W. T. Wolodko and M. E. Fraser (2002). "Structure of the mammalian CoA transferase from pig heart." Biochemistry **41**(49): 14455-14462.
- Benne, R., J. Van den Burg, J. P. Brakenhoff, P. Sloof, J. H. Van Boom and M. C. Tromp (1986). "Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA." Cell **46**(6): 819-826.
- Berberof, M., A. Pays, S. Lips, P. Tebabi and E. Pays (1996). "Characterization of a transcription terminator of the procyclin PARP A unit of *Trypanosoma brucei*." Mol Cell Biol **16**(3): 914-924.
- Berens, R. L., E. C. Krug and J. J. Marr (1995). Purine and pyrimidine metabolism. Biochemistry of Parasitic Organisms and its Molecular Foundations. J. J. Marr and M. Muller. New York, Academic Press: 89-117.
- Berggård, T., S. Linse and P. James (2007). "Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions." Proteomics **7**(16): 2833-2842.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-366.
- Berriman, M., E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, G. Blandin, H. Renault, D. C. Bartholomeu, N. J. Lennard, E. Caler, N. E. Hamlin, B. Haas, U. Bohme, L. Hannick, M. A. Aslett, J. Shallom,

L. Marcello, L. Hou, B. Wickstead, U. C. Alsmark, C. Arrowsmith, R. J. Atkin, A. J. Barron, F. Bringaud, K. Brooks, M. Carrington, I. Cherevach, T. J. Chillingworth, C. Churcher, L. N. Clark, C. H. Corton, A. Cronin, R. M. Davies, J. Doggett, A. Djikeng, T. Feldblyum, M. C. Field, A. Fraser, I. Goodhead, Z. Hance, D. Harper, B. R. Harris, H. Hauser, J. Hostetler, A. Ivens, K. Jagels, D. Johnson, J. Johnson, K. Jones, A. X. Kerhornou, H. Koo, N. Larke, S. Landfear, C. Larkin, V. Leech, A. Line, A. Lord, A. Macleod, P. J. Mooney, S. Moule, D. M. Martin, G. W. Morgan, K. Mungall, H. Norbertczak, D. Ormond, G. Pai, C. S. Peacock, J. Peterson, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, M. A. Rajandream, C. Reitter, S. L. Salzberg, M. Sanders, S. Schobel, S. Sharp, M. Simmonds, A. J. Simpson, L. Tallon, C. M. Turner, A. Tait, A. R. Tivey, S. Van Aken, D. Walker, D. Wanless, S. Wang, B. White, O. White, S. Whitehead, J. Woodward, J. Wortman, M. D. Adams, T. M. Embley, K. Gull, E. Ullu, J. D. Barry, A. H. Fairlamb, F. Opperdoes, B. G. Barrell, J. E. Donelson, N. Hall, C. M. Fraser, S. E. Melville and N. M. El-Sayed (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." Science **309**: 416-422.

Besteiro, S., M. Biran, N. Biteau, V. Coustou, T. Baltz, P. Canioni and F. Bringaud (2002). "Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase." J Biol Chem **277**(41): 38001-38012.

Bittar, E. E. and N. Bittar (1996). Principles of medical biology. Vol.4, Cell chemistry and physiology. Part II. Greenwich, Connecticut, JAI Press Inc.

Blum, B., N. Bakalara and L. Simpson (1990). "A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information." Cell **60**(2): 189-198.

Bochud-Allemann, N. and A. Schneider (2002). "Mitochondrial substrate level phosphorylation is essential for growth of procyclic *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **277**(36): 32849-32854.

Booth, I. R. (1985). "Regulation of cytoplasmic pH in bacteria." Microbiol Rev **49**(4): 359-378.

Borst, P. and A. H. Fairlamb (1998). "Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*." Annu Rev Microbiol **52**: 745-778.

Bringaud, F., D. Baltz and T. Baltz (1998). "Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**: 7963-7968.

Bringaud, F., M. P. Barrett and D. Zilberstein (2012). "Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids." Front Biosci (Landmark Ed) **17**: 349-374.

Bringaud, F., L. Rivière and V. Coustou (2006). "Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources." Mol Biochem Parasitol **149**(1): 1-9.

Brody, S., C. Oh, U. Hoja and E. Schweizer (1997). "Mitochondrial acyl carrier protein is involved in lipoic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **408**(2): 217-220.

Brun, R. and Schönenberger (1979). "Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication." Acta Trop **36**(3): 289-292.

- Bursell, E., K. J. Billing, J. W. Hargrove, C. T. McCabe and E. Slack (1973). "The supply of substrates to the flight muscle of tsetse flies." Trans R Soc Trop Med Hyg **67**(2): 296.
- Carrero-Lerida, J., G. Perez-Moreno, V. M. Castillo-Acosta, L. M. Ruiz-Perez and D. Gonzalez-Pacanowska (2009). "Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*." Int J Parasitol **39**(3): 307-314.
- Chaudhuri, M., W. Ajayi and G. C. Hill (1998). "Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase." Mol Biochem Parasitol **95**(1): 53-68.
- Chen, C. Z., L. Li, H. F. Lodish and D. P. Bartel (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." Science **303**(5654): 83-86.
- Chen, Y., C. H. Hung, T. Burdener and G. S. Lee (2003). "Development of RNA interference revertants in *Trypanosoma brucei* cell lines generated with a double stranded RNA expression construct driven by two opposing promoters." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 275-279.
- Chohnan, S., H. Izawa, H. Nishihara and Y. Takamura (1998). "Changes in size of intracellular pools of coenzyme A and its thioesters in *Escherichia coli* K-12 cells to various carbon sources and stresses." Biosci Biotechnol Biochem **62**(6): 1122-1128.
- Clarkson, A. B., E. J. Bienen, G. Pollakis and R. W. Grady (1989). "Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase." J Biol Chem **264**(30): 17770-17776.
- Clarkson, A. B., Jr. and F. H. Brohn (1976). "Trypanosomiasis: an approach to chemotherapy by the inhibition of carbohydrate catabolism." Science **194**(4261): 204-206.
- Clayton, A. M., J. L. Guler, M. L. Povelones, E. Gluenz, K. Gull, T. K. Smith, R. E. Jensen and P. T. Englund (2011). "Depletion of mitochondrial acyl carrier protein in bloodstream-form *Trypanosoma*." Eukaryot Cell **10**(3): 286-292.
- Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." EMBO J **21**(8): 1881-1888.
- Colasante, C., M. Ellis, T. Ruppert and F. Voncken (2006). "Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form *Trypanosoma brucei brucei*." Proteomics **6**(11): 3275-3293.
- Colasante, C., A. Robles, C. H. Li, A. Schwede, C. Benz, F. Voncken, D. L. Guilbride and C. Clayton (2007). "Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **151**(2): 193-204.
- Coppens, I. and P. J. Courtoy (1995). "Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **73**(1-2): 179-188.
- Coppens, I. and P. J. Courtoy (2000). "The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments." Annu Rev Microbiol **54**: 129-156.
- Coppens, I., T. Levade and P. J. Courtoy (1995). "Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **270**(11): 5736-5741.

Coustou, V., S. Besteiro, M. Biran, P. Diolez, V. Bouchaud, P. Voisin, P. A. Michels, P. Canioni, T. Baltz and F. Bringaud (2003). "ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level is essential, but not oxidative phosphorylation." J Biol Chem **278**(49): 49625-49635.

Coustou, V., S. Besteiro, L. Rivière, M. Biran, N. Biteau, J. M. Franconi, M. Boshart, T. Baltz and F. Bringaud (2005). "A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **280**(17): 16559-16570.

Coustou, V., M. Biran, S. Besteiro, L. Riviere, T. Baltz, J. M. Franconi and F. Bringaud (2006). "Fumarate is an essential intermediary metabolite produced by the procyclic *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **281**(37): 26832-26846.

Coustou, V., M. Biran, M. Breton, F. Guegan, L. Rivière, N. Plazolles, D. Nolan, M. P. Barrett, J. M. Franconi and F. Bringaud (2008). "Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **283**(24): 16342-16354.

Coustou, V., M. Biran, M. Breton, F. Guegan, L. Rivière, N. Plazolles, D. Nolan, M. P. Barrett, J. M. Franconi and F. Bringaud (2008). "Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **283**(24): 16342-16354.

Crabtree, B., M. J. Gordon and S. L. Christie (1990). "Measurement of the rates of acetyl-CoA hydrolysis and synthesis from acetate in rat hepatocytes and the role of these fluxes in substrate cycling." Biochem J **270**(1): 219-225.

Creek, D. J., J. Anderson, M. J. McConville and M. P. Barrett (2012). "Metabolomic analysis of trypanosomatid protozoa." Mol Biochem Parasitol **181**(2): 73-84.

Creek, D. J., B. Nijagal, D. H. Kim, F. Rojas, K. R. Matthews and M. P. Barrett (2013). "Metabolomics guides rational development of a simplified cell culture medium for drug screening against *Trypanosoma brucei*." Antimicrob Agents Chemother **57**(6): 2768-2779.

Cronín, C. N., D. P. Nolan and H. P. Voorheis (1989). "The enzymes of the classical pentose phosphate pathway display differential activities in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*." FEBS Lett **244**(1): 26-30.

Cross, G. A., R. A. Klein and D. J. Linstead (1975). "Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate." Parasitology **71**(2): 311-326.

Czichos, J., C. Nonnengaesser and P. Overath (1986). "*Trypanosoma brucei*: cis-aconitate and temperature reduction as triggers of synchronous transformation of bloodstream to procyclic trypomastigotes in vitro." Exp Parasitol **62**(2): 283-291.

da Cunha, J. P., E. S. Nakayasu, I. C. de Almeida and S. Schenkman (2006). "Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4." Mol Biochem Parasitol **150**(2): 268-277.

Dale, R. A. (1978). "Catabolism of threonine in mammals by coupling of L-threonine 3-dehydrogenase with 2-amino-3-oxobutyrate-CoA ligase." Biochim Biophys Acta **544**(3): 496-503.

- DaRocha, W. D., K. Otsu, S. M. Teixeira and J. E. Donelson (2004). "Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **133**(2): 175-186.
- de Mata, Z. S., B. deBruyn and H. J. Saz (1997). "Acetyl-CoA hydrolase activity and function in *Ascaris suum* muscle mitochondria." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **116**(3): 379-383.
- Dean, S., R. Marchetti, K. Kirk and K. R. Matthews (2009). "A surface transporter family conveys the trypanosome differentiation signal." Nature **459**(7244): 213-217.
- Degenring, D., M. Röhl and A. M. Uhrmacher (2004). "Discrete event, multi-level simulation of metabolite channeling." Biosystems **75**(1-3): 29-41.
- Dixon, H., C. D. Ginger and J. Williamson (1971). "The lipid metabolism of blood and culture forms of *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma rhodesiense*." Comp Biochem Physiol B **39**(2): 247-266.
- Dixon, H. and J. Williamson (1970). "The lipid composition of blood and culture forms of *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma rhodesiense* compared with that of their environment." Comp Biochem Physiol **33**(1): 111-128.
- Docampo, R., W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff and S. N. Moreno (2005). "Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man." Nat Rev Microbiol **3**(3): 251-261.
- Dougherty, W. G. and T. D. Parks (1995). "Transgenes and gene suppression: telling us something new?" Curr Opin Cell Biol **7**(3): 399-405.
- Duffieux, F., J. Van Roy, P. A. Michels and F. R. Opperdoes (2000). "Molecular characterization of the first two enzymes of the pentose-phosphate pathway of *Trypanosoma brucei*. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconolactonase." J Biol Chem **275**(36): 27559-27565.
- Dunbar, D. A., A. A. Chen, S. Wormsley and S. J. Baserga (2000). "The genes for small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* are organized in clusters and are transcribed as a polycistronic RNA." Nucleic Acids Res **28**(15): 2855-2861.
- Durand-Dubief, M. and P. Bastin (2003). "TbAGO1, an argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*." BMC Biol **1**: 2.
- Durieux, P. O., P. Schutz, R. Brun and P. Kohler (1991). "Alterations in Krebs cycle enzyme activities and carbohydrate catabolism in two strains of *Trypanosoma brucei* during in vitro differentiation of their bloodstream to procyclic stages." Mol Biochem Parasitol **45**(1): 19-27.
- Ebikeme, C., J. Hubert, M. Biran, G. Gouspillou, P. Morand, N. Plazolles, F. Guegan, P. Dirolez, J. M. Franconi, J. C. Portais and F. Bringaud (2010). "Ablation of succinate production from glucose metabolism in the procyclic trypanosomes induces metabolic switches to the glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate shuttle and to proline metabolism." J Biol Chem **285**(42): 32312-32324.
- Ebikeme, C. E., L. Peacock, V. Coustou, L. Riviere, F. Bringaud, W. C. Gibson and M. P. Barrett (2008). "N-acetyl D-glucosamine stimulates growth in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* by inducing a metabolic shift." Parasitology **135**(5): 585-594.

- El-Sayed, N. M., P. Hegde, J. Quackenbush, S. E. Melville and J. E. Donelson (2000). "The African trypanosome genome." Int J Parasitol **30**(4): 329-345.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, G. Blandin, M. Berriman, J. Crabtree, G. Aggarwal, E. Caler, H. Renauld, E. A. Worthey, C. Hertz-Fowler, E. Ghedin, C. Peacock, D. C. Bartholomeu, B. J. Haas, A. N. Tran, J. R. Wortman, U. C. Alsmark, S. Angiuoli, A. Anupama, J. Badger, F. Bringaud, E. Cadag, J. M. Carlton, G. C. Cerqueira, T. Creasy, A. L. Delcher, A. Djikeng, T. M. Embley, C. Hauser, A. C. Ivens, S. K. Kummerfeld, J. B. Pereira-Leal, D. Nilsson, J. Peterson, S. L. Salzberg, J. Shallom, J. C. Silva, J. Sundaram, S. Westenberger, O. White, S. E. Melville, J. E. Donelson, B. Andersson, K. D. Stuart and N. Hall (2005). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." Science **309**(5733): 404-409.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-498.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." EMBO J **20**(23): 6877-6888.
- Engstler, M. and M. Boshart (2004). "Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*." Genes Dev **18**(22): 2798-2811.
- Ersfeld, K. (2011). "Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in *Trypanosoma brucei*." Res Microbiol **162**(6): 626-636.
- Ersfeld, K., S. E. Melville and K. Gull (1999). "Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*." Parasitol Today **15**(2): 58-63.
- Evans, D. A. and R. C. Brown (1972). "The utilization of glucose and proline by culture forms of *Trypanosoma brucei*." J Protozool **19**(4): 686-690.
- Fang, J. and D. S. Beattie (2002). "Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria." Mol Biochem Parasitol **123**(2): 135-142.
- Fantoni, A., A. O. Dare and C. Tschudi (1994). "RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements." Mol Cell Biol **14**(3): 2021-2028.
- Ferella, M., Z. H. Li, B. Andersson and R. Docampo (2008). "Farnesyl diphosphate synthase localizes to the cytoplasm of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*." Exp Parasitol **119**(2): 308-312.
- Ferguson, M. A. and G. A. Cross (1984). "Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein." J Biol Chem **259**(5): 3011-3015.
- Figueiredo, L. M., G. A. Cross and C. J. Janzen (2009). "Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block." Nat Rev Microbiol **7**(7): 504-513.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.

- Ford, W. C. and I. B. Bowman (1973). "Metabolism of proline by the culture midgut form of *Trypanosoma rhodesiense*." Trans R Soc Trop Med Hyg **67**(2): 257.
- Fox, D. K., N. D. Meadow and S. Roseman (1986). "Phosphate transfer between acetate kinase and enzyme I of the bacterial phosphotransferase system." J Biol Chem **261**(29): 13498-13503.
- Fukao, T., G. D. Lopaschuk and G. A. Mitchell (2004). "Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **70**(3): 243-251.
- Fung, K. and C. Clayton (1991). "Recognition of a peroxisomal tripeptide entry signal by the glycosomes of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **45**(2): 261-264.
- Furuya, T., P. Kessler, A. Jardim, A. Schnauffer, C. Crudder and M. Parsons (2002). "Glucose is toxic to glycosome-deficient trypanosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14177-14182.
- Galvani, A. and L. Sperling (2001). "Transgene-mediated post-transcriptional gene silencing is inhibited by 3' non-coding sequences in *Paramecium*." Nucleic Acids Res **29**(21): 4387-4394.
- Giegé, P., J. L. Heazlewood, U. Roessner-Tunali, A. H. Millar, A. R. Fernie, C. J. Leaver and L. J. Sweetlove (2003). "Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells." Plant Cell **15**(9): 2140-2151.
- Gilbert, R. J., R. A. Klein and P. G. Miller (1983). "The role of threonine in the metabolism of acetyl coenzyme a by *Trypanosoma brucei brucei*." Comp Biochem Physiol B **74**(2): 277-281.
- Ginger, M. L., M. L. Chance and L. J. Goad (1999). "Elucidation of carbon sources used for the biosynthesis of fatty acids and sterols in the trypanosomatid *Leishmania mexicana*." Biochem J **342**: 397-405.
- Ginger, M. L., M. C. Prescott, D. G. Reynolds, M. L. Chance and L. J. Goad (2000). "Utilization of leucine and acetate as carbon sources for sterol and fatty acid biosynthesis by Old and New World *Leishmania* species, *Endotrypanum monterogeii* and *Trypanosoma cruzi*." Eur J Biochem **267**: 2555-2566.
- Girard, A. and G. J. Hannon (2008). "Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control." Trends Cell Biol **18**(3): 136-148.
- Graham, J. W., T. C. Williams, M. Morgan, A. R. Fernie, R. G. Ratcliffe and L. J. Sweetlove (2007). "Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling." Plant Cell **19**(11): 3723-3738.
- Green, H. P., M. Del Pilar Molina Portela, E. N. St Jean, E. B. Lugli and J. Raper (2003). "Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor." J Biol Chem **278**(1): 422-427.
- Gruszynski, A. E., A. DeMaster, N. M. Hooper and J. D. Bangs (2003). "Surface coat remodeling during differentiation of *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **278**(27): 24665-24672.

- Gualdrón-López, M., M. H. Vapola, I. J. Miinalainen, J. K. Hiltunen, P. A. Michels and V. D. Antonenkov (2012). "Channel-forming activities in the glycosomal fraction from the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*." PLoS One **7**(4): e34530.
- Guerra, D. G., A. Decottignies, B. M. Bakker and P. A. Michels (2006). "The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania* spp." Mol Biochem Parasitol **149**(2): 155-169.
- Guler, J. L., E. Kriegova, T. K. Smith, J. Lukes and P. T. Englund (2008). "Mitochondrial fatty acid synthesis is required for normal mitochondrial morphology and function in *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol **67**(5): 1125-1142.
- Gull, K. (2003). "Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies." Curr Opin Microbiol **6**(4): 365-370.
- Günzl, A. (2010). "The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified?" Eukaryot Cell **9**(8): 1159-1170.
- Haanstra, J. R., A. van Tuijl, J. van Dam, W. van Winden, A. G. Tielens, J. J. van Hellemond and B. M. Bakker (2012). "Proliferating bloodstream-form *Trypanosoma brucei* use a negligible part of consumed glucose for anabolic processes." Int J Parasitol **42**(7): 667-673.
- Hajduk, S. and T. Ochsenreiter (2010). "RNA editing in kinetoplastids." RNA Biol **7**(2): 229-236.
- Hall, C. L. (1978). "Acyl-CoA dehydrogenases and electron-transferring flavoprotein." Methods Enzymol **53**: 502-518.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-952.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach and G. J. Hannon (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." Nature **404**(6775): 293-296.
- Hannaert, V., F. Bringaud, F. R. Opperdoes and P. A. Michels (2003). "Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida." Kinetoplastid. Biol. Dis. **2**: 1-30.
- Hart, D. T., O. Misset, S. W. Edwards and F. R. Opperdoes (1984). "A comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* bloodstream form and cultured procyclic trypomastigotes." Mol Biochem Parasitol **12**(1): 25-35.
- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet **5**(7): 522-531.
- Heise, N. and F. R. Opperdoes (1999). "Purification, localisation and characterisation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **99**(1): 21-32.
- Heise, N. and F. R. Opperdoes (2000). "Localisation of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the mitochondrial matrix of *Trypanosoma brucei* procyclics." Z Naturforsch C **55**(5-6): 473-477.

- Helfert, S., A. M. Estévez, B. Bakker, P. Michels and C. Clayton (2001). "Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*." Biochem J **357**(Pt 1): 117-125.
- Hesslinger, C., S. A. Fairhurst and G. Sawers (1998). "Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate." Mol Microbiol **27**(2): 477-492.
- Holms, H. (1996). "Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Rev **19**(2): 85-116.
- Holms, W. H. (1986). "The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate." Curr Top Cell Regul **28**: 69-105.
- Horn, D. (2001). "Nuclear gene transcription and chromatin in *Trypanosoma brucei*." Int J Parasitol **31**(11): 1157-1165.
- Horváth, A., E. Horáková, P. Dunajčíková, Z. Verner, E. Pravdová, I. Slapetová, L. Cuninková and J. Lukes (2005). "Downregulation of the nuclear-encoded subunits of the complexes III and IV disrupts their respective complexes but not complex I in procyclic *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol **58**: 116-130.
- Hunt, M. C. and S. E. Alexson (2008). "Novel functions of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases as auxiliary enzymes in peroxisomal lipid metabolism." Prog Lipid Res **47**(6): 405-421.
- Hunt, M. C., J. Ruiters, P. Mooyer, C. W. van Roermond, R. Ofman, L. Ijlst and R. J. Wanders (2005). "Identification of fatty acid oxidation disorder patients with lowered acyl-CoA thioesterase activity in human skin fibroblasts." Eur J Clin Invest **35**(1): 38-46.
- Hunt, M. C., J. Yamada, L. J. Maltais, M. W. Wright, E. J. Podesta and S. E. Alexson (2005). "A revised nomenclature for mammalian acyl-CoA thioesterases/hydrolases." J Lipid Res **46**(9): 2029-2032.
- Hyde, C. C., S. A. Ahmed, E. A. Padlan, E. W. Miles and D. R. Davies (1988). "Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*." J Biol Chem **263**(33): 17857-17871.
- Igoillo-Esteve, M., D. Maugeri, A. L. Stern, P. Beluardi and J. J. Cazzulo (2007). "The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease." An Acad Bras Cienc **79**(4): 649-663.
- Ikeda, Y. and K. Tanaka (1983). "Purification and characterization of isovaleryl coenzyme A dehydrogenase from rat liver mitochondria." J Biol Chem **258**(2): 1077-1085.
- Inbar, E., D. Schlisselberg, M. Suter Grotemeyer, D. Rentsch and D. Zilberstein (2013). "A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses." Biochem J **449**(2): 555-566.
- Jackman, S. A., M. J. Danson, D. W. Hough and K. J. Stevenson (1990). "Dihydrolipoamide dehydrogenase and lipoic acid in *Trypanosoma brucei*." Biochem Soc Trans **18**(5): 863.

- Jackowski, S. and C. O. Rock (1981). "Regulation of coenzyme A biosynthesis." J Bacteriol **148**(3): 926-932.
- Jakobsson, A., R. Westerberg and A. Jacobsson (2006). "Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism." Prog Lipid Res **45**(3): 237-249.
- Janzen, C. J., J. P. Fernandez, H. Deng, R. Diaz, S. B. Hake and G. A. Cross (2006). "Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*." FEBS Lett **580**(9): 2306-2310.
- Jones, A., A. Faldas, A. Foucher, E. Hunt, A. Tait, J. M. Wastling and C. M. Turner (2006). "Visualisation and analysis of proteomic data from the procyclic form of *Trypanosoma brucei*." Proteomics **6**(1): 259-267.
- Karasek, M. A. and D. M. Greenberg (1957). "Studies on the properties of threonine aldolases." J Biol Chem **227**(1): 191-205.
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (1998). "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway." Cell **95**(7): 1017-1026.
- Ketting, R. F. (2011). "microRNA Biogenesis and Function : An overview." Adv Exp Med Biol **700**: 1-14.
- Kihara, M. and R. M. Macnab (1981). "Cytoplasmic pH mediates pH taxis and weak-acid repellent taxis of bacteria." J Bacteriol **145**(3): 1209-1221.
- Klein, R. A. and D. J. Linstead (1976). "Threonine as a preferred source of 2-carbon units for lipid synthesis in *Trypanosoma brucei*." Biochem Soc Trans **4**(1): 48-50.
- Knighton, D. R., C. C. Kan, E. Howland, C. A. Janson, Z. Hostomska, K. M. Welsh and D. A. Matthews (1994). "Structure of and kinetic channelling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase." Nat Struct Biol **1**(3): 186-194.
- Kohlwein, S. D., S. Eder, C. S. Oh, C. E. Martin, K. Gable, D. Bacikova and T. Dunn (2001). "Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **21**(1): 109-125.
- Kolev, N. G., C. Tschudi and E. Ullu (2011). "RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges." Eukaryot Cell **10**(9): 1156-1163.
- Koslowsky, D. J., G. J. Bhat, A. L. Perrollaz, J. E. Feagin and K. Stuart (1990). "The MURF3 gene of *T. brucei* contains multiple domains of extensive editing and is homologous to a subunit of NADH dehydrogenase." Cell **62**(5): 901-911.
- Kovaleva, S. V., A. I. Dorozhko, S. E. Rabinovich and Z. S. Kagan (1984). "Kinetic and allosteric properties of highly-purified, biosynthetic L-threonine dehydrogenase from brewer's yeast *Saccharomyces carlsbergensis*." Biokhimiia **49**(4): 540-546.
- Kumari, S., C. M. Beatty, D. F. Browning, S. J. Busby, E. J. Simel, G. Hovel-Miner and A. J. Wolfe (2000). "Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*." J Bacteriol **182**(15): 4173-4179.
- L'Hostis, C., M. Geindre and J. Deshusses (1993). "Active transport of L-proline in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*." Biochem J **291** (Pt 1): 297-301.

- Lamour, N., L. Rivière, V. Coustou, G. H. Coombs, M. P. Barrett and F. Bringaud (2005). "Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose." J Biol Chem **280**(12): 11902-11910.
- Leak, S. (1998). "Tsetse biology and ecology: their role in the epidemiology and control of trypanosomosis." Tsetse biology and ecology: their role in the epidemiology and control of trypanosomosis.
- Leak, S. G. (1999). Tsetse biology and ecology: their role in the epidemiology and control of trypanosomosis, Full text by ILRI.
- Lee, S. H., J. L. Stephens and P. T. Englund (2007). "A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism." Nat Rev Microbiol **5**(4): 287-297.
- Lee, S. H., J. L. Stephens, K. S. Paul and P. T. Englund (2006). "Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes." Cell **126**(4): 691-699.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox (2005). Lehninger principles of biochemistry. New York, N.Y. ; Basingstoke, W.H. Freeman.
- Leoncini, R., R. Pagani, A. Casella and E. Marinello (1985). "Rat liver L-threonine deaminase: properties and purification." Biosci Rep **5**(6): 499-508.
- Liang, X. H., Q. Liu and S. Michaeli (2003). "Small nucleolar RNA interference induced by antisense or double-stranded RNA in trypanosomatids." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7521-7526.
- Lindmark, D. G. (1980). "Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*." Mol Biochem Parasitol **1**(1): 1-12.
- Linstead, D. J., R. A. Klein and G. A. Cross (1977). "Threonine catabolism in *Trypanosoma brucei*." J Gen Microbiol **101**(2): 243-251.
- Lohmann, J. U., I. Endl and T. C. Bosch (1999). "Silencing of developmental genes in Hydra." Dev Biol **214**(1): 211-214.
- Loikkanen, I., S. Haghighi, S. Vainio and A. Pajunen (2002). "Expression of cytosolic acetyl-CoA synthetase gene is developmentally regulated." Mech Dev **115**(1-2): 139-141.
- Longacre, S., U. Hibner, A. Raibaud, H. Eisen, T. Baltz, C. Giroud and D. Baltz (1983). "DNA rearrangements and antigenic variation in *Trypanosoma equiperdum*: multiple expression-linked sites in independent isolates of trypanosomes expressing the same antigen." Mol Cell Biol **3**(3): 399-409.
- Louis, F., P. Buscher and V. Lejon (2001). "Le diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine en 2001." Médecine tropicale **61**: 340-346.
- Lye, L. F., K. Owens, H. Shi, S. M. Murta, A. C. Vieira, S. J. Turco, C. Tschudi, E. Ullu and S. M. Beverley (2010). "Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans." PLoS Pathog **6**(10): e1001161.
- Machielsen, R. and J. van der Oost (2006). "Production and characterization of a thermostable L-threonine dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." FEBS J **273**(12): 2722-2729.

- Mair, G., H. Shi, H. Li, A. Djikeng, H. O. Aviles, J. R. Bishop, F. H. Falcone, C. Gavrilescu, J. L. Montgomery, M. I. Santori, L. S. Stern, Z. Wang, E. Ullu and C. Tschudi (2000). "A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA." RNA **6**(2): 163-169.
- Mandava, V., J. P. Fernandez, H. Deng, C. J. Janzen, S. B. Hake and G. A. Cross (2007). "Histone modifications in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **156**(1): 41-50.
- Marvin-Sikkema, F. D., T. M. Pedro Gomes, J. P. Grivet, J. C. Gottschal and R. A. Prins (1993). "Characterization of hydrogenosomes and their role in glucose metabolism of *Neocallimastix* sp. L2." Arch Microbiol **160**(5): 388-396.
- Maslov, D. A. and L. Simpson (1992). "The polarity of editing within a multiple gRNA-mediated domain is due to formation of anchors for upstream gRNAs by downstream editing." Cell **70**(3): 459-467.
- Matthews, K. R. (2005). "The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*." J Cell Sci **118**(Pt 2): 283-290.
- Mazet, M., R. K. Harijan, T. R. Kiema, A. M. Haapalainen, P. Morand, J. Morales, F. Bringaud, R. K. Wierenga and P. A. Michels (2011). "The characterization and evolutionary relationships of a trypanosomal thiolase." Int J Parasitol **41**(12): 1273-1283.
- McCaffrey, A. P. and M. A. Kay (2002). "A story of mice and men." Gene Ther **9**(23): 1563.
- McCaffrey, A. P., L. Meuse, M. Karimi, C. H. Contag and M. A. Kay (2003). "A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice." Hepatology **38**(2): 503-508.
- Mellors, A. and A. Samad (1989). "The acquisition of lipids by African trypanosomes." Parasitol Today **5**(8): 239-244.
- Metzlaff, M., M. O'Dell, P. D. Cluster and R. B. Flavell (1997). "RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia." Cell **88**(6): 845-854.
- Michel, T. A. and J. M. Macy (1990). "Generation of a membrane potential by sodium-dependent succinate efflux in *Selenomonas ruminantium*." J Bacteriol **172**(3): 1430-1435.
- Michels, P. A., F. Bringaud, M. Herman and V. Hannaert (2006). "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1463-1477.
- Michels, P. A., J. P. Michels, J. Boonstra and W. N. Konings (1979). "Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products." FEMS microbiology Letters **5**(5): 357-364.
- Miornyk, J. A. and J. J. Thelen (2008). "Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions." Plant J **53**(4): 597-609.
- Millerioux, Y., C. Ebikeme, M. Biran, P. Morand, G. Bouyssou, I. M. Vincent, M. Mazet, L. Riviere, J. M. Franconi, R. J. Burchmore, P. Moreau, M. P. Barrett and F. Bringaud (2013). "The threonine degradation pathway of the *Trypanosoma brucei* procyclic form: the main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control." Mol Microbiol **90**(1): 114-129.

- Millerioux, Y., P. Morand, M. Biran, M. Mazet, P. Moreau, M. Wargnies, C. Ebikeme, K. Deramchia, L. Gales, J. C. Portais, M. Boshart, J. M. Franconi and F. Bringaud (2012). "ATP synthesis-coupled and -uncoupled acetate production from acetyl-CoA by mitochondrial acetate:succinate CoA-transferase and acetyl-CoA thioesterase in *Trypanosoma*." J Biol Chem **287**(21): 17186-17197.
- Misset, O. and F. R. Opperdoes (1987). "The phosphoglycerate kinases from *Trypanosoma brucei*. A comparison of the glycosomal and the cytosolic isoenzymes and their sensitivity towards suramin." Eur J Biochem **162**(3): 493-500.
- Moon, Y. A., N. A. Shah, S. Mohapatra, J. A. Warrington and J. D. Horton (2001). "Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol." J Biol Chem **276**(48): 45358-45366.
- Moreira, D., P. López-García and K. Vickerman (2004). "An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 5): 1861-1875.
- Morita, Y. S., K. S. Paul and P. T. Englund (2000). "Specialized fatty acid synthesis in African trypanosomes: myristate for GPI anchors." Science **288**(5463): 140-143.
- Morris, J. G. (1969). "Utilization of L-threonine by a pseudomonad: a catabolic role for L-threonine aldolase." Biochem J **115**(3): 603-605.
- Musfeldt, M. and P. Schönheit (2002). "Novel type of ADP-forming acetyl coenzyme A synthetase in hyperthermophilic archaea: heterologous expression and characterization of isoenzymes from the sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the methanogen *Methanococcus jannaschii*." J Bacteriol **184**(3): 636-644.
- Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." Plant Cell **2**(4): 279-289.
- Navarro, M. and K. Gull (2001). "A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*." Nature **414**(6865): 759-763.
- Nes, C. R., U. K. Singha, J. Liu, K. Ganapathy, F. Villalta, M. R. Waterman, G. I. Lepesheva, M. Chaudhuri and W. D. Nes (2012). "Novel sterol metabolic network of *Trypanosoma brucei* procyclic and bloodstream forms." Biochem J **443**(1): 267-277.
- Ngô, H., C. Tschudi, K. Gull and E. Ullu (1998). "Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14687-14692.
- Nogge, G. (1976). "Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts." Experientia **32**(8): 995-996.
- Nogge, G. (1981). "Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in hematophagous arthropods." Parasitology **82**(4): 101-104.
- Ochsenreiter, T. and S. Hajduk (2008). The function of RNA editing in Trypanosomes. RNA editing, Springer: 181-197.

- Ochsenreiter, T. and S. L. Hajduk (2006). "Alternative editing of cytochrome c oxidase III mRNA in trypanosome mitochondria generates protein diversity." EMBO Rep **7**(11): 1128-1133.
- Ogbadoyi, E. O., D. R. Robinson and K. Gull (2003). "A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes." Mol Biol Cell **14**(5): 1769-1779.
- Ohnishi, A., T. Osaki, Y. Matahira, T. Tsuka, T. Imagawa, Y. Okamoto and S. Minami (2013). "Correlation of plasma amino acid concentrations and chondroprotective effects of glucosamine and fish collagen peptide on the development of osteoarthritis." J Vet Med Sci **75**(4): 497-502.
- Ollivier, G. and D. Legros (2001). "Trypanosomiase humaine africaine: historique de la thérapeutique et de ses échecs." Tropical Medicine & International Health **6**(11): 855-863.
- Opperdoes, F. R. and P. Borst (1977). "Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome." FEBS Lett **80**(2): 360-364.
- Opperdoes, F. R. and P. A. Michels (2008). "Complex I of Trypanosomatidae: does it exist?" Trends Parasitol **24**(7): 310-317.
- Osinga, K. A., B. W. Swinkels, W. C. Gibson, P. Borst, G. H. Veeneman, J. H. Van Boom, P. A. Michels and F. R. Opperdoes (1985). "Topogenesis of microbody enzymes: a sequence comparison of the genes for the glycosomal (microbody) and cytosolic phosphoglycerate kinases of *Trypanosoma brucei*." EMBO J **4**(13B): 3811-3817.
- Otto, R., R. G. Lageveen, H. Veldkamp and W. N. Konings (1982). "Lactate efflux-induced electrical potential in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*." J Bacteriol **149**(2): 733-738.
- Overath, P. and M. Engstler (2004). "Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system." Mol Microbiol **53**(3): 735-744.
- Ovádi, J. (1991). "Physiological significance of metabolic channelling." J Theor Biol **152**(1): 1-22.
- Pagani, R., R. Leoncini, M. Pizzichini, D. Vannoni, A. Tabucchi and E. Marinello (1994). "Properties of rat liver L-threonine deaminase." Enzyme Protein **48**(2): 90-97.
- Pandolfini, T., B. Molesini, L. Avesani, A. Spena and A. Polverari (2003). "Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the rolC promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection." BMC Biotechnol **3**: 7.
- Panigrahi, A. K., S. P. Gygi, N. L. Ernst, R. P. Igo, S. S. Palazzo, A. Schnauffer, D. S. Weston, N. Carmean, R. Salavati, R. Aebbersold and K. D. Stuart (2001). "Association of two novel proteins, TbMP52 and TbMP48, with the *Trypanosoma brucei* RNA editing complex." Mol Cell Biol **21**(2): 380-389.
- Panigrahi, A. K., Y. Ogata, A. Zikova, A. Anupama, R. A. Dalley, N. Acestor, P. J. Myler and K. D. Stuart (2009). "A comprehensive analysis of *Trypanosoma brucei* mitochondrial proteome." Proteomics **9**(2): 434-450.

- Panigrahi, A. K., A. Schnauffer, N. Carmean, R. P. Igo, S. P. Gygi, N. L. Ernst, S. S. Palazzo, D. S. Weston, R. Aebersold, R. Salavati and K. D. Stuart (2001). "Four related proteins of the *Trypanosoma brucei* RNA editing complex." Mol Cell Biol **21**(20): 6833-6840.
- Panigrahi, A. K., A. Schnauffer, N. L. Ernst, B. Wang, N. Carmean, R. Salavati and K. Stuart (2003). "Identification of novel components of *Trypanosoma brucei* editosomes." RNA **9**(4): 484-492.
- Patnaik, P. K., M. C. Field, A. K. Menon, G. A. Cross, M. C. Yee and P. Butikofer (1993). "Molecular species analysis of phospholipids from *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic forms." Mol Biochem Parasitol **58**(1): 97-105.
- Patrick, K. L., H. Shi, N. G. Kolev, K. Ersfeld, C. Tschudi and E. Ullu (2009). "Distinct and overlapping roles for two Dicer-like proteins in the RNA interference pathways of the ancient eukaryote *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17933-17938.
- Paul, K. S., D. Jiang, Y. S. Morita and P. T. Englund (2001). "Fatty acid synthesis in African trypanosomes: a solution to the myristate mystery." Trends Parasitol **17**(8): 381-387.
- Paul, S., K. Gable, F. Beaudoin, E. Cahoon, J. Jaworski, J. A. Napier and T. M. Dunn (2006). "Members of the Arabidopsis FAE1-like 3-ketoacyl-CoA synthase gene family substitute for the Elop proteins of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **281**(14): 9018-9029.
- Pays, E., S. Lips, D. Nolan, L. Vanhamme and D. Pérez-Morga (2001). "The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts." Mol Biochem Parasitol **114**(1): 1-16.
- Perham, R. N. (2000). "Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions." Annu Rev Biochem **69**: 961-1004.
- Plasterk, R. H. (2002). "RNA silencing: the genome's immune system." Science **296**(5571): 1263-1265.
- Potter, R., V. Kapoor and E. B. Newman (1977). "Role of threonine dehydrogenase in *Escherichia coli* threonine degradation." J Bacteriol **132**(2): 385-391.
- Preußner, C., N. Jaé and A. Bindereif (2012). "mRNA splicing in trypanosomes." Int J Med Microbiol **302**(4-5): 221-224.
- Pérez-Moreno, G., M. Sealey-Cardona, C. Rodrigues-Poveda, M. H. Gelb, L. M. Ruiz-Pérez, V. Castillo-Acosta, J. A. Urbina and D. González-Pacanowska (2012). "Endogenous sterol biosynthesis is important for mitochondrial function and cell morphology in procyclic forms of *Trypanosoma brucei*." Int J Parasitol **42**(11): 975-989.
- Reeves, R. E., L. G. Warren, B. Susskind and H. S. Lo (1977). "An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase." J Biol Chem **252**(2): 726-731.
- Richmond, G. S., F. Gibellini, S. A. Young, L. Major, H. Denton, A. Lilley and T. K. Smith (2010). "Lipidomic analysis of bloodstream and procyclic form *Trypanosoma brucei*." Parasitology **137**(9): 1357-1392.
- Riviere, L., S. W. van Weelden, P. Glass, P. Vegh, V. Coustou, M. Biran, J. J. van Hellemond, F. Bringaud, A. G. Tielens and M. Boshart (2004). "Acetyl:succinate CoA-

- transferase in procyclic *Trypanosoma brucei*. Gene identification and role in carbohydrate metabolism." J Biol Chem **279**(44): 45337-45346.
- Rivière, L., P. Moreau, S. Allmann, M. Hahn, M. Biran, N. Plazolles, J. M. Franconi, M. Boshart and F. Bringaud (2009). "Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12694-12699.
- Rivière, L., S. W. van Weelden, P. Glass, P. Vegh, V. Coustou, M. Biran, J. J. van Hellemond, F. Bringaud, A. G. Tielens and M. Boshart (2004). "Acetyl:succinate CoA-transferase in procyclic *Trypanosoma brucei*. Gene identification and role in carbohydrate metabolism." J Biol Chem **279**(44): 45337-45346.
- Roberts, C. W., R. McLeod, D. W. Rice, M. Ginger, M. L. Chance and L. J. Goad (2003). "Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 129-142.
- Robinson, D. R., T. Sherwin, A. Ploubidou, E. H. Byard and K. Gull (1995). "Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle." J Cell Biol **128**(6): 1163-1172.
- Robinson, J. B. and P. A. Sreere (1985). "Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes." Biochem Med **33**(2): 149-157.
- Robinson, K. A. and S. M. Beverley (2003). "Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **128**(2): 217-228.
- Rochet, J. C. and W. A. Bridger (1994). "Identification of glutamate 344 as the catalytic residue in the active site of pig heart CoA transferase." Protein Sci **3**(6): 975-981.
- Roe, A. J., D. McLaggan, I. Davidson, C. O'Byrne and I. R. Booth (1998). "Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids." J Bacteriol **180**(4): 767-772.
- Roe, A. J., C. O'Byrne, D. McLaggan and I. R. Booth (2002). "Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity." Microbiology **148**(Pt 7): 2215-2222.
- Roldan, A., M. A. Comini, M. Crispo and R. L. Krauth-Siegel (2011). "Lipoamide dehydrogenase is essential for both bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol **81**(3): 623-639.
- Roldán, A., M. A. Comini, M. Crispo and R. L. Krauth-Siegel (2011). "Lipoamide dehydrogenase is essential for both bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol **81**(3): 623-639.
- Rose, I. A., M. Grunberg-Manago, S. R. Korey and S. Ochoa (1954). "Enzymatic phosphorylation of acetate." J Biol Chem **211**(2): 737-756.
- Rudenko, G., H. M. Chung, V. P. Pham and L. H. Van der Ploeg (1991). "RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*." EMBO J **10**(11): 3387-3397.

- Ruiz, F., L. Vayssié, C. Klotz, L. Sperling and L. Madeddu (1998). "Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*." Mol Biol Cell **9**(4): 931-943.
- Ryley, J. F. (1956). "Studies on the metabolism of the Protozoa. 7. Comparative carbohydrate metabolism of eleven species of trypanosome." Biochem J **62**(2): 215-222.
- Ryley, J. F. (1962). "Studies on the metabolism of protozoa. 9. Comparative metabolism of bloodstream and culture forms of *Trypanosoma rhodesiense*." Biochem. J. **85**: 211-223.
- Saunders, E. C., W. W. Ng, J. M. Chamber, M. Ng, T. Naderer, J. O. Kroemer, V. A. Likic and M. J. McConville (2011). "Isotopomer profiling of *Leishmania mexicana* promastigotes reveals important roles for succinate fermentation and aspartate uptake in TCA cycle anaplerosis, glutamate synthesis and growth." J Biol Chem.
- Sawers, G. (1998). "The anaerobic degradation of L-serine and L-threonine in enterobacteria: networks of pathways and regulatory signals." Arch Microbiol **171**(1): 1-5.
- Schnauffer, A., G. D. Clark-Walker, A. G. Steinberg and K. Stuart (2005). "The F1-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function." Embo J **24**(23): 4029-4040.
- Schneider, A., J. Martin and N. Agabian (1994). "A nuclear encoded tRNA of *Trypanosoma brucei* is imported into mitochondria." Mol Cell Biol **14**(4): 2317-2322.
- Shi, H., C. Tschudi and E. Ullu (2006). "An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*." RNA **12**(12): 2063-2072.
- Siegel, T. N., D. R. Hekstra, L. E. Kemp, L. M. Figueiredo, J. E. Lowell, D. Fenyó, X. Wang, S. Dewell and G. A. Cross (2009). "Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*." Genes Dev **23**(9): 1063-1076.
- Simpson, A. G., J. R. Stevens and J. Lukes (2006). "The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates." Trends Parasitol **22**(4): 168-174.
- Simpson, L., N. Neckelmann, V. F. de la Cruz, A. M. Simpson, J. E. Feagin, D. P. Jasmer and K. Stuart (1987). "Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence." J Biol Chem **262**(13): 6182-6196.
- Smith, T. K. and P. Butikofer (2010). "Lipid metabolism in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **172**(2): 66-79.
- Souza, A. E., P. J. Myler and K. Stuart (1992). "Maxicircle CR1 transcripts of *Trypanosoma brucei* are edited and developmentally regulated and encode a putative iron-sulfur protein homologous to an NADH dehydrogenase subunit." Mol Cell Biol **12**(5): 2100-2107.
- Starai, V. J. and J. C. Escalante-Semerena (2004). "Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming)." Cell Mol Life Sci **61**(16): 2020-2030.
- Stechmann, A., K. Hamblin, V. Perez-Brocal, D. Gaston, G. S. Richmond, M. van der Giezen, C. G. Clark and A. J. Roger (2008). "Organelles in Blastocystis that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes." Curr Biol **18**(8): 580-585.

- Steinbuchel, A. and M. Muller (1986). "Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes." Mol Biochem Parasitol **20**(1): 57-65.
- Stephens, J. L., S. H. Lee, K. S. Paul and P. T. Englund (2007). "Mitochondrial fatty acid synthesis in *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **282**(7): 4427-4436.
- Steverding, D. (2008). "The history of African trypanosomiasis." Parasit Vectors **1**(1): 3.
- Stoffel, S. A., V. P. Alibu, J. Hubert, C. Ebikeme, J. C. Portais, F. Bringaud, M. E. Schweingruber and M. P. Barrett (2011). "Transketolase in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **179**(1): 1-7.
- Strijbis, K., F. M. Vaz and B. Distel (2010). "Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway." IUBMB Life **62**(5): 357-362.
- Stuart, K. D., A. Schnauffer, N. L. Ernst and A. K. Panigrahi (2005). "Complex management: RNA editing in trypanosomes." Trends Biochem Sci **30**(2): 97-105.
- Sturm, N. R. and L. Simpson (1990). "Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA." Cell **61**(5): 879-884.
- Surve, S., M. Heestand, B. Panicucci, A. Schnauffer and M. Parsons (2012). "Enigmatic presence of mitochondrial complex I in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms." Eukaryot Cell **11**(2): 183-193.
- Svoboda, P., P. Stein, H. Hayashi and R. M. Schultz (2000). "Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference." Development **127**(19): 4147-4156.
- Szöör, B., I. Ruberto, R. Burchmore and K. R. Matthews (2010). "A novel phosphatase cascade regulates differentiation in *Trypanosoma brucei* via a glycosomal signaling pathway." Genes Dev **24**(12): 1306-1316.
- Szöör, B., J. Wilson, H. McElhinney, L. Taberner and K. R. Matthews (2006). "Protein tyrosine phosphatase TbPTP1: A molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes." J Cell Biol **175**(2): 293-303.
- Sánchez, L. B., M. Y. Galperin and M. Müller (2000). "Acetyl-CoA synthetase from the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia* belongs to the newly recognized superfamily of acyl-CoA synthetases (Nucleoside diphosphate-forming)." J Biol Chem **275**(8): 5794-5803.
- Talbert, P. B. and S. Henikoff (2009). "Chromatin-based transcriptional punctuation." Genes Dev **23**(9): 1037-1041.
- ten Asbroek, A. L., C. A. Mol, R. Kieft and P. Borst (1993). "Stable transformation of *Trypanosoma brucei*." Molecular and biochemical parasitology **59**(1): 133-142.
- Ten Brink, B. and W. N. Konings (1980). "Generation of an electrochemical proton gradient by lactate efflux in membrane vesicles of *Escherichia coli*." Eur J Biochem **111**(1): 59-66.
- Tielens, A. G. and G. C. Hill (1985). "The solubilization of a SHAM sensitive, cyanide insensitive ubiquinol oxidase from *Trypanosoma brucei*." J Parasitol **71**(3): 384-386.

- Tielens, A. G., K. W. van Grinsven, K. Henze, J. J. van Hellemond and W. Martin (2010). "Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists." Int J Parasitol **40**(4): 387-397.
- Toke, D. A. and C. E. Martin (1996). "Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **271**(31): 18413-18422.
- Tschudi, C., A. Djikeng, H. Shi and E. Ullu (2003). "In vivo analysis of the RNA interference mechanism in *Trypanosoma brucei*." Methods **30**(4): 304-312.
- Ullu, E. and C. Tschudi (1991). "Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10074-10078.
- Ullu, E., C. Tschudi and T. Chakraborty (2004). "RNA interference in protozoan parasites." Cell Microbiol **6**(6): 509-519.
- Umbarger, H. E. and B. Brown (1957). "Threonine deamination in *Escherichia coli*. II. Evidence for two L-threonine deaminases." J Bacteriol **73**(1): 105-112.
- Urbaniak, M. D., M. L. Guther and M. A. Ferguson (2012). "Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages." PLoS One **7**(5): e36619.
- Uzureau, P., S. Uzureau, L. Lecordier, F. Fontaine, P. Tebabi, F. Homble, A. Grelard, V. Zhendre, D. P. Nolan, L. Lins, J. M. Crowet, A. Pays, C. Felu, P. Poelvoorde, B. Vanhollebeke, S. K. Moestrup, J. Lyngso, J. S. Pedersen, J. C. Mottram, E. J. Dufourc, D. Perez-Morga and E. Pays (2013). "Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* resistance to human serum." Nature.
- van den Berg, M. A., P. de Jong-Gubbels, C. J. Kortland, J. P. van Dijken, J. T. Pronk and H. Y. Steensma (1996). "The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation." J. Biol. Chem. **271**: 28953-28959.
- Van der Ploeg, L. H., A. W. Cornelissen, P. A. Michels and P. Borst (1984). "Chromosome rearrangements in *Trypanosoma brucei*." Cell **39**(1): 213-221.
- van Grinsven, K. W., J. Van Den Abbeele, P. Van den Bossche, J. J. van Hellemond and A. G. Tielens (2009). "Adaptations in the glucose metabolism of procyclic *Trypanosoma brucei* isolates from tsetse flies and during differentiation of bloodstream forms." Eukaryot Cell **8**(8): 1307-1311.
- Van Hellemond, J. J., F. R. Opperdoes and A. G. Tielens (1998). "Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3036-3041.
- van Hellemond, J. J. and A. G. Tielens (2006). "Adaptations in the lipid metabolism of the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*." FEBS Lett **580**(23): 5552-5558.
- van Weelden, S. W., B. Fast, A. Vogt, P. van der Meer, J. Saas, J. J. van Hellemond, A. G. Tielens and M. Boshart (2003). "Procyclic *Trypanosoma brucei* do not use Krebs cycle activity for energy generation." J Biol Chem **278**(15): 12854-12863.

- van Weelden, S. W., J. J. van Hellemond, F. R. Opperdoes and A. G. Tielens (2005). "New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle." J Biol Chem **280**(13): 12451-12460.
- Vanhamme, L., A. Pays, P. Tebabi, S. Alexandre and E. Pays (1995). "Specific binding of proteins to the noncoding strand of a crucial element of the variant surface glycoprotein, procyclin, and ribosomal promoters of *Trypanosoma brucei*." Mol Cell Biol **15**(10): 5598-5606.
- Vanhamme, L., E. Pays, R. McCulloch and J. D. Barry (2001). "An update on antigenic variation in African trypanosomes." Trends Parasitol. **17**: 338-343.
- Vanhollebeke, B. and E. Pays (2010). "The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill." Mol Microbiol **76**(4): 806-814.
- Vaughan, S. and K. Gull (2003). "The trypanosome flagellum." J Cell Sci **116**(Pt 5): 757-759.
- Verner, Z., P. Cermáková, I. Skodová, E. Kriegová, A. Horváth and J. Lukes (2011). "Complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) is active in but non-essential for procyclic *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **175**(2): 196-200.
- Vertommen, D., J. Van Roy, J. P. Szikora, M. H. Rider, P. A. Michels and F. R. Opperdoes (2008). "Differential expression of glycosomal and mitochondrial proteins in the two major life-cycle stages of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **158**(2): 189-201.
- Vickerman, K. and T. Preston (1976). "Comparative cell biology of the Trypanosomatids." Biology of the Kinetoplastida **1**: 35-130.
- Vigueira, P. A. and K. S. Paul (2011). "Requirement for acetyl-CoA carboxylase in *Trypanosoma brucei* is dependent upon the growth environment." Mol Microbiol **80**(1): 117-132.
- Visser, N. and F. R. Opperdoes (1980). "Glycolysis in *Trypanosoma brucei*." Eur J Biochem **103**(3): 623-632.
- Visser, N., F. R. Opperdoes and P. Borst (1981). "Subcellular compartmentation of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*." Eur. J. Biochem. **118**(3): 521-526.
- Voet, D. and J. G. Voet (2004). Biochemistry, John Wiley & Sons.
- Voorheis, H. P. (1980). "Fatty acid uptake by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and other species of the kinetoplastida." Mol Biochem Parasitol **1**(3): 177-186.
- Vélot, C., M. B. Mixon, M. Teige and P. A. Srere (1997). "Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon." Biochemistry **36**(47): 14271-14276.
- Wada, H., D. Shintani and J. Ohlrogge (1997). "Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(4): 1591-1596.
- Walshe, D. P., C. P. Ooi, M. J. Lehane and L. R. Haines (2009). "Chapter 3 The Enemy Within: Interactions Between Tsetse, Trypanosomes and Symbionts." Advances in Insect Physiology **37**: 119-175.

- Wargelius, A., S. Ellingsen and A. Fjose (1999). "Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos." Biochem Biophys Res Commun **263**(1): 156-161.
- Weber, J. (2010). "Structural biology: Toward the ATP synthase mechanism." Nat Chem Biol **6**(11): 794-795.
- Weiden, M., Y. N. Osheim, A. L. Beyer and L. H. Van der Ploeg (1991). "Chromosome structure: DNA nucleotide sequence elements of a subset of the minichromosomes of the protozoan *Trypanosoma brucei*." Mol Cell Biol **11**(8): 3823-3834.
- White, H. and W. P. Jencks (1976). "Mechanism and specificity of succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase." J Biol Chem **251**(6): 1688-1699.
- Wianny, F. and M. Zernicka-Goetz (2000). "Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development." Nat Cell Biol **2**(2): 70-75.
- Wickstead, B., K. Ersfeld and K. Gull (2002). "Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **125**(1-2): 211-216.
- Wickstead, B., K. Ersfeld and K. Gull (2004). "The small chromosomes of *Trypanosoma brucei* involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes." Genome Res **14**(6): 1014-1024.
- Williams, N. and P. H. Frank (1990). "The mitochondrial ATP synthase of *Trypanosoma brucei*: isolation and characterization of the intact F1 moiety." Mol Biochem Parasitol **43**(1): 125-132.
- Williams, T. C., L. J. Sweetlove and R. G. Ratcliffe (2011). "Capturing metabolite channeling in metabolic flux phenotypes." Plant Physiol **157**(3): 981-984.
- Wink, M. (1979). "The endosymbionts of *Glossina morsitans* and *G. palpalis*: cultivation experiments and some physiological properties." Acta tropica **36**: 215-222.
- Wirtz, E., S. Leal, C. Ochatt and G. A. Cross (1999). "A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **99**(1): 89-101.
- Wolfe, A. J. (2005). "The acetate switch." Microbiol Mol Biol Rev **69**(1): 12-50.
- Xong, H. V., L. Vanhamme, M. Chamekh, C. E. Chimfwembe, J. Van Den Abbeele, A. Pays, N. Van Meirvenne, R. Hamers, P. De Baetselier and E. Pays (1998). "A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*." Cell **95**(6): 839-846.
- Xu, Y., L. Liu, C. Lopez-Estraño and S. Michaeli (2001). "Expression studies on clustered trypanosomatid box C/D small nucleolar RNAs." J Biol Chem **276**(17): 14289-14298.
- Yamashita, H., A. Itsuki, M. Kimoto, M. Hiemori and H. Tsuji (2006). "Acetate generation in rat liver mitochondria; acetyl-CoA hydrolase activity is demonstrated by 3-ketoacyl-CoA thiolase." Biochim Biophys Acta **1761**(1): 17-23.

- Yuan, J. H. and R. E. Austic (2001). "Characterization of hepatic L-threonine dehydrogenase of chicken." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **130**(1): 65-73.
- Zank, T. K., U. Zähringer, C. Beckmann, G. Pohnert, W. Boland, H. Holtorf, R. Reski, J. Lerchl and E. Heinz (2002). "Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of Delta6-polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*." Plant J **31**(3): 255-268.
- Zeihner, C. A. and D. D. Randall (1990). "Identification and Characterization of Mitochondrial Acetyl-Coenzyme A Hydrolase from *Pisum sativum* L. Seedlings." Plant Physiol **94**(1): 20-27.
- Zhang, L., A. K. Joshi, J. Hofmann, E. Schweizer and S. Smith (2005). "Cloning, expression, and characterization of the human mitochondrial beta-ketoacyl synthase. Complementation of the yeast CEM1 knock-out strain." J Biol Chem **280**(13): 12422-12429.
- Zhou, W., G. A. Cross and W. D. Nes (2007). "Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*." J Lipid Res **48**(3): 665-673.
- Zikova, A., A. Schnauffer, R. A. Dalley, A. K. Panigrahi and K. D. Stuart (2009). "The F(0)F(1)-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*." PLoS Pathog **5**(5): e1000436.
- Zomerdijk, J. C., R. Kieft and P. Borst (1991). "Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*." Nature **353**(6346): 772-775.
- Zomerdijk, J. C., R. Kieft and P. Borst (1992). "A ribosomal RNA gene promoter at the telomere of a mini-chromosome in *Trypanosoma brucei*." Nucleic Acids Res **20**(11): 2725-2734.

Résumé

Trypanosoma brucei, parasite protozoaire flagellé appartenant à l'ordre des kinétoplastidés, est responsable de la maladie du sommeil, ou trypanosomiase humaine africaine (THA). Son cycle de vie est complexe et fait intervenir un insecte vecteur hématophage (la mouche tsé-tsé ou glossine) qui lors d'un repas sanguin sur un individu infecté ingère des parasites. Après plusieurs étapes de différenciation, les parasites sont injectés à un hôte lors d'un autre repas sanguin. Actuellement, il n'existe aucun vaccin contre la THA, les traitements disponibles sont responsables de nombreux effets secondaires et des cas de résistance sont fréquemment rapportés. Nous avons étudié le métabolisme intermédiaire et énergétique de la forme procyclique de *T. brucei*, forme présente dans l'appareil digestif de l'insecte vecteur. Chez ce parasite, la dégradation du glucose aboutit à la production d'acétate dans l'unique mitochondrie, et de succinate dans la mitochondrie et les glycosomes, organelles spécifiques des trypanosomatidés dans lesquels la glycolyse est compartimentalisée. L'une des particularités métaboliques de *T. brucei* est l'utilisation d'une "navette acétate" permettant de transférer l'acétyl-CoA produit dans la mitochondrie vers le cytosol pour initier la biosynthèse *de novo* des acides gras. Cette production d'acétate est par ailleurs essentielle à la croissance du parasite. Cette navette acétate fait intervenir dans la mitochondrie l'acétate:succinate CoA-transférase (ASCT), qui converti l'acétyl-CoA produit à partir du glucose en acétate. Lors de ce travail, nous avons identifié et caractérisé une autre enzyme mitochondriale contribuant avec l'ASCT à la production d'acétate à partir du glucose : l'acétyl-CoA thioesterase (ACH). Le double mutant n'exprimant ni l'ACH ni l'ASCT ne produit plus d'acétate et n'est plus viable, ce qui confirme le rôle essentiel de la production d'acétate. Par ailleurs, nous avons montré que l'ASCT, grâce au cycle formé avec la succinyl-CoA synthétase (SCoAS), contribue à la production d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat dans la mitochondrie, alors que l'ACH n'est pas impliqué dans la production d'ATP. De plus, la contribution de la production d'ATP par le cycle ASCT/SCoAS est équivalente à la production d'ATP par phosphorylation oxydative *via* la F₀-F₁-ATP synthase mitochondriale.

La thréonine est l'acide aminé le plus rapidement consommé par le parasite et sa dégradation aboutit à la production d'acétate et de glycine en quantité équimolaires. Cependant sa voie de dégradation n'a pas été encore décrite. En utilisant des outils de génétique inverse et des analyses métaboliques par RMN du proton et HPTLC, nous avons caractérisé la première étape enzymatique de cette voie, catalysée par la thréonine déshydrogénase (TDH), et nous avons montré que la thréonine est la principale source de carbone pour la production d'acétate mais également pour la biosynthèse *de novo* des acides gras et des stérols. L'acétyl-CoA est produit dans la mitochondrie à partir du pyruvate provenant de la dégradation du glucose par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) et à partir de la thréonine dont la dégradation est initiée par la TDH. L'acétyl-CoA provenant de la dégradation du glucose ou de la thréonine est converti en acétate par les mêmes enzymes, l'ACH et l'ASCT. Nous avons également montré que la voie de dégradation de la thréonine est sous régulation métabolique. En effet, l'activité et l'expression de la TDH ainsi que la production d'acétate à partir de la thréonine sont diminuées dans le mutant knock out n'exprimant plus la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) dans lequel le flux glycolytique est redirigé vers la production d'acétate. De plus, contrairement au glucose, la dégradation de la thréonine ne participe pas à la production d'ATP dans la mitochondrie du parasite. Nos résultats nous amène à l'hypothèse d'un channeling mitochondrial des voies de dégradation du pyruvate et de la thréonine pour la production d'acétate.

Les trypanosomes ont développé une voie de biosynthèse *de novo* des acides gras particulière faisant appel aux élongases du réticulum endoplasmique et un précurseur inhabituel, le butyryl-CoA. La voie de biosynthèse du butyryl-CoA n'est à l'heure actuelle pas connue chez les trypanosomatidés. En utilisant les données du génome de *T. brucei*, nous avons reconstitué une voie de biosynthèse hypothétique à partir de l'acétyl-CoA dans la mitochondrie. La dernière enzyme de cette voie, l'isovaléryl-CoA déshydrogénase (IVDH), a été caractérisée, et nos premiers résultats indiquent que cette enzyme est impliquée dans la production du butyryl-CoA.

Abstract :

Trypanosoma brucei, a flagellated protozoan parasite of the kinetoplastidae order, is responsible for human sleeping sickness or human african trypanosomiasis (HAT). Its life cycle is complex and involves a haematophagous insect vector (tse-tse fly or *Glossina*), which ingests parasites during a blood meal on an infected host. After a series of differentiations, the parasites are injected to another host during another blood meal. Presently, there is no vaccine against HAT and available drugs shows toxicity and drug-resistances are frequently reported in the field. We studied the energy and intermediary metabolism of the procyclic form of *T. brucei*, which is present into the midgut of the tse-tse fly. In this parasite, glucose degradation produces acetate into the mitochondria of the parasite and succinate into both the mitochondria and the glycosomes. Glycosomes are specific organites of trypanosomatids in which the glycolysis is compartmentalized. A metabolic specificity of trypanosomes is the use of an "acetate shuttle" to transfer acetyl-CoA from the mitochondrion to the cytosol to feed *de novo* fatty acids biosynthesis. This acetate production is essential for cell viability. The "acetate shuttle" involves inside the mitochondrion, the acetate:succinate CoA-transferase (ASCT), which converts glucose-derived acetyl-CoA into acetate. During this work, we identified and characterised a new mitochondrial enzyme involved in acetate production from glucose, in addition to ASCT: the acetyl-CoA thioesterase (ACH). Indeed, a double mutant affecting expression of both ACH and ASCT doesn't produce anymore acetate and is lethal, which confirms the essential role of mitochondrial production of acetate. In addition, we showed that ASCT, *via* the ASCT/SCoAS (succinyl-CoA synthetase) cycle, contributes to mitochondrial ATP production by substrate phosphorylation, while, ACH is not involved in ATP production. We also observed that contribution of the ASCT/SCoAS cycle and oxidative phosphorylation by the mitochondrial F₀-F₁-ATP synthase to ATP production are similar.

Threonine is the most rapidly consumed amino acid by the procyclic trypanosomes and its degradation produces equimolar amounts of acetate and glycine. However, its degradation pathway was not investigated so far. Using a combination of reverse genetics, proton NMR metabolic profiling and HPTLC, we characterized the first enzymatic step of the pathway, catalysed by the threonine dehydrogenase (TDH) and showed that threonine is the main carbon source for acetate production and *de novo* fatty acids and sterol biosynthesis. Acetyl-CoA is produced into the mitochondrion from glucose-derived pyruvate by the pyruvate dehydrogenase complex (PDH) and by the two first steps of the threonine degradation pathway, including TDH. Both glucose-derived and threonine-derived acetyl-CoA is then converted into acetate by the same enzymes, ACH and ASCT. We also found that the threonine degradation pathway is under metabolic control. Indeed, TDH activity, TDH expression and threonine-derived acetate production are reduced in the phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) knock out mutant, in which glycolytic flux is redirected towards acetate production. In addition, we showed that, as opposed to glucose-derived acetyl-CoA, metabolism of threonine-derived acetyl-CoA doesn't contribute to ATP production into the mitochondrion of the parasite. Our results suggest the existence of mitochondrial metabolic channelings, which disconnect pyruvate and threonine degradation pathways leading to acetate production.

Trypanosomes developed a specific *de novo* fatty acids biosynthesis pathway using elongases located in the endoplasmic reticulum and an unusual primer, butyryl-CoA. The biosynthetic pathway of butyryl-CoA has not been investigated so far in trypanosomatids. Genomic data mining of the *T. brucei* database, highlights an hypothetical mitochondrial biosynthesis pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA. The last enzyme of this pathway, isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVDH), was characterised and our first results suggest that this enzyme is indeed involved into butyryl-CoA production.