



HAL
open science

Étude d'une mitofusine atypique impliquée dans la dynamique mitochondriale chez *Trypanosoma brucei*

Chloé Morel

► **To cite this version:**

Chloé Morel. Étude d'une mitofusine atypique impliquée dans la dynamique mitochondriale chez *Trypanosoma brucei*. Génétique. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0006 . tel-03982044

HAL Id: tel-03982044

<https://theses.hal.science/tel-03982044>

Submitted on 10 Feb 2023

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Génétique

Par **Chloé Alexandra MOREL**

**Étude d'une mitofusine atypique impliquée
dans la dynamique mitochondriale chez
*Trypanosoma brucei***

Sous la direction du **Docteur Emmanuel TETAUD**

Soutenue le 19 Janvier 2023

Membres du jury :

Dr. Nadine CAMOUGRAND
Dr. Linda KOHL
Pr. Pascale BELENGUER
Dr. Brice ROTUREAU
Dr. Emmanuel TETAUD

Directeur de Recherche, CNRS – Université de Bordeaux
Maître de Conférences – Sorbonne Université
Professeur des Universités – Université de Toulouse
Directeur de Recherche – Institut Pasteur Paris
Chargé de Recherche, CNRS – Université de Bordeaux

Présidente
Rapporteuse
Rapporteuse
Examineur
Directeur

Résumé

Titre : Étude d'une mitofusine atypique impliquée dans la dynamique mitochondriale chez *Trypanosoma brucei*

Les trypanosomes africains sont des parasites unicellulaires responsables de la trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil chez l'Homme, et de la trypanosomiase animale africaine ou Nagana chez le bétail. Au cours de son cycle de vie, le trypanosome se présente sous au moins deux formes répliquatives ; la forme procyclique, retrouvée dans l'insecte vecteur (la mouche tsétsé) et la forme sanguine retrouvée dans l'hôte mammifère. Contrairement à la plupart des autres eucaryotes qui possèdent de nombreuses mitochondries, *Trypanosoma brucei*, n'en possède qu'une seule, qui existe sous deux formes principales : (i) une forme pleinement active et développée caractéristique de la forme procyclique qui possède les complexes de la chaîne respiratoire et utilisant la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie et (ii) une forme fonctionnellement et morphologiquement réprimée que l'on retrouve dans la forme sanguine où l'énergie est produite exclusivement par la glycolyse. Cette unique mitochondrie subit des changements morphologiques drastiques qui reflètent l'adaptation à différents environnements, alternant entre l'hémolymphe et les fluides tissulaires riches en proline de la mouche tsétsé et le sang riche en glucose de l'hôte mammifère. Ce remodelage dynamique de la mitochondrie suggère que les trypanosomes possèdent des mécanismes permettant la fusion et la fission de la mitochondrie.

L'objectif de ma thèse a été d'identifier et de caractériser une protéine pouvant être impliquée dans la dynamique mitochondriale. Nous avons ainsi caractérisé une mitofusine atypique, *TbMfnL* (Tb927.7.2410), impliquée dans le remodelage des membranes mitochondriales. *TbMfnL* présente des similitudes avec les deux dynamines impliquées dans la fusion des membranes mitochondriales chez les cellules de mammifère (Mfn/Opa1) et plus particulièrement avec Mfn qui est la protéine impliquée dans la fusion de la membrane externe de la mitochondrie. Grâce à l'utilisation de techniques de microscopie à fluorescence et de microscopie électronique, nous avons pu montrer que *TbMfnL* est localisée dans les membranes mitochondriales. La surexpression de la protéine *TbMfnL* dans les formes procycliques entraîne une importante modification de la structure mitochondriale avec une forte augmentation des branchements mitochondriaux aboutissant à un phénotype d'hyperfusion.

L'inactivation de la protéine n'a pas révélé de modification de structure, en accord avec le faible niveau des processus de fission mitochondriale observé chez ce parasite. Nous avons également pu démontrer que *TbMfnL* possède un domaine GTPase fonctionnel, la caractérisant comme une protéine de la famille des dynamines. L'analyse approfondie des domaines de la protéine a permis de mettre en évidence l'importance d'une séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS) en N-terminal, non retrouvée chez *HsMfn*, qui est essentielle à la bonne localisation et à la fonction de la protéine. En plus du domaine MTS, les deux domaines transmembranaires identifiés dans la protéine jouent également un rôle important dans la localisation de *TbMfnL*. Nous avons également montré, lors de la surexpression de *TbMfnL*, une stimulation de la biogenèse lipidique qui se traduit par une forte augmentation du volume de la cellule, du noyau et de la mitochondrie. Enfin, nous avons recherché de potentiels partenaires de la protéine *TbMfnL* par BioID, et avons identifié une douzaine de candidats potentiels. L'ensemble de ces données a permis la caractérisation de la première protéine impliquée dans la fusion mitochondriale chez *T. brucei* : *TbMfnL*.

Mots clés : *Trypanosoma brucei*, mitochondrie, dynamique mitochondriale, fusion, mitofusine, *TbMfnL*, métabolisme

Abstract

Title: Study of an unusual mitofusin involved in mitochondrial dynamics in *Trypanosoma brucei*

African trypanosomes are unicellular parasites responsible for African sleeping sickness as well as the related cattle disease Nagana. During the trypanosome life cycle, the parasite exists in at least two replicative forms; the procyclic form, found in the tsetse fly *Glossina* spp., and the bloodstream form found in the vertebrate host. Unlike most other eukaryotes that contain numerous mitochondria, the pathogenic trypanosomes have a single one, which exists in at least two major forms: (i) the fully active and developed one characteristic for the procyclic stage that harbors the oxidative phosphorylation complexes (OXPHOS) for energy production and (ii) the functionally and morphologically repressed form found in the bloodstream stage with energy produced exclusively through glycolysis. The shape and functional plasticity of their single mitochondrion undergoes spectacular changes, reflecting adaptation to different environments, alternating between the proline-rich haemolymph and tissue fluids of the blood-feeding tsetse fly and the glucose-rich blood of a mammalian host. Dynamic remodelling of the organelle suggests that trypanosomes possess fusion and fission machineries.

The objective of my thesis was to identify and characterize a protein that may be involved in mitochondrial dynamics. We characterized an atypical mitofusin, *TbMfnL* (Tb927.7.2410), involved in mitochondrial membrane remodeling. *TbMfnL* shows similarities with the two dynamins involved in mitochondrial membrane fusion in mammalian cells (Mfn/Opa1) and more particularly with Mfn which is involved in mitochondrial outer membrane fusion. Using fluorescence microscopy and electron microscopy techniques, we were able to show that *TbMfnL* is localized in mitochondrial membranes. Overexpression of the *TbMfnL* protein in the procyclic forms leads to an important modification of the mitochondrial structure with a strong increase of the mitochondrial branches leading to a hyperfusion phenotype. Inactivation of the protein did not reveal any structural modification, in agreement with the low level of mitochondrial fission processes observed in this parasite. We were also able to demonstrate that *TbMfnL* has a functional GTPase domain, characterizing it as a dynamin family protein. In-depth analysis of the protein domains has revealed the importance of an N-terminal mitochondria targeting sequence (MTS), not found in *HsMfn*, which is essential for the proper localization and function of the protein.

In addition to the MTS domain, the two transmembrane domains identified in the protein also play an important role in the localization of *TbMfnL*. We have also shown that overexpression of *TbMfnL* stimulates lipid biogenesis resulting in a strong increase in cell, nucleus and mitochondria volumes. Finally, we searched for potential partners of the *TbMfnL* protein by BiolD, and identified a dozen potential candidates. All these data allowed the characterization of the first protein involved in mitochondrial fusion in *T. brucei*: *TbMfnL*.

Key words: *Trypanosoma brucei*, mitochondria, mitochondrial dynamics, fusion, mitofusin, *TbMfnL*, metabolism

Je dédie ce travail à mon grand-père, Papou.

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui a participé à l'avancée de mon projet de thèse, toutes ces personnes sans qui rien n'aurait été possible.

Je souhaiterais remercier les membres du jury, la Pr Pascale Béleuguer, les Drs Linda Kohl, Brice Rotureau et Nadine Camougrand qui ont accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation pour le soutien financier qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse, Dr Emmanuel Tétaud. Merci de m'avoir choisi en Master pour effectuer mon stage avec toi puis d'avoir accepté de continuer cette aventure en thèse. Merci infiniment pour tous tes conseils et tes brillantes remarques qui m'ont permis de réaliser ce beau projet de thèse. Merci de m'avoir fait découvrir ces incroyables parasites que sont les trypanosomes. Un grand merci pour ton soutien permanent, ta disponibilité et ta gentillesse (et les chocolats aussi).

Je tiens à remercier Dr Frédéric Bringaud. Merci pour tous les conseils que tu as pu apporter à ce projet. Merci d'être toujours investi dans chaque projet de cette belle équipe iMet.

Merci aux membres de l'équipe iMet pour ces belles années ensemble. Merci pour l'aide que vous m'avez apportée et tous les bons moments passés au laboratoire. Merci Nico3, Mag, Erika, Pauline et Loïc pour votre gentillesse. Merci à Corinne pour avoir formé un trio de choc avec Manu, merci pour ta gentillesse, ton soutien et tous les moments de rigolades. Merci Yoann (ou Yoyo), mon voisin de bureau, d'avoir partagé tous ces moments à rire et à chanter et merci pour ta mémoire infinie qui m'a sauvée plus d'une fois.

Merci à Simone, Magamba, Oriana, Sarah, Mohammad, Aline, Perrine (aka pp, « on s'est bien trouvé quand même »), Fernanda, Rija de Mada, Julie, Adriana et Chloé #2 (mais bientôt #1) pour les très bons moments passés ensemble et tous les TGIFs.

Merci à tous les membres de Paramyc avec qui ce fut toujours un plaisir de discuter. Merci à Jacqueline, aux Karines, Nico2, Christine, Charlotte, Denis, Derrick, Valérie, Géneviève, Mélanie, Thierry, Anne, Elina, Maxime, Chloé et aux autres. Merci spécial à Nico1 pour avoir partagé le meilleur bureau de paramyc.

Un grand merci à tous mes amis de Bordeaux et d'ailleurs. Merci à Odile, merci d'être une amie formidable.

Un grand merci au club des 5, éparpillé aux quatre coins de l'Europe, mais irremplaçable, merci Johanna, Julian, Sergio et Simon pour les plus belles tofos de nous. Merci à la team BCPP (+ Coco) pour avoir fait de moi une skieuse olympique.

Un merci infini aux meilleurs parents qu'on puisse rêver d'avoir, à ma mère et à mon père, merci de m'avoir toujours soutenue durant toute ma thèse (et avant), merci d'être toujours là pour moi. Un merci immense à la meilleure sœur du monde, Mama merci pour toutes ces folles aventures qu'on a partagées. Merci à ma petite nièce Solinette, qui est un vrai rayon de soleil. Merci à mes grands-mères et mes grands-pères d'être une source intarissable d'inspiration. Merci à l'ensemble des grandes familles Morel et Surre.

Enfin, un grand merci, à mon compagnon, merci pour tous les moments qu'on partage ensemble, merci de toujours m'épauler et de me faire toujours rire. L'aventure de Claujette ne fait que commencer.

Table des matières

Résumé	- 1 -
Abstract	- 5 -
Remerciements	- 11 -
Liste des abréviations	- 19 -
Liste des figures	- 21 -
Liste des tableaux	- 23 -
1. Introduction	- 25 -
1.1. Les trypanosomes africains	- 27 -
1.1.1. La découverte des trypanosomes et de la trypanosomiase	- 27 -
1.1.2. Taxonomie	- 27 -
1.1.2.1. Les parasites	- 27 -
1.1.2.2. Kinetoplastida	- 29 -
1.1.2.3. Trypanosomatidae	- 29 -
1.1.3. La trypanosomiase humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil	- 31 -
1.1.3.1. Les réservoirs de la trypanosomiase humaine africaine	- 33 -
1.1.3.2. Description de la maladie du sommeil	- 33 -
1.1.4. La trypanosomiase animale africaine	- 35 -
1.1.5. Le vecteur : la mouche tsétsé	- 35 -
1.1.5.1. Généralités	- 35 -
1.1.5.2. Cycle de vie de la mouche tsétsé	- 37 -
1.1.5.3. Repas sanguin	- 37 -
1.1.6. Lutte contre la THA	- 39 -
1.1.6.1. Diagnostic	- 39 -
1.1.6.2. Traitements	- 39 -
1.1.6.3. Lutte anti-vectorielle	- 39 -
1.1.7. Cycle de vie de <i>Trypanosoma brucei</i>	- 41 -
1.1.7.1. Dans l'hôte mammifère	- 41 -
1.1.7.2. Dans l'insecte vecteur	- 43 -
1.1.8. Cycle cellulaire	- 43 -
1.1.9. Organisation du parasite	- 45 -
1.1.9.1. Architecture cellulaire et particularités	- 45 -
1.1.9.2. Génome	- 47 -
1.1.9.2.1. Génome nucléaire	- 47 -
1.1.9.2.2. Génome mitochondrial et édition du génome	- 49 -
1.1.9.3. Transcription et régulation des gènes	- 49 -
1.1.9.4. Glycoprotéine de surface (VSG)	- 51 -
1.1.9.5. Variation antigénique	- 51 -
1.1.9.6. Procycline	- 53 -
1.1.9.7. Facteurs trypanolytiques	- 53 -

1.1.10.	Le métabolisme	- 55 -
1.1.10.1.	Forme sanguine	- 55 -
1.1.10.2.	Forme procyclique.....	- 57 -
1.2.	Les mitochondries	- 59 -
1.2.1.	Organisation de la mitochondrie	- 59 -
1.2.1.1.	La membrane externe.....	- 59 -
1.2.1.2.	L'espace intermembranaire.....	- 61 -
1.2.1.3.	La membrane interne.....	- 61 -
1.2.1.4.	La matrice	- 63 -
1.2.2.	La mitochondrie unique de <i>Trypanosoma brucei</i>	- 63 -
1.2.3.	Respiration cellulaire	- 65 -
1.2.4.	Transport à la mitochondrie	- 67 -
1.2.5.	Homéostasie mitochondriale	- 71 -
1.2.5.1.	La biogenèse mitochondriale	- 71 -
1.2.5.2.	La mitophagie	- 73 -
1.2.6.	La dynamique mitochondriale	- 75 -
1.2.6.1.	La fission	- 77 -
1.2.6.1.1.	Drp1 : protéine clé de la fission mitochondriale	- 77 -
1.2.6.1.2.	Autres acteurs de la fission mitochondriale	- 77 -
1.2.6.2.	La fusion mitochondriale	- 81 -
1.2.6.2.1.	Fusion de la membrane externe de la mitochondrie (OMM)	- 81 -
1.2.6.2.2.	Fusion de la membrane interne de la mitochondrie (IMM).....	- 83 -
1.2.6.3.	Modifications post-traductionnelles régulant la dynamique	- 87 -
1.2.6.4.	La dynamique mitochondriale des protistes.....	- 87 -
1.2.6.4.1.	Les apicomplexes.....	- 89 -
1.2.6.4.2.	<i>Trypanosoma brucei</i>	- 91 -
1.2.7.	Interaction des mitochondries avec les autres organelles de la cellule	- 93 -
1.2.7.1.	RE-mitochondrie et le complexe ERMES	- 93 -
1.2.7.2.	La mitochondrie et les autres organelles	- 95 -
1.2.7.3.	Interaction de la mitochondrie chez le trypanosome africain	- 97 -
Objectif :	- 99 -
2.	Matériels et méthodes	- 101 -
2.1.	Matériels	- 103 -
2.1.1.	Les lignées cellulaires	- 103 -
2.1.1.1.	Les trypanosomes	- 103 -
2.1.1.2.	Les leishmanies.....	- 103 -
2.1.1.3.	Les bactéries	- 103 -
2.1.1.4.	Cellules de mammifère	- 105 -
2.1.2.	Milieux de culture	- 105 -
2.1.2.1.	La forme procyclique	- 105 -
2.1.2.2.	La forme sanguine.....	- 105 -
2.1.2.3.	Les leishmanies.....	- 105 -
2.1.2.4.	Les bactéries	- 107 -
2.1.2.5.	Cellules de mammifère	- 107 -
2.1.3.	Vecteurs d'expression	- 107 -
2.1.3.1.	Trypanosomes.....	- 107 -

2.1.3.1.1.	pLew100	- 107 -
2.1.3.1.2.	pHD1336.....	- 109 -
2.1.3.1.3.	pPOT	- 109 -
2.1.3.2.	Leishmanies	- 109 -
2.1.3.2.1.	pNUS	- 109 -
2.1.3.3.	Bactéries	- 111 -
2.1.3.3.1.	pST32	- 111 -
2.1.3.4.	Cellules de mammifère	- 111 -
2.1.3.4.1.	pQCXIB.....	- 111 -
2.2.	Méthodes.....	- 113 -
2.2.1.	Biologie moléculaire.....	- 113 -
2.2.1.1.	Réaction en chaîne par polymérase (PCR)	- 113 -
2.2.1.2.	Purification sur résine S300	- 113 -
2.2.1.3.	Clonage et transformation bactérienne.....	- 113 -
2.2.1.4.	Purification d'ADN génomique	- 115 -
2.2.1.5.	Séquençage	- 117 -
2.2.1.6.	Précipitation à l'éthanol.....	- 117 -
2.2.1.7.	Étiquetage endogène.....	- 117 -
2.2.1.8.	Mutagenèse dirigée	- 119 -
2.2.1.9.	Dosage de l'ADN	- 119 -
2.2.2.	Biologie cellulaire	- 121 -
2.2.2.1.	Courbe de croissance.....	- 121 -
2.2.2.2.	Transfection.....	- 121 -
2.2.2.3.	Clonage des parasites	- 121 -
2.2.2.4.	Transduction virale	- 123 -
2.2.2.5.	ARN interférence	- 123 -
2.2.2.6.	Technique Crispr-Cas9 pour inactivation de gènes	- 123 -
2.2.2.7.	Expression inducible protéine ectopique	- 125 -
2.2.3.	Biochimie	- 125 -
2.2.3.1.	Extraits totaux.....	- 125 -
2.2.3.2.	Western Blot.....	- 127 -
2.2.3.3.	Perméabilisation à la digitonine.....	- 127 -
2.2.3.4.	Gel natif (BN-PAGE).....	- 127 -
2.2.3.5.	Activité des voies métaboliques	- 129 -
2.2.3.6.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	- 131 -
2.2.3.7.	Production protéine recombinante.....	- 131 -
2.2.3.8.	BiOD	- 131 -
2.2.4.	Méthodes d'imagerie	- 133 -
2.2.4.1.	Immunofluorescence	- 133 -
2.2.4.1.1.	Parasites	- 133 -
2.2.4.1.2.	Cellules de mammifère.....	- 135 -
2.2.4.2.	Marquage à la Rhodamine123	- 135 -
2.2.4.3.	Quantification des jonctions mitochondriales.....	- 135 -
2.2.4.4.	Microscopie d'expansion sur ultrastructure (UExM).....	- 137 -
2.2.4.5.	Immuno-microscopie électronique.....	- 139 -
2.2.4.6.	Serial block face	- 139 -
2.2.5.	Statistiques	- 141 -
3.	Résultats	- 143 -
3.1.	Étude et caractérisation de <i>TbMfnL</i>.....	- 145 -
3.1.1.	“An unusual mitofusin is involved in mitochondrial fusion in <i>Trypanosoma brucei</i> ”	- 145 -

3.1.1.1.	Résumé de l'article	- 145 -
3.1.1.2.	Article	- 149 -
3.1.2.	Analyse du métabolisme de ^{oe}TbMfnL::3Ty1	- 231 -
3.1.2.1.	Croissance cellulaire.....	- 231 -
3.1.2.2.	Analyse des flux métaboliques par RMN.....	- 233 -
3.1.3.	Localisation de ^{oe}TbMfnL::3Ty1 dans les membranes mitochondriales	- 235 -
3.1.4.	Capacité de TbMfnL à réaliser à elle-seule la fusion.....	- 239 -
3.1.4.1.	Expression et production dans un système bactérien	- 239 -
3.1.4.2.	Expression hétérologue dans les cellules de mammifère.....	- 241 -
3.1.5.	Conservation dans les autres Kinétoplastidés.....	- 243 -
3.2.	Un complexe de branchement.....	- 245 -
3.2.1.	Organisation de TbMfnL en condition native	- 247 -
3.2.2.	Recherche de partenaires	- 247 -
4.	Discussion et perspectives	- 257 -
4.1.	TbMfnL une protéine atypique	- 259 -
4.1.1.	Où se trouve TbMfnL ?.....	- 259 -
4.1.2.	Un complexe de branchement	- 261 -
4.1.3.	L'hyperfusion mitochondriale et le métabolisme.....	- 263 -
4.1.4.	L'augmentation des volumes cellulaires	- 265 -
4.2.	La dynamique mitochondriale chez <i>Trypanosoma brucei</i>.....	- 265 -
4.2.1.	La fission.....	- 265 -
4.2.2.	La fusion	- 267 -
5.	Bibliographie	- 271 -

Liste des abréviations

Aa	Acide aminé	MAM	Membranes associées à la mitochondrie
ADN (g) (k)	Acide désoxyribonucléique (génomique) (kinétoplastique)	MTS	Séquence d'adressage à la mitochondrie
ADP	Adénosine diphosphate	N	Noyau
Amp	Ampicilline	NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
ARN (m) (i) (g)	Acide ribonucléique (messenger) (interférent) (guide)	OMM	Membrane externe de la mitochondrie
ATOM	Translocase de la membrane externe archaïque	OMS	Organisation mondiale de la santé
ATP	Adénosine triphosphate	PA	Acide phosphatidique
BioID	Identification Biotin dépendante de la proximité	pb	Paire de bases
BSA	Albumine de sérum bovin	PBS	Tampon phosphate salin
BSF	Forme sanguine	PC	Phosphatidylcholine
Cas9	Protéine 9 associée au CRISPR	PCF	Forme procyclique
CC	Coiled-coil	PCR	Réaction en chaîne de polymérase
CL	Cardiolipine	PE	Phosphatidyléthanolamine
CRISPR	Répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées et groupées	PFA	Paraformaldéhyde
Da	Dalton	PFR	Fibre paraflagellaire
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole	pH	Potentiel hydrogène
EM	Microscopie électronique	PVDF	Polyfluorure de vinylidène
ERMES	Structures de rencontre entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie	RE	Réticulum endoplasmique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène	RMN	Résonance magnétique nucléaire
FACS	Tri cellulaire associé à la fluorescence	SDM	Milieu semi-défini
FAD	Flavine adénine dinucléotide	SDS	Sodium dodecyl sulfate
GFP	Protéine fluorescente verte	SVF	Serum de veau fœtal
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	TAA	Trypanosomiase animale africaine
GTP	Guanosine triphosphate	TAC	Complexe d'attachement tripartite
H	Proton	TAO	Oxydase alternative des trypanosomes
HRP	Péroxydase de Raifort	Tb	<i>Trypanosoma brucei</i>
IF	Immunofluorescence	Tet	Tétracycline
IgG	Immunoglobuline G	TetO	Opérateur de la tétracycline
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium	TetR	Répresseur de la tétracycline
IMM	Membrane interne de la mitochondrie	THA	Trypanosomiase humaine africaine

IMS	Espace intermembranaire	TIM	Translocase de la membrane interne
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranoside	TOM	Translocase de la membrane externe
K	Kinétoplaste	UExM	Microscopie d'expansion sur ultrastructure
Ki	Knock-in	UTR	Région non traduit
Ko	Knock-out	VSG	Glycoprotéine de surface variable
LB	Lysogeny Broth	WB	Western blot
Lmx	<i>Leishmania mexicana</i>	WT	Souche sauvage

Liste des figures

Figure 1 : Classification des trypanosomes	- 28 -
Figure 2 : Tendances dans les zones à risque de la trypanosomiase humaine africaine (THA) de 2000-2004 à 2016-2020	- 30 -
Figure 3 : Distribution géographique de la trypanosomiase humaine africaine de 2019-2020 .	30 -
Figure 4 : Cycle de transmission des trypanosomes africains et de la trypanosomiase humaine/animale africaine	- 32 -
Figure 5 : Mouche tsétsé après un repas sanguin et sa représentation schématique.....	- 34 -
Figure 6 : Schéma du cycle de reproduction d'une glossine.....	- 36 -
Figure 7 : Mise en place d'un piège et d'un écran pour lutter contre les mouches tsétsé .	- 40 -
Figure 8 : Cycle de vie de <i>Trypanosoma brucei</i>	- 42 -
Figure 9 : Division de la forme procyclique de <i>Trypanosoma brucei</i>	- 44 -
Figure 10 : Schéma de l'architecture cellulaire de la forme sanguine de <i>Trypanosoma brucei</i> -	46 -
Figure 11 : Architecture du génome nucléaire de <i>Trypanosoma brucei</i>	- 48 -
Figure 12 : Mécanismes de changement de VSG	- 50 -
Figure 13 : Variation antigénique chez <i>Trypanosoma brucei</i>	- 52 -
Figure 14 : Différentes réponses à APOL1 dans les trois sous-espèces de trypanosomes -	54 -
Figure 15 : Multiples voies de production d'ATP dans <i>Trypanosoma brucei</i>	- 56 -
Figure 16 : Schéma d'une mitochondrie	- 58 -
Figure 17 : Section d'une mitochondrie provenant d'un hépatocyte de rat en microscopie électronique	- 58 -
Figure 18 : Composition en phospholipides des membranes mitochondriales.....	- 60 -
Figure 19 : Mitochondrie dans la forme procyclique et dans la forme sanguine de <i>Trypanosoma brucei</i>	- 62 -
Figure 20 : Composition de la chaîne respiratoire de <i>Trypanosoma brucei</i>	- 64 -
Figure 21 : Machinerie de translocation mitochondriale comparative entre les Opisthocontes et <i>Trypanosoma brucei</i>	- 68 -
Figure 22 : Mécanismes de la biogenèse mitochondriale	- 70 -
Figure 23 : Une des voies de la mitophagie	- 72 -
Figure 24 : Dynamique mitochondriale.....	- 74 -
Figure 25 : Comparaison des domaines des protéines Drp1, Mfn1/2 et Opa1 impliquées dans la dynamique mitochondriale.....	- 74 -
Figure 26 : Fission mitochondriale chez la levure et les cellules de mammifère	- 76 -
Figure 27 : Fusion mitochondriale chez les mammifères.....	- 80 -
Figure 28 : Formes longue et courte de Opa1	- 84 -
Figure 29 : Comparaison des systèmes de fission entre la levure, les cellules de mammifère, les parasites Apicomplexes et <i>Trypanosoma brucei</i>	- 88 -
Figure 30 : Le complexe ERMES	- 92 -
Figure 31 : Méthodes d'étiquetage au locus à l'extrémité C-terminale.....	- 116 -
Figure 32 : Principe de l'ARN interférence chez <i>Trypanosoma brucei</i>	- 122 -
Figure 33 : Inactivation des gènes par la technique Crispr-Cas9.....	- 124 -
Figure 34 : Script de la macro développée sur Fiji pour la quantification des jonctions mitochondriales.....	- 134 -
Figure 35 : Courbes de croissance en milieu dépourvu en glucose.....	- 230 -
Figure 36 : Exemples des spectres obtenus par RMN du proton (¹ H-NMR) des produits excrétés finaux provenant du métabolisme de la proline, du glucose et de la thréonine.-	232 -

Figure 37 : Analyse par RMN du proton (¹ H-NMR) des produits excrétés finaux provenant du métabolisme de la proline, du glucose et de la thréonine	- 234 -
Figure 38 : Localisation subcellulaire de ^{oe} TbMfnL::3Ty, ^{oe} TbMfnLΔMTS::3Ty et TbMfnL::10HA par perméabilisation à la digitonine	- 236 -
Figure 39 : Expression et production de la protéine TbMfnL recombinante	- 238 -
Figure 40 : Expression hétérologue et localisation cellulaire de TbMfnL dans des fibroblastes d'embryon de souris (MEF)	- 240 -
Figure 41 : Alignement des séquences des protéines potentielles MfnL dans différents kinétoplastidae	- 242 -
Figure 42 : Structure mitochondriale des souches ^{oe} TbMfnL et KOLmxMfnL chez <i>Leishmania mexicana</i>	- 244 -
Figure 43 : Organisation de TbMfnL en complexe	- 246 -
Figure 44 : Structure mitochondriale de la souche ^{oe} TbMfnL::BirA-3Ty1	- 248 -
Figure 45 : Western blot ^{oe} TbMfnL::BirA-3Ty1	- 248 -
Figure 46 : Localisation des 20 protéines candidates étiquetées avec une GFP en C-terminal par Tryptag	- 252 -
Figure 47 : Comparaison des domaines potentiels des partenaires candidats de TbMfnL-	254

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des traitements et recommandations de l'OMS pour les premier et second stades de la maladie du sommeil ainsi que leurs effets secondaires.....	- 38 -
Tableau 2 : Antibiotiques utilisés.....	- 104 -
Tableau 3 : Amorces.....	- 112 -
Tableau 4 : Anticorps primaires et secondaires.....	- 126 -
Tableau 5 : Protéines identifiées par la technique du BioID	- 250 -
Tableau 6 : Protéines identifiées par la technique du BioID, leur potentielle localisation, essentialité et MTS	- 251 -

1. Introduction

1.1. Les trypanosomes africains

1.1.1. La découverte des trypanosomes et de la trypanosomiase

Les premières preuves de la trypanosomiase remontent à plusieurs milliers d'années, durant l'Antiquité en Égypte ancienne : un papyrus de Kahun Papyri datant de 2 millénaires avant JC décrivait du bétail présentant des symptômes semblables à la trypanosomiase animale africaine aussi appelée Nagana (Steverding 2008). Il a fallu attendre 1374 pour que la maladie du sommeil soit mentionnée pour la première fois à Tombouctou par l'historien Ibn Khaldun. Il relève la mort d'un sultan de l'empire malien, Mari Djata, causée par la maladie du sommeil. Durant l'époque coloniale, la maladie du sommeil est recensée parmi de nombreux esclaves, les marchands d'esclaves recherchant systématiquement des traces d'affections afin d'écartier les malades. C'est en 1734 que la première description de la maladie fut faite par John Atkins, un chirurgien de la marine anglaise. Puis, David Bruce, en 1895, découvre *Trypanosoma brucei* comme l'agent responsable de la Nagana. En 1901, Robert Michael Forbe observe pour la première fois la présence de « vermicules mobiles » dans le sang d'un malade et en 1902, Joseph Everett Dutton identifie le parasite comme « trypanosome » qu'il nommera *Trypanosoma gambiense*. La même année Aldo Castellani, retrouvait les trypanosomes dans le liquide céphalo-rachidien. David Bruce, en 1903, découvre le vecteur de la maladie, la glossine. Puis en 1910, *Trypanosoma rhodesiense* est identifié, par John William Watson Stephens et Harold Benjamin Fantham, comme étant la sous-espèce de trypanosome responsable de la forme aiguë de la maladie. (Cox 2004) (Steverding 2008) (Laveissière et Penchenier 2017).

1.1.2. Taxonomie

1.1.2.1. Les parasites

Les parasites sont classifiés en quatre grands groupes : les micromycètes, les helminthes, les arthropodes et les protozoaires.

- Les micromycètes appartiennent au règne des Fungi. Certaines espèces sont des parasites, responsables de maladies chez les plantes, les animaux ainsi que d'autres champignons.
- Les helminthes ou vers correspondent à des organismes multicellulaires invertébrés, appartenant au règne animal, ils peuvent être des parasites ou non. Ils sont divisés en deux groupes majoritaires les vers plats et les vers ronds.

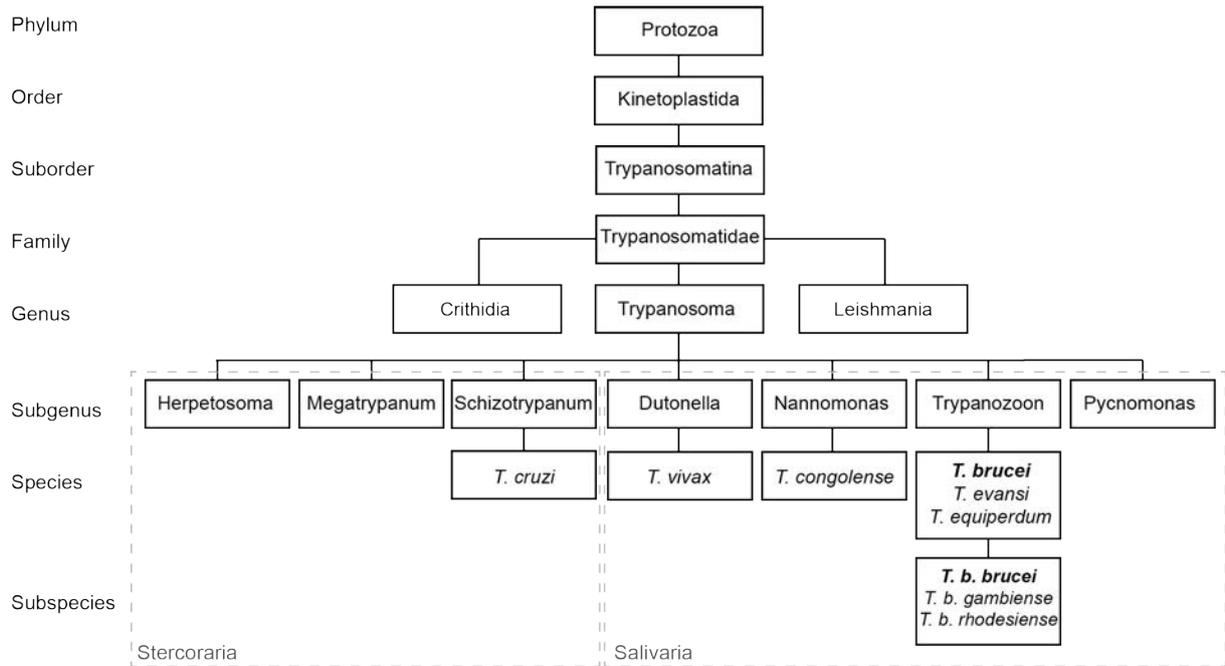


Figure 1 : Classification des trypanosomes
(Baral 2010) basé sur (Hoare 1966).

- Les arthropodes appartiennent au règne animal, ils sont des ectoparasites responsables de nombreuses maladies, ils sont également vecteurs de nombreuses maladies humaines et animales.
- Les protozoaires sont des protistes, organismes eucaryotes unicellulaires, hétérotrophes mobiles. La plupart des protozoaires sont libres ou vivent en symbiose. Cependant, quelques espèces sont des parasites pathogènes responsables de maladies. Les trypanosomes font partie de ce sous-règne des protozoaires.

1.1.2.2. Kinetoplastida

Les trypanosomes sont des parasites protozoaires, eucaryotes unicellulaires, appartenant à l'ordre des Kinetoplastida. L'ordre des kinétoplastidés comprend un groupe de protozoaires possédant une mitochondrie unique géante à l'intérieur de laquelle l'ADN mitochondrial est compacté formant une structure dense appelée kinétoplaste (Vickerman et Preston 1976). L'ordre des Kinétoplastidés est divisé en deux sous-ordres : les Bodonina et les Trypanosomatina. Le sous-ordre des Bodoninés, kinétoplastidés possédant deux flagelles, comprend deux familles : les Bononidae et les Cryptobiidae. Le second sous-ordre, les Trypanosomatidés, comprend une seule famille les Trypanosomatidae possédant un unique flagelle (Levine et al. 1980). Les trypanosomatidés infectent l'ensemble des classes de vertébrés et certains invertébrés tels que les plantes.

1.1.2.3. Trypanosomatidae

Parmi l'ensemble des Trypanosomatidae, deux genres sont connus pour être des pathogènes majeurs : *Leishmania spp* et *Trypanosoma spp* (**Fig. 1**). Ils sont responsables de maladies chez l'Homme et d'autres animaux à l'échelle mondiale causant des pertes sociétales et économiques majeures.

- *Leishmania spp*, comprenant plus de 20 espèces pathogènes de l'Homme, est responsable de la leishmaniose chez l'Homme et d'autres mammifères. Il est transmis à l'hôte vertébré par la piqûre d'un phlébotome (moucheron morphologiquement proche du moustique). Il existe trois formes de la maladie : la leishmaniose cutanée, viscérale et cutanéomuqueuse. Plus d'un milliard de personnes vivent dans des régions endémiques et sont à risques, et une estimation de 30 000 nouveaux cas de leishmaniose viscérale et 1 million de leishmaniose cutanée sont dénombrés chaque année.

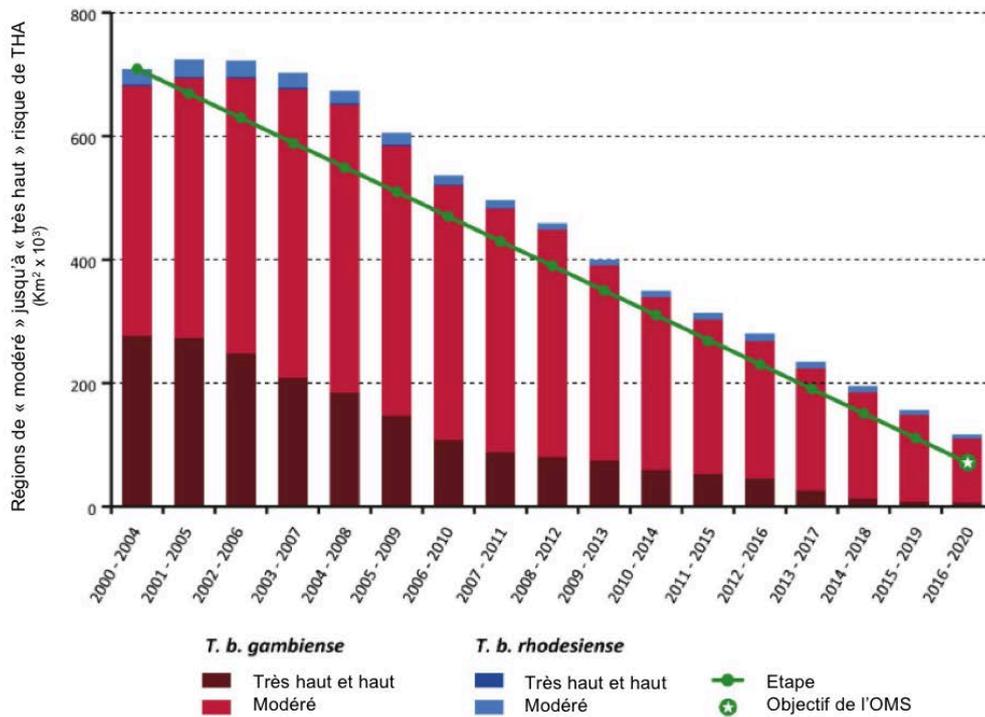


Figure 2 : Tendances dans les zones à risque de la trypanosomiase humaine africaine (THA) de 2000-2004 à 2016-2020

Zones à risque modéré jusqu'à très élevé pour la THA par *T. b. gambiense* (rouge) et *T. b. rhodesiense* (bleu). La ligne verte représente les objectifs fixés par le groupe stratégique et consultatif de l'OMS sur les maladies tropicales négligées afin d'aboutir à l'élimination de la THA comme problème de santé publique d'ici 2020. (Franco et al. 2022)

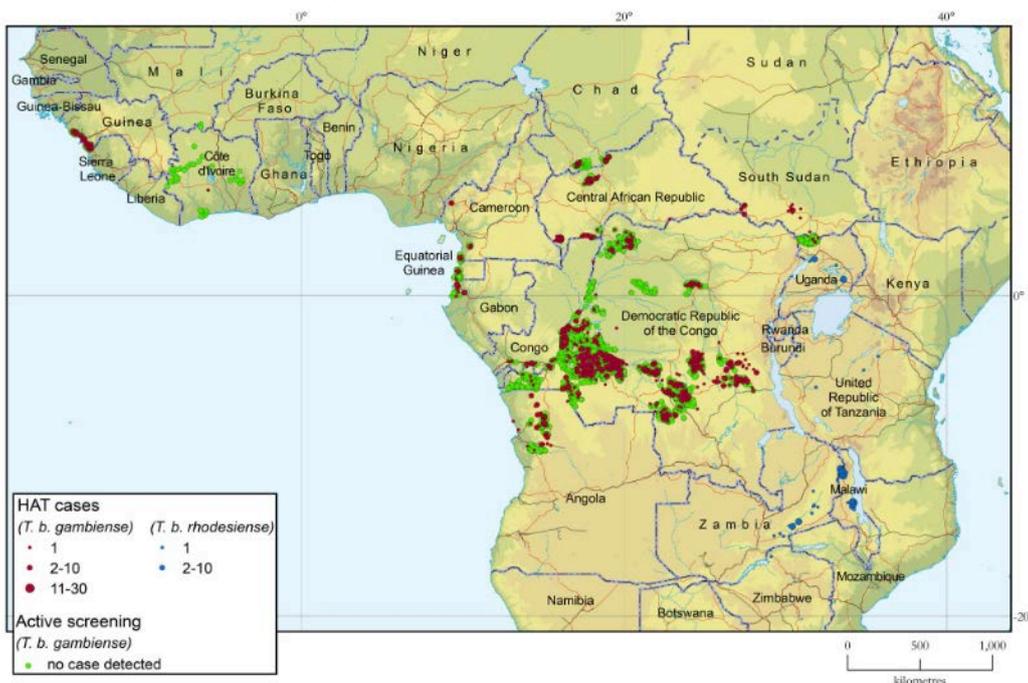


Figure 3 : Distribution géographique de la trypanosomiase humaine africaine de 2019-2020

Carte représentant le nombre de cas à infection par *T. b. gambiense* (rouge) et *T. b. rhodesiense* (bleu) et les zones sans cas détecté après un dépistage actif à *T. b. gambiense* (vert). (Franco et al. 2022)

- *Trypanosoma cruzi* est principalement retrouvé en Amérique Centrale et du Sud où il est responsable de la trypanosomiase américaine aussi appelé maladie de Chagas. Il est transmis par le contact avec les fèces ou l'urine de la punaise hématophage ou triatome. Il est responsable de l'infection de 6 à 7 millions de personnes (donnée de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2020) dans 21 pays du continent américain.
- *Trypanosoma brucei* est responsable de la trypanosomiase africaine ou maladie du sommeil. Retrouvé en Afrique Sub-Saharienne, il est transmis par l'intermédiaire de la morsure de la mouche tsétsé ou glossine. *T. brucei* (*T. b.*) possède trois sous-espèces : *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*.

1.1.3. La trypanosomiase humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil

La trypanosomiase humaine africaine (THA) aussi appelée maladie du sommeil est causée par le parasite *T. brucei*, transmis à l'hôte définitif par son vecteur la mouche tsétsé. Malgré des faibles cas reportés d'auto-guérison (Jamonneau et al. 2012), la maladie du sommeil est mortelle sans traitement.

La THA est causée par deux sous-espèces de *T. brucei* ; *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*. La trypanosomiase sévit dans 36 pays africains subsahariens avec une estimation de 55 millions de personnes à risques (**Fig. 2**). *T. b. rhodesiense* cause une infection aiguë avec une progression rapide, la mort de l'hôte arrivant généralement quelques mois après le début de l'infection. Il est présent dans 13 pays de l'Est et du Sud du continent africain. *T. b. gambiense* est responsable de la majorité des cas de THA (97 % des cas entre 2000 et 2009) (Simarro et al. 2011). Il est retrouvé dans 24 pays de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Il cause une infection chronique avec une évolution lente qui dure en moyenne 3 ans. (Checchi, Filipe, Haydon, et al. 2008).

Trois grandes épidémies ont touché l'Afrique au cours du 20^{ème} siècle. La première, de 1896 à 1906, a fait entre 300 000 et 500 000 victimes principalement en Ouganda et au Congo. La deuxième est survenue en 1920 et enfin la troisième entre 1970 et 1990. Grâce au dépistage, à la lutte et à la surveillance sans relâche, le nombre de cas aujourd'hui a fortement diminué pour atteindre 992 cas en 2019 et 663 en 2020 selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) (**Fig. 3**).

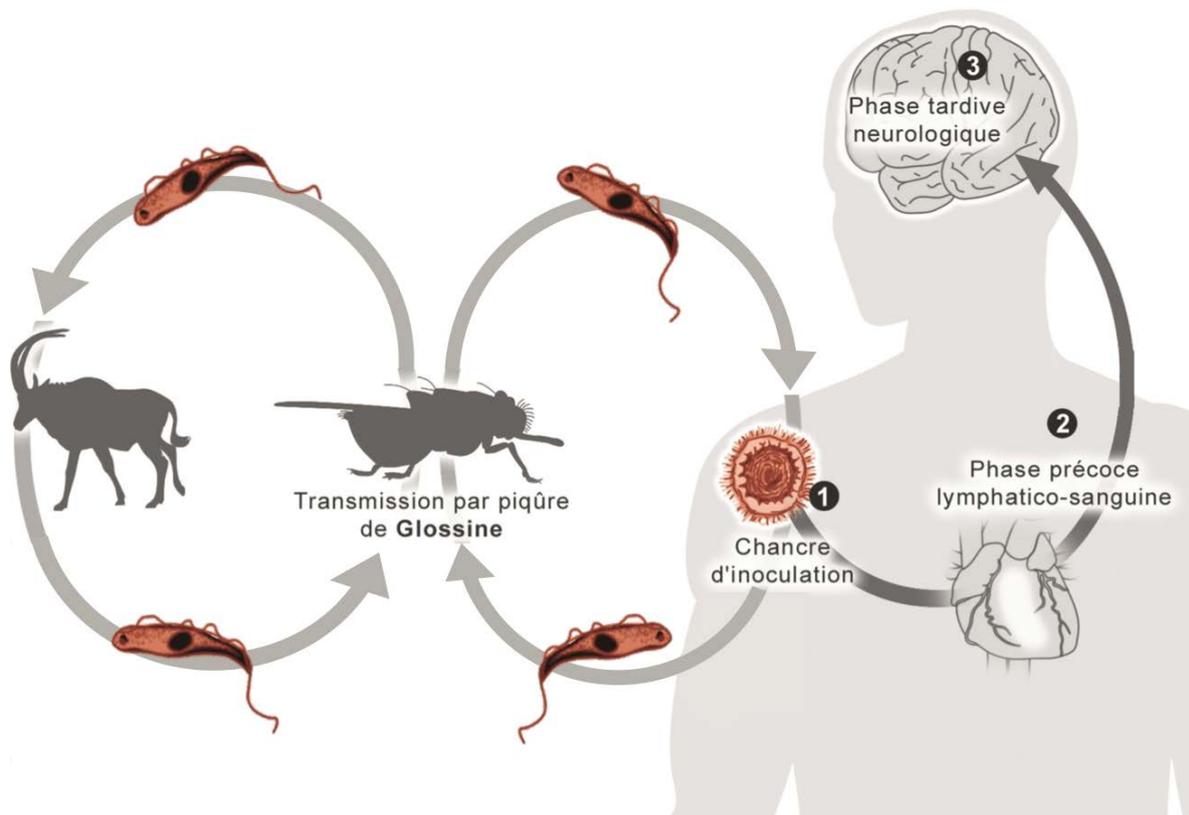


Figure 4 : Cycle de transmission des trypanosomes africains et de la trypanosomiase humaine/animale africaine

Transmission des trypanosomes par une glossine infectée sur un hôte sain humain ou animal. Au niveau du site de morsure, un chancre d'inoculation peut être observé. La phase précoce de la maladie est la phase hémolymphatique et la seconde phase est la phase méningo-encéphalique.

Adapté de la source : association française des enseignants de parasitologie et mycologie.

1.1.3.1. Les réservoirs de la trypanosomiase humaine africaine

Le réservoir majoritaire de *T. brucei gambiense* est l'Homme, ceci est en particulier lié au fait que l'infection dure plusieurs années, permettant un maintien du cycle mouche tsétsé – humain. Néanmoins, il existe d'autres réservoirs tels que des animaux sauvages ou domestiques, mais l'importance de ces réservoirs dans l'épidémiologie de l'infection humaine reste incomprise. En ce qui concerne *T. brucei rhodesiense*, de nombreuses espèces animales sauvages ou domestiques ont été identifiées comme potentiels réservoirs de la maladie (Hide et al. 1991) (Welburn et al. 2001). En effet, la THA transmise par *T. brucei rhodesiense* est une zoonose. Parmi ces animaux on retrouve notamment des bovins tels que le guib (Heisch, McMAHON, et Mansonbahr 1958), le lion, la girafe, le zèbre. Les animaux domestiques, avec notamment le porc domestique, sont également considérés dans beaucoup de régions d'Afrique comme un réservoir important de la maladie (Waiswa, Olaho-Mukani, et Katunguka-Rwakishaya 2003) (von Wissmann et al. 2011).

1.1.3.2. Description de la maladie du sommeil

Deux phases sont retrouvées dans la maladie du sommeil. Dans la première, nommée stade hémolympatique, les trypanosomes sont retrouvés dans le système sanguin et lymphatique. Durant la seconde phase, nommée stade méningo-encéphalique, les parasites vont être capables de passer la barrière hémato-encéphalique puis envahir le système nerveux central, c'est la phase critique de la maladie. Cette seconde phase peut prendre plusieurs années, après contamination, pour apparaître. Après une morsure par une mouche tsétsé infectée par des trypanosomes, celle-ci va, par le biais de sa salive, déverser des trypanosomes à l'intérieur de l'hôte. Au niveau de la zone de morsure, un chancre peut être observé sur les hôtes infectés par *T. brucei rhodesiense* dans 20 % des cas, mais très rarement pour une infection par *T. brucei gambiense*. Les symptômes, caractéristiques de la première phase de la maladie, sont une fièvre irrégulière et chronique, des céphalées, des douleurs articulaires ainsi que des adénopathies. La seconde phase de la maladie se caractérise par des troubles neurologiques, notamment des troubles du sommeil avec un dérèglement du cycle circadien (Kennedy 2006). Ce sont les symptômes de la seconde phase qui sont à l'origine du nom « maladie du sommeil ». D'autres symptômes neurologiques sont observés tels que la confusion, des tremblements, et une faiblesse au niveau de la motricité générale. En phase terminale de la maladie, l'atrophie et la démyélinisation du système nerveux central conduisent à des troubles de la conscience et à la démence qui est suivie d'un coma puis du décès (Jamonneau et al. 2002) (**Fig. 4**).

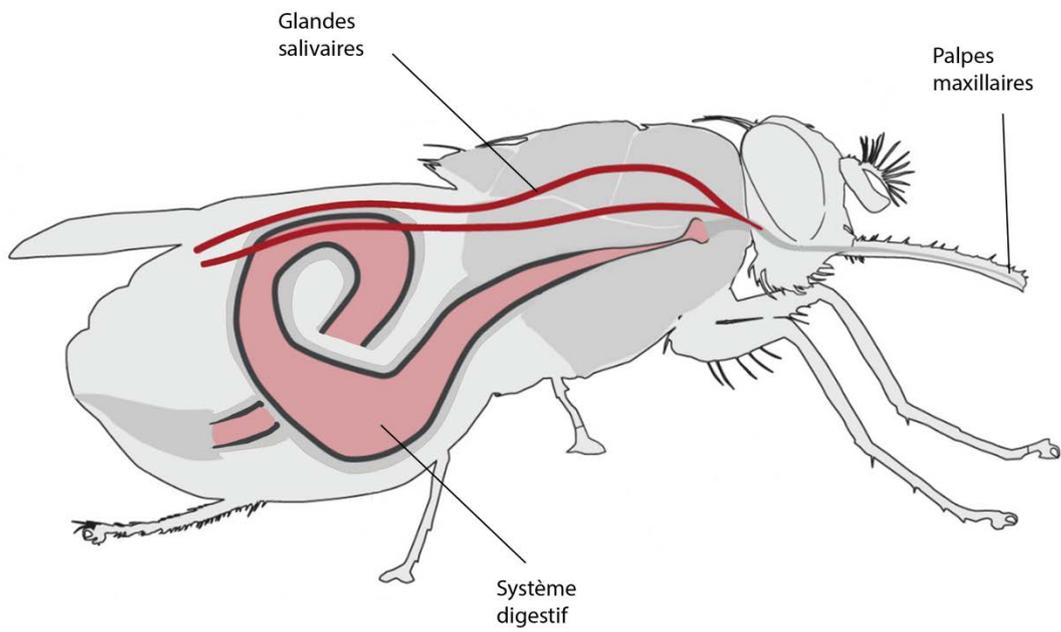


Figure 5 : Mouche tsétsé après un repas sanguin et sa représentation schématique
Source : Geoffrey Attardo et adapté de (Aksoy 2019)

1.1.4. La trypanosomiase animale africaine

La trypanosomiase animale africaine (TAA) est une maladie parasitaire touchant de nombreux mammifères sauvages ou domestiques sur le continent africain. Dans le cas d'infection chez le bétail, la maladie est aussi appelée Nagana. Elle aboutit à de la faiblesse, de l'anémie et une perte importante de poids, et peut être fatale sans traitement. La TAA est causée par trois espèces majoritaires de trypanosomes, *T. vivax*, *T. congolense* et *T. brucei brucei*. La perte économique liée à la trypanosomiase animale africaine est estimée à plus de un milliard de dollars américains chaque année (Kristjanson et al. 1999). Cette perte économique est liée à la réduction de bétails comme force de traction pour l'agriculture, de la production de viande et de lait et limite fortement la croissance du secteur de l'élevage (Ilemobade 2009).

1.1.5. Le vecteur : la mouche tsétsé

1.1.5.1. Généralités

Les glossines ou mouches tsétsé ont été classifiées dans l'ordre des diptères et le genre *Glossina*, il existe 33 espèces et sous-espèces (Elsen, Amoudi, et Leclercq 1990) (Leak 1998) (**Fig. 5**). Ce sont des mouches hématophages retrouvées sur le continent Africain uniquement. La répartition géographique des mouches tsétsé s'étend sur plus de 10 millions de km², elle débute au sud du désert Saharien jusqu'au Nord des déserts de Namibie et Kalahari.

Elles peuvent être regroupées en trois sous-groupes en fonction de leur habitat ; *palpalis* est retrouvée proche d'un paysage fluvial, *morsitans* dans un climat tropical de savane, *fusca* dans des environnements forestiers.

- Le sous-genre *Nemorhina*, groupe de *palpalis* ; la majorité du groupe est retrouvée dans l'Ouest et le Centre Afrique. Les espèces de ce groupe font partie du principal vecteur de la THA dans l'Ouest et le Centre Afrique, et ce groupe est un vecteur important de la trypanosomiase animale.
- Le sous-genre *Glossina (sensu stricto)*, groupe de *morsitans* ; ce groupe est retrouvé dans la savane proche du bétail et de la faune sauvage. Certaines espèces sont des vecteurs de la trypanosomiase humaine africaine et de la trypanosomiase animale africaine.
- Le sous-genre *Austenina*, groupe de *fusca* ; le groupe n'est pas responsable de la transmission du THA, mais certaines espèces sont des vecteurs de la trypanosomiase animale.

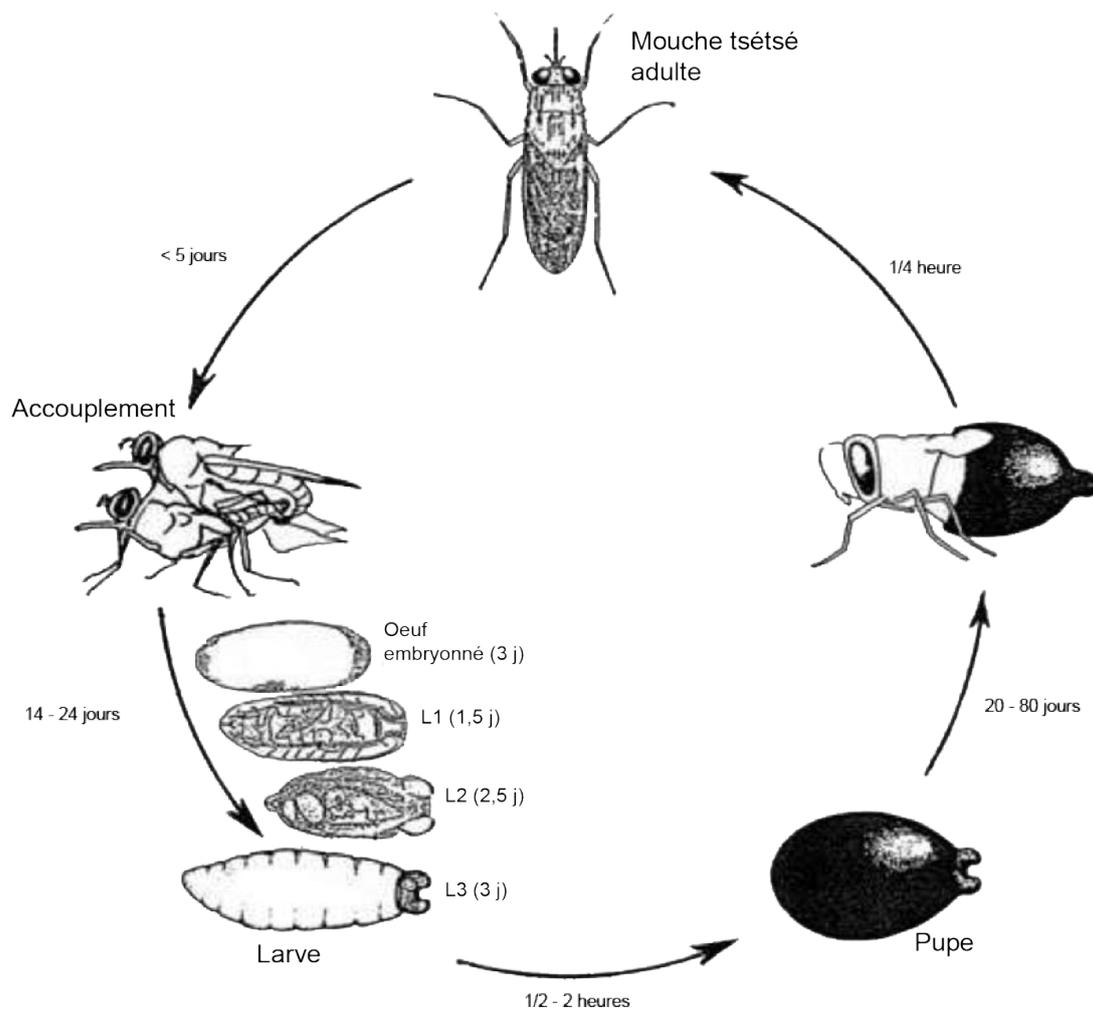


Figure 6 : Schéma du cycle de reproduction d'une glossine

Après l'accouplement, le développement de l'œuf et de la larve a lieu dans l'utérus de la femelle, puis vient la ponte de la larve et enfin la transformation en pupa et l'émergence d'un nouvel adulte. (Cuisance 1989)

Les premières descriptions des glossines ont été effectuées en 1830 par Wiedemann. Les mouches tsé-tsé vivent à des températures entre 16 °C et 30 °C et un taux d'humidité entre 50 % et 80 %. Leur durée de vie varie entre 5 à 7 mois en fonction de la saison. Leur taille est comprise entre 6 et 16 mm, sans la trompe permettant la succion appelée proboscis. Les mâles sont généralement plus petits que les femelles. Les pièces buccales, situées à la base de la tête, sont longues et pointues et sont protégées par des palpes maxillaires (**Fig. 5**). (Leak 1998) (World Health Organization et WHO Expert Committee on the Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis 2013)

1.1.5.2. Cycle de vie de la mouche tsé-tsé

Les mouches femelles s'accouplent une seule fois au cours de leur vie, le sperme du mâle est stocké dans un spermatophore et sera utilisé par la femelle pour produire les œufs. Les femelles adultes produisent un seul œuf qui éclot à l'intérieur de l'utérus sous la forme d'un premier stade larvaire. Après plusieurs phases de développement, la larve est déposée sur le sol au troisième stade larvaire. Une mouche adulte est formée après un stade pupaire, d'environ 30 jours. Une femelle produit une seule larve tous les 9 à 10 jours, de ce fait le taux de reproduction est faible (environ 50 jours). Cette méthode de reproduction qui consiste à l'éclosion puis au développement de la larve jusqu'au troisième stade larvaire à l'intérieur de l'utérus s'appelle la viviparité adénotrophique. (Leak 1998) (World Health Organization et WHO Expert Committee on the Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis 2013) (**Fig. 6**).

1.1.5.3. Repas sanguin

Les mâles ainsi que les femelles sont hématophages, la prise de repas sanguin est indispensable à leur cycle de vie. La fréquence des repas sanguins est d'environ trois jours, même si cela varie en fonction de l'espèce de mouche, du sexe, de l'âge et de l'environnement. La peau de l'hôte est percée par la trompe ou proboscis de la mouche, puis la mouche tsé-tsé va directement pomper le sang de l'hôte. L'injection de salive par l'hypopharynx de l'insecte empêche la coagulation du sang de l'hôte et entraîne un effet vasodilatateur. Si la mouche est infectée par des trypanosomes, ceux-ci seront transmis à l'hôte par la salive. (Leak 1998) (World Health Organization et WHO Expert Committee on the Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis 2013).

Maladie et stade	Première ligne de traitement	Date de première utilisation	Effets secondaires indésirables
Gambiense THA			
Premier stade	Pentamidine	1937	Hypotension, nausées, toxicité rénale, pancréatique
Second stade	Nifurtimox-Eflornithine (combinaison) NECT	2009	Troubles gastro-intestinaux, neurologiques et psychiques
Premier et second stade	Flexinidazole	2018	Nausée, vomissement, dyspepsie, douleur abdominale
Premier et second stade	Acoziborole	En cours d'essai clinique	
Rhodesiense THA			
Premier stade	Suramine	1922	Toxicité rénale et cutanée
Second stade	Melarsoprol	1949	Syndrome d'encéphalopathie grave

Tableau 1 : Liste des traitements et recommandations de l'OMS pour les premier et second stades de la maladie du sommeil ainsi que leurs effets secondaires

Adapté du rapport technique de l'OMS sur le contrôle et la surveillance de la trypanosomiase humaine africaine.

1.1.6. Lutte contre la THA

1.1.6.1. Diagnostic

Les signes cliniques et les symptômes de la maladie sont variés et peu spécifiques, le diagnostic de la maladie uniquement sur ces critères est difficile, par conséquent d'autres méthodes de diagnostic sont essentielles pour identifier la maladie, l'espèce de trypanosome impliquée et le stade de la maladie. Pour une infection à *T. b. gambiense*, des tests antigéniques sont utilisés en première intention. Dans le cas d'une infection par *T. b. rhodesiense*, il n'existe pas de tests sérologiques, la suspicion de THA est effectuée sur la symptomatologie. Dans les deux cas, une confirmation de la maladie par détection des trypanosomes dans les fluides corporels est effectuée. Une fois la confirmation de la présence de trypanosomes, un examen du liquide céphalorachidien est réalisé pour déterminer le stade de la maladie.

1.1.6.2. Traitements

Il existe plusieurs traitements pour la maladie du sommeil. Le type de traitement à délivrer dépend de la forme et du stade de la maladie. Au total, 6 médicaments sont utilisés pour soigner la maladie du sommeil, ils sont délivrés par l'OMS aux différents pays endémiques. Les médicaments utilisés pour traiter la première phase de la maladie sont la Pentamidine et la Suramine. La Pentamidine est utilisée contre les infections à *T. b. gambiense* et la Suramine contre *T. b. rhodesiense*. Les médicaments utilisés pour traiter la seconde phase de la maladie, possèdent des effets secondaires indésirables non négligeables, sont le Melarsoprol, l'Eflornithine et le Nifurtimox. Le Melarsoprol est utilisé contre *T. b. rhodesiense*. Le Nifurtimox et l'Eflornithine (NECT) sont utilisés en combinaison contre *T. b. gambiense*. Enfin, le Flexinidazole est utilisé pour les deux stades de la maladie causée par *T. b. gambiense*, il est le premier traitement oral disponible depuis 2020 (Pollastri 2018) (Lindner et al. 2020). Un nouveau médicament oral en une seule prise nommé l'Acoziborole est en cours d'essai clinique (Dickie et al. 2020) (**Tab. 1**)

1.1.6.3. Lutte anti-vectorielle

La lutte anti-vectorielle vise à réduire le nombre d'insectes et arthropodes responsables de la transmission de maladies.



Figure 7 : Mise en place d'un piège et d'un écran pour lutter contre les mouches tsésé
Les pièges et écrans sont placés dans des zones à risques proches du bétail et des cours d'eau. Source : Biovision et © RFI/Igor Strauss

Dans le cas de la maladie du sommeil, les méthodes de lutte contre la mouche tsétsé qui sont opérées depuis plusieurs années se sont avérées efficaces. La première méthode utilisée fut la destruction de l'habitat des glossines ; cette méthode largement abandonnée aujourd'hui consistait en la destruction de la faune et de la flore menant à une réduction des ressources alimentaires et des zones de vie de la mouche. Découverte depuis de nombreuses années, une autre technique consiste en la mise en place de pièges (Green 1994). Les pièges et écrans visant à capturer les mouches tsétsé représentent un des moyens de lutte les moins coûteux, facilement mis en place et faiblement à risque pour l'environnement et les habitants. Il existe de nombreux modèles de pièges, généralement les pièges consistent en deux écrans, l'un de couleur bleu et l'autre de couleur noir (Green 1989) (Flint 1985). Le bleu ayant été décrit comme la couleur d'attraction des mouches tsétsé la plus efficace (Green 1988). Une fois les mouches attirées par l'écran, celles-ci vont venir se faire piéger dans un sac pouvant être imprégné d'insecticide (Allsopp 1984). Généralement, les pièges sont installés dans les régions à risques, proches de cours d'eau, ou proches du bétail et des habitations (**Fig. 7**). Les insecticides les plus efficaces permettent de tuer rapidement les glossines et restent efficaces dans le temps. Une autre technique anti-vectorielle consiste en la pulvérisation d'insecticides directement sur la végétation. Cette méthode est plus chère et dangereuse pour l'environnement et la population, mais s'avère efficace en cas d'urgence. Enfin, la technique de l'insecte stérile (SIT) (Dyck, Hendrichs, et Robinson 2005), a été mise en place dans plusieurs pays africains afin de réduire le nombre de mouches tsétsé (Vreysen et al. 2000) (Takken et al. 1986). La méthode consiste à irradier des mouches mâles afin de les rendre stériles puis de les relâcher dans l'environnement pour qu'ils aillent s'accoupler avec des femelles pour empêcher leur reproduction.

1.1.7. Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*

Le cycle de vie de *T. brucei* est complexe, il est transmis à l'hôte mammifère par l'intermédiaire de son vecteur la mouche tsétsé. A l'intérieur de ces deux hôtes, il subira des changements drastiques d'environnement et de morphologie.

1.1.7.1. Dans l'hôte mammifère

Lors d'une morsure d'un hôte mammifère sain par une mouche tsétsé infectée, celle-ci déverse dans la circulation sanguine des trypanosomes métacycliques, présents dans la salive de la mouche.

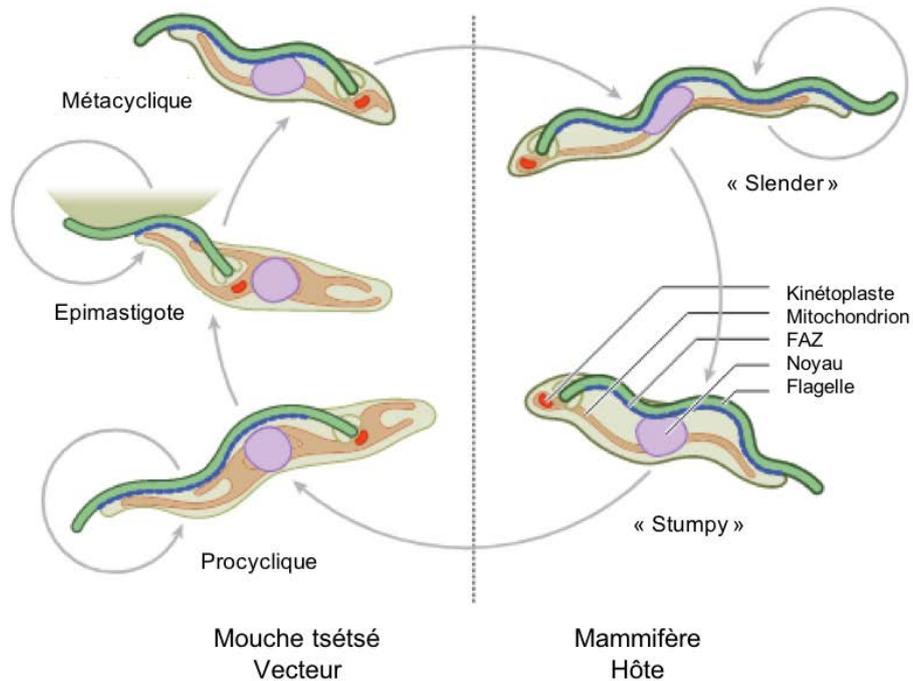


Figure 8 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*

Le cycle de vie se répartit en cinq stades. Dans l'hôte mammifère, la forme proliférative « slender » sanguine peut se différencier en forme non répliquative « stumpy », forme pré-adaptée à la transmission à la mouche tsétsé. Dans l'insecte vecteur, la forme proliférative procyclique est retrouvée au niveau de l'intestin moyen avant de migrer en direction des glandes salivaires, se différenciant alors en forme épimastigote à répliquative asymétrique capable d'adhérer aux surfaces des glandes salivaires puis en forme métacyclique non répliquative, pré-adaptée pour la transmission à l'hôte. FAZ : zone d'attachement au flagelle. Adapté de (Wheeler, Gull, et Sunter 2019).

Les formes métacycliques se différencient en une forme sanguine trypomastigote répliquative longue dite « slender », qui se multiplie dans le sang. Elle peut également envahir d'autres organes et notamment le cerveau et le système nerveux central (SNC). *T. b. rhodesiense* est retrouvé dans le SNC en quelques semaines alors qu'il faut entre 300 et 500 jours pour *T. b. gambiense* (Odiit, Kansime, et Enyaru 1997) (Checchi, Filipe, Barrett, et al. 2008). La forme « slender » peut également se différencier dans le sang ou autres organes et tissus en une forme trypomastigote non répliquative courte dite « stumpy ». La forme « stumpy » est pré-adaptée à l'environnement de la mouche, avec l'apparition d'un manteau de procycline et la réactivation de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Fenn et Matthews 2007) (**Fig. 8**).

1.1.7.2. Dans l'insecte vecteur

En cas d'une morsure d'une mouche tsé-tsé sur un hôte infecté par *T. brucei*, celle-ci ingère des trypanosomes au cours de son repas sanguin. A l'intérieur de l'estomac de la mouche, quelques heures après l'ingestion, les trypanosomes se différencient en une forme procyclique. La forme procyclique est répliquative, elle se multiplie à l'intérieur de l'intestin moyen de la mouche puis migre en direction des glandes salivaires. En cours de migration, au niveau du proventricule, la forme procyclique se différencie en forme épimastigote, accompagnée par la migration du kinétoplaste au niveau antérieur du noyau (Sharma et al. 2008). La forme épimastigote possède la particularité d'exercer une division asymétrique avec la formation d'un épimastigote long et d'un épimastigote court (Van Den Abbeele et al. 1999). La forme longue est répliquative tandis que la forme courte est non répliquative. Les trypanosomes migrent jusqu'aux glandes salivaires, à ce stade les formes épimastigotes courtes s'attachent à l'épithélium des glandes salivaires par leur flagelle et s'allongent pour finir par se différencier en une forme métacyclique qui sera relâchée dans le lumen (Tetley et Vickerman 1985). La forme métacyclique est la forme infectieuse pré-adaptée à l'environnement de l'hôte, elle possède notamment un manteau de glycoprotéine variable de surface (VSG). La durée de développement présent à l'intérieur de la glossine varie en moyenne entre 20 et 30 jours (Rotureau et Van Den Abbeele 2013) (**Fig. 8**).

1.1.8. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire de *T. brucei*, comporte 4 phases comme pour les autres eucaryotes, G₀/G₁, S, G₂ et M.

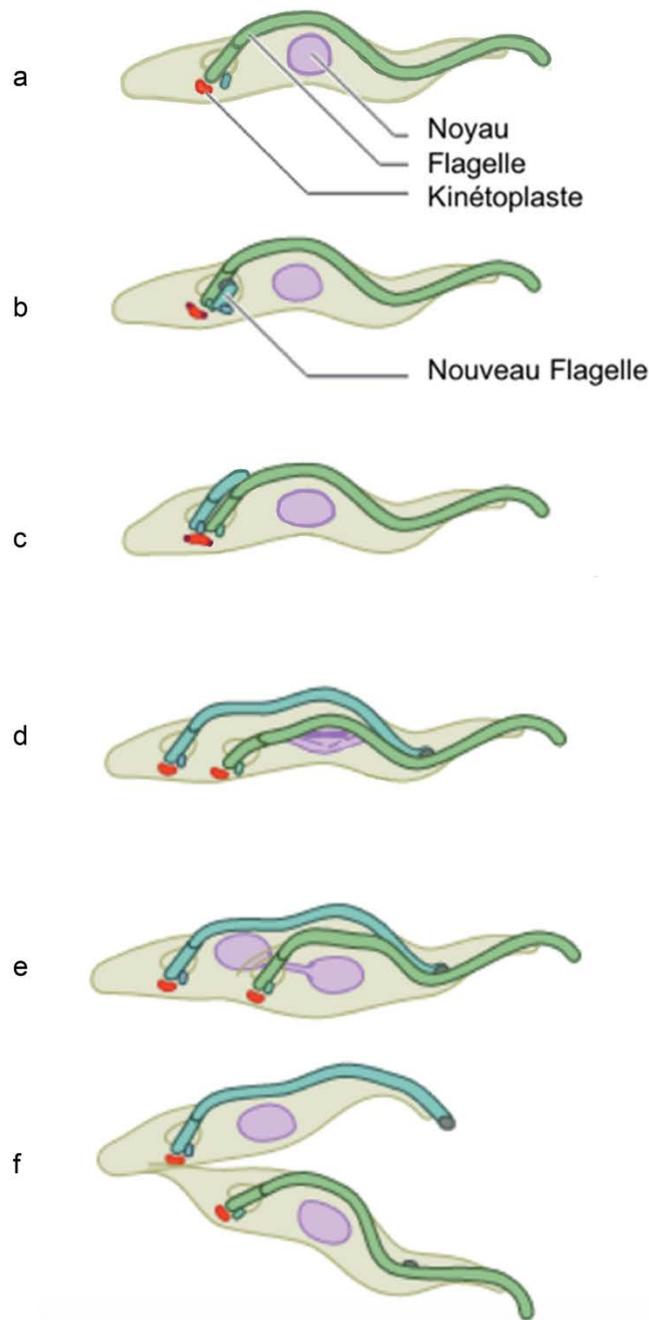


Figure 9 : Division de la forme procyclique de *Trypanosoma brucei*

Événements clés du cycle cellulaire de la forme procyclique de *T. brucei*. (a) Cellule en G1 avec un seul noyau (N) et kinétoplaste (K) (1K1N) (b) Apparition d'un second corps basal et émergence du nouveau flagelle (c) Début de la division du kinétoplaste, il présente une forme allongée (d) Séparation des deux corps basaux qui induit une séparation des deux kinétoplastes. Les cellules sont alors en 2K1N. Début de la mitose. (e) Le noyau est en phase de mitose, ce qui aboutit à la formation de deux noyaux. Les cellules sont en 2K2N. (f) Début de la cytokinèse, clivage des deux cellules entre les deux flagelles. A la fin de la cytokinèse, deux cellules filles sont formées. Adapté de (Wheeler et al. 2019).

Il est extrêmement organisé et régulé afin de coordonner la division du noyau mais aussi des autres organelles uniques. Le parasite en G1 est décrit avec un kinétoplaste, correspondant à l'ADN mitochondrial, et un noyau (1K1N). Le début du cycle cellulaire est caractérisé par l'élongation et la maturation du pro-corps basal et l'émergence du nouveau flagelle. Puis la réplication du kinétoplaste (phase S) débute juste avant celle du noyau, suivie de la phase G2 et la ségrégation du kinétoplaste (2K1N). La phase S du noyau est plus longue que celle du kinétoplaste ainsi que la phase G2 qui suit. Enfin, la mitose (M) permet la division des deux noyaux (2K2N). Durant la phase G2 du noyau, les corps basaux se séparent conduisant à la séparation des deux kinétoplastes grâce à un complexe d'attachement tripartite (TAC) qui assure la liaison entre le corps basal et le kinétoplaste (Ogbadoyi, Robinson, et Gull 2003). Enfin le parasite se divise en deux selon un axe longitudinal de façon unidirectionnelle de la partie antérieure à la partie postérieure passant entre les deux flagelles (Robinson et al. 1995) (Wheeler et al. 2019) (**Fig. 9**).

1.1.9. Organisation du parasite

1.1.9.1. Architecture cellulaire et particularités

T. brucei est un parasite unicellulaire flagellé mesurant environ 20-25 µm de long et 3-5 µm de large pour la forme procyclique et 15 µm de long et 2 µm de large pour la forme sanguine. La forme du parasite est maintenue par un cytosquelette de microtubules subpelliculaires (**Fig. 10**). Il possède un flagelle, qui lui confère sa motilité et sa mobilité, émergeant de la partie postérieure du parasite au niveau des corps basaux, proche de la poche flagellaire. Le flagelle est attaché à l'ensemble du corps cellulaire, jusqu'à la partie antérieure où son extrémité est libre, cette zone d'attachement du flagelle est nommée FAZ. Le flagelle a une structure axonémale conventionnelle, composée de 9 microtubules périphériques et 2 centraux, associée à une tige paraflagellaire (Vaughan et Gull 2003). La poche flagellaire correspond à une invagination de la membrane plasmique qui est le site unique d'endocytose et d'exocytose (Overath et Engstler 2004).

Le génome mitochondrial est compacté en une structure dense nommé kinétoplaste, c'est une structure large pouvant être révélée par des colorants spécifiques de l'ADN.

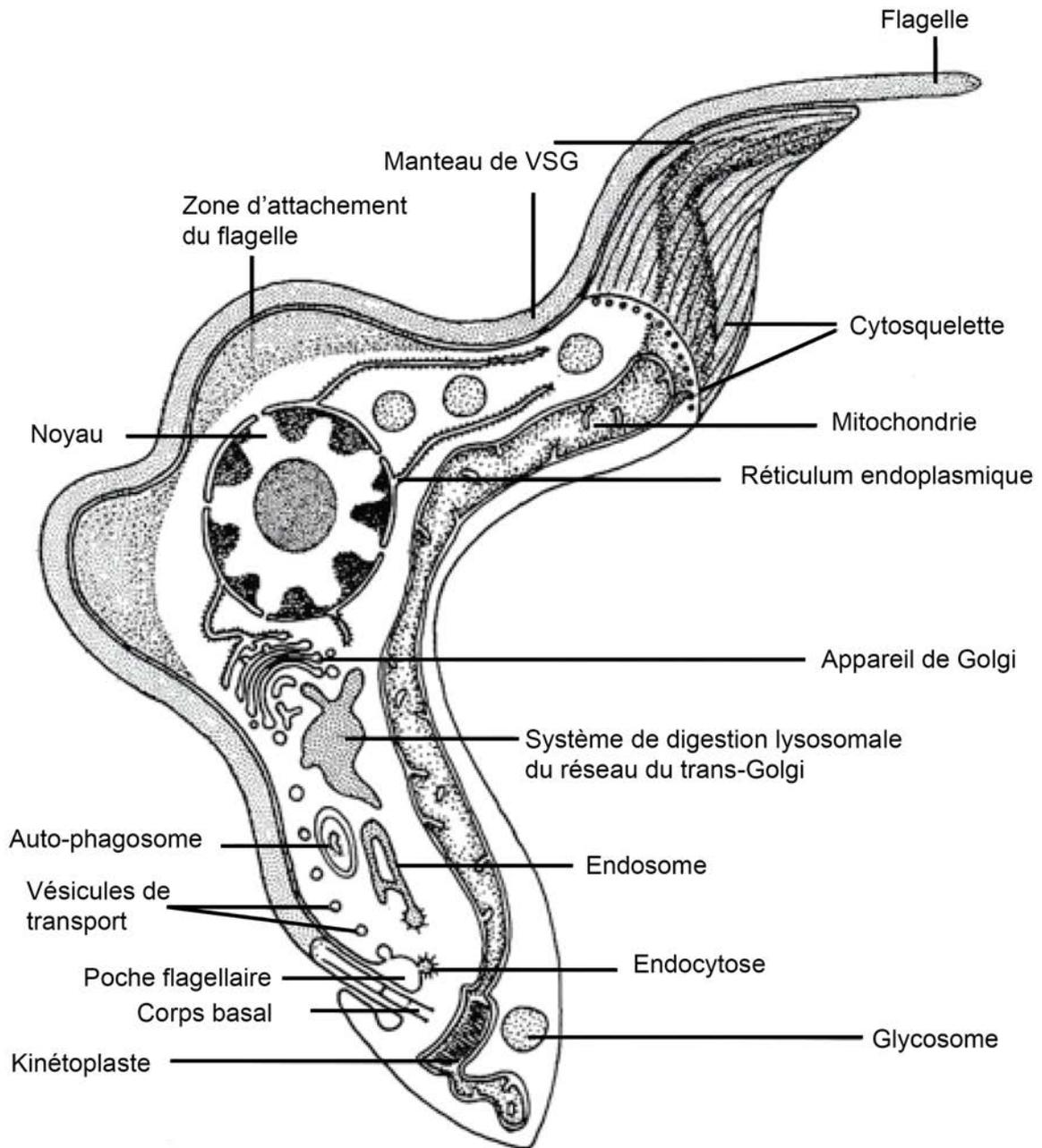


Figure 10 : Schéma de l'architecture cellulaire de la forme sanguine de *Trypanosoma brucei*

Adapté de (Vickerman, Myler, et Stuart 1993)

Le kinétoplaste et les corps basaux sont associés par un complexe d'attachement tripartite (TAC), permettant la synchronie de la division des corps basaux, du flagelle et de l'ADN mitochondrial (Ogbadoyi et al. 2003).

La mitochondrie est une structure unique allongée, allant de la partie postérieure à la partie antérieure du parasite. La structure de la mitochondrie est différente dans les deux formes du parasite, avec une forme tubulaire pour la forme sanguine et une forme réticulée pour la forme procyclique.

L'unique appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et le lysosome sont positionnés entre le noyau et la poche flagellaire.

Les trypanosomes possèdent des glycosomes, des organelles spécialisées dans la glycolyse qui sont apparentées aux peroxysomes. Ils contiennent la majeure partie des enzymes impliquées dans la glycolyse (Opperdoes et Borst 1977).

Les trypanosomes possèdent également des acidocalcisomes, importants pour le stockage des cations et pour maintenir la balance du pH.

1.1.9.2. Génome

1.1.9.2.1. Génome nucléaire

T. brucei possède un génome nucléaire diploïde de 26 mégabases, avec 9068 gènes prédits, dont 900 pseudo-gènes et 1700 spécifiques à *T. brucei* (Berriman et al. 2005). Le diamètre du noyau est d'environ 2,5 µm, avec la présence d'un unique nucléole d'environ 0,5 à 1 µm. Le génome nucléaire de *T. brucei* est divisé en trois catégories, dépendant de leur taille en électrophorèse en champs pulsés ; les chromosomes de plusieurs mégabases « mégachromosomes », les chromosomes intermédiaires et les minichromosomes. Il possède 11 paires de mégachromosomes (1 et 6 mégabases), environ 5 chromosomes intermédiaires (entre 200 et 900 kilobases) et environ 100 minichromosomes (entre 50 et 150 kilobases) (Van der Ploeg et al. 1984) (Melville et al. 1998) (**Fig. 11**). Les chromosomes de plusieurs mégabases possèdent la majorité voire l'intégralité des gènes, à l'exception de certains gènes des VSGs. La majorité des régions sub-téломériques possède les sites d'expressions des VSGs. La fonction des chromosomes intermédiaires reste incertaine, il semblerait qu'ils servent également de réservoir des VSGs. La majeure partie de la séquence des minichromosomes, environ 90%, consiste en une répétition de 177 pb (Sloof et al. 1983). Ils possèdent également une copie silencieuse d'un gène du VSG, ils servent de réservoir de VSGs (Wickstead, Ersfeld, et Gull 2004).

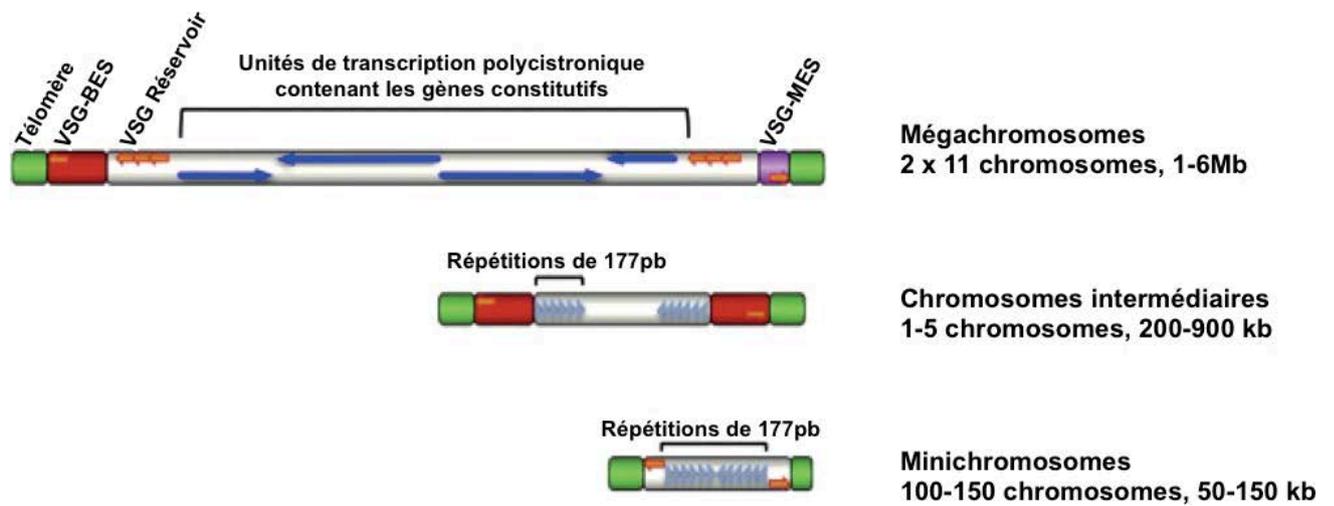


Figure 11 : Architecture du génome nucléaire de *Trypanosoma brucei*

Représentation des trois types de chromosomes chez *T. brucei* : les mégachromosomes, les chromosomes intermédiaires et les minichromosomes. Les gènes et pseudogènes du VSG sont représentés par des flèches orange, les unités polycistroniques par des flèches bleues. BES : site d'expression des formes sanguines, MES : site d'expression des formes métacycliques. (Ersfeld 2011)

La population de minichromosomes et de chromosomes intermédiaires est aneuploïde (Wells et al. 1987) (Alsford et al. 2001) (**Fig. 11**).

1.1.9.2.2. Génome mitochondrial et édition du génome

Le génome mitochondrial est un réseau géant de milliers d'ADN circulaires, il est appelé ADN kinétoplastique (ADNk). L'ADN kinétoplastique se compose de deux types de molécules : les maxicercles et les minicercles (Stuart 1983). Les maxicercles sont compris entre 20 et 40 kb. Leur fonction est similaire à celle de l'ADN mitochondrial des autres eucaryotes, ils possèdent les gènes codant certaines sous-unités de la chaîne respiratoire et des ARN ribosomiques mitochondriaux. Les minicercles, quant à eux, sont présents en plusieurs milliers de copies, ils représentent 90% de la masse du réseau, et font une taille d'environ 1 kb. Les minicercles possèdent les gènes exprimant des petits ARN guides (ARNg), essentiels à l'édition du génome mitochondrial (Sturm et Simpson 1990). Les minicercles sont regroupés dans 250 classes de séquences différentes. En plus de la séquence de l'ARNg, les minicercles possèdent également une séquence conservée contenant une origine de réplication. (Shapiro et Englund 1995).

La majeure partie des maxicercles ne permet pas de transcrire un ARNm fonctionnel. Les ARNm produits par les maxicercles ont besoin d'être décryptés par un phénomène nommé l'édition de l'ARN, phénomène qui permet la formation d'un ARNm fonctionnel (Benne et al. 1986). L'édition implique l'insertion ou la délétion de résidus uridylate à des sites précis internes aux transcrits des maxicercles. Les ARNg produits par les minicercles servent de matrice pour ces insertions et délétions. Après cette édition, les ARNm sont fonctionnels et pourront être traduits.

1.1.9.3. Transcription et régulation des gènes

Dans les trypanosomes, la majeure partie des gènes est transcrite sous forme d'une longue unité polycistronique. Les trois classes d'ARN polymérases sont retrouvées chez *T. brucei* : l'ARN polymérase I transcrit les ARNr, les ARNm des VSGs et de la procycline, l'ARN polymérase II est à l'origine des ARNm polycistroniques, enfin l'ARN polymérase III forme les ARNt. Jusqu'à présent seulement quelques promoteurs ont été identifiés : le promoteur des ARNr, des VSGs, de l'ARN « splice leader », et les promoteurs de l'ARN polymérase III (Vanhamme et al. 1995).

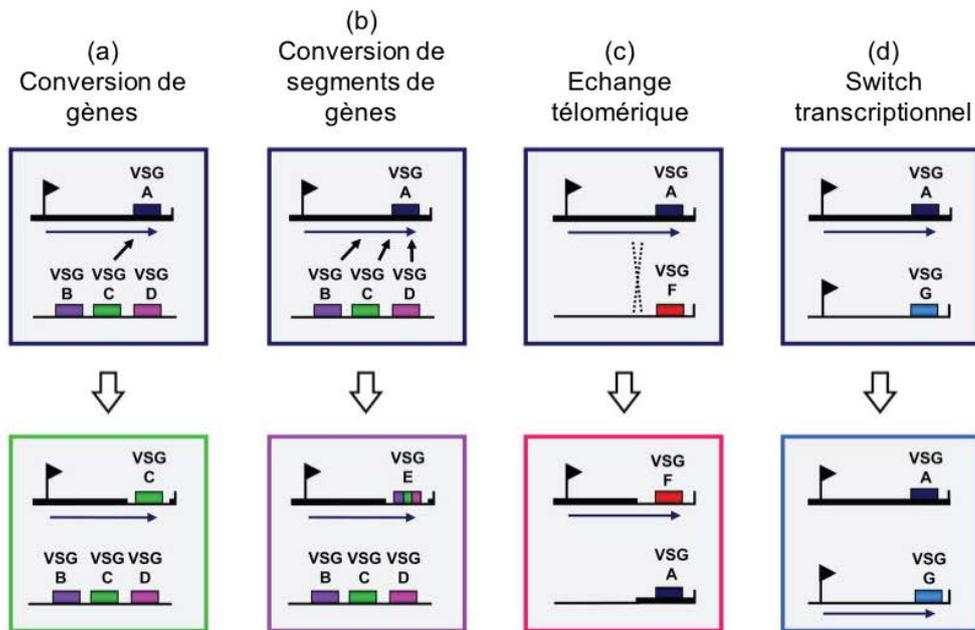


Figure 12 : Mécanismes de changement de VSG

Un seul site d'expression du VSG télomérique est actif à la fois. Le drapeau représente le promoteur actif et la flèche représente la transcription. (a) Changement de VSG médié par une conversion d'un gène silencieux qui remplace l'ancien gène dans la région de transcription active remplaçant l'ancien. (b) Recombinaison de segments de multiples gènes du VSG conduisant à la formation d'un nouveau VSG « mosaïque ». (c) Échange entre deux télomères. (d) Changement au niveau transcriptionnel avec activation d'un VSG préalablement silencieux et inactivation de l'ancien actif. (Vink, Rudenko, et Seifert 2012)

Le contrôle de l'expression des gènes se fait majoritairement au niveau post-transcriptionnel. Les unités polycistroniques subissent un *trans*-épissage consistant en l'ajout en 5' d'une séquence de 39 nucléotides nommé « splice leader » et d'une queue polyA en 3' de l'ARNm prématuré permettant la formation de l'ARNm mature (Agabian 1990) (Liang et al. 2003).

1.1.9.4. Glycoprotéine de surface (VSG)

La forme sanguine de *T. brucei* est entièrement recouverte d'une protéine de surface, nommée glycoprotéine de surface variable (VSG), qui est essentielle pour la survie du parasite. Le trypanosome possède environ 2000 gènes codant pour des VSGs, dont 80% seraient des pseudo-gènes ou des gènes incomplets (Cross, Kim, et Wickstead 2014).

Le VSG est une glycoprotéine de 45 à 55 kDa maintenue sur la face extracellulaire de la membrane plasmique par une ancre de type glycosylphosphatidylinositol (GPI). Il est exprimé à la surface du parasite sous la forme d'un manteau protéique composé d'homodimère qui représente environ 90% du total des protéines retrouvées à la surface du trypanosome. Le VSG agit comme un bouclier, de par sa taille d'environ 15 nm et par sa densité de 10^7 copies, limitant l'accès aux épitopes de surface invariables (Schwede et al. 2011). La structure tertiaire du VSG est très conservée entre les différents VSGs. Un seul site d'expression présent dans une structure extranucléolaire, contenant l'ARN polymérase I, est actif assurant l'expression d'un seul VSG à la fois, par conséquent un unique VSG est retrouvé à la surface du parasite à la fois (Navarro et Gull 2001). Le VSG est exprimé dans des sites d'expression télomérique d'environ 30 à 60 Kb (Hertz-Fowler et al. 2008). Le changement d'expression d'un VSG par un autre est permis par plusieurs mécanismes. Le premier mécanisme est le remplacement du gène du VSG actif par un inactif par recombinaison homologue. Le deuxième consiste en la recombinaison de segments de plusieurs gènes du VSG qui aboutit à la formation d'un nouveau VSG en « mosaïque ». Le troisième est l'échange de télomères par recombinaison homologue qui conduit au changement du VSG actif. Le dernier est appelé, activation *in situ*, il s'agit du remplacement dans la structure extranucléolaire du site d'expression exprimé par un autre (**Fig. 12**).

1.1.9.5. Variation antigénique

Durant une infection à un temps donné, une population de trypanosomes n'exprimant qu'un type de VSG est majoritaire. Le système immunitaire va rapidement et efficacement, reconnaître ce VSG et détruire les trypanosomes l'exprimant à sa surface.

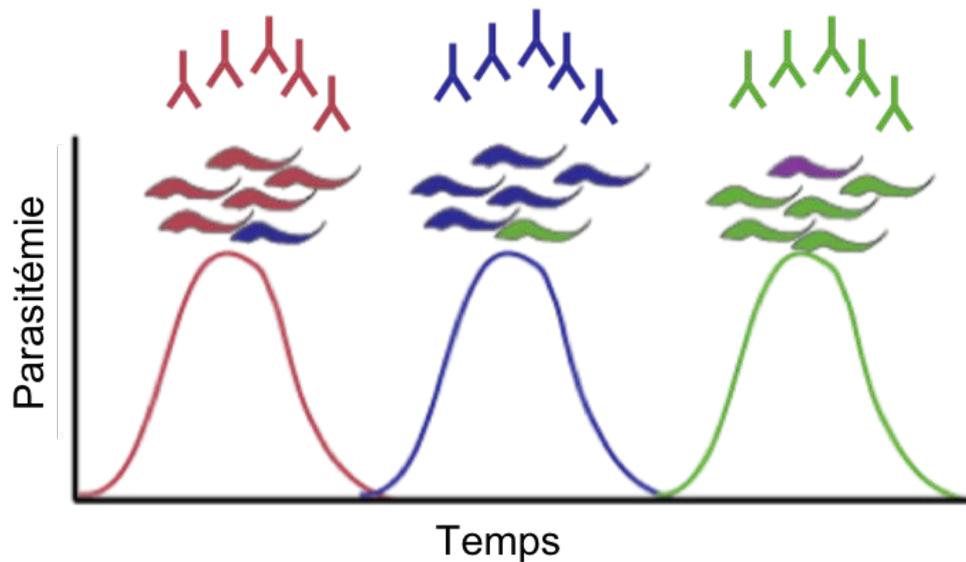


Figure 13 : Variation antigénique chez *Trypanosoma brucei*

Une population de trypanosomes exprime un VSG majoritaire (rouge). Les trypanosomes exprimant ce VSG majoritaire sont éliminés par le système immunitaire. Les trypanosomes exprimant un autre VSG (bleu) se multiplient pour devenir majoritaires, avant d'être éliminés à leur tour par le système immunitaire puis d'être remplacés par une population exprimant un nouveau VSG (vert) etc. On obtient ainsi au cours du temps une succession de « vagues parasitémiques ». Source : adapté de Mugnier Lab.

Certains parasites, présents de manière minoritaire dans la population, expriment un autre variant du VSG, cette population va se multiplier puis devenir la nouvelle population majoritaire. Le maintien des trypanosomes dans l'hôte est permis par ce phénomène appelé « vague parasitémique », chaque vague contient une population mixte exprimant jusqu'à 100 VSGs distincts (Hall, Wang, et Barry 2013) (Mugnier, Cross, et Papavasiliou 2015) (**Fig. 13**). Ainsi le VSG est essentiel à l'échappement immunitaire de par deux fonctions majoritaires, le changement continu de l'antigène de surface et la protection de la surface du parasite en diminuant l'accessibilité de ses épitopes.

1.1.9.6. Procycline

Lors de la différenciation de la forme stumpy en forme procyclique, le manteau de VSG est complètement remplacé en quelques heures par un autre manteau dense composé d'une autre protéine à ancre GPI : la procycline (Roditi et al. 1989). Il existe deux formes majoritaires des procyclines : EP et GPEET. Elles diffèrent par la répétition en acides-aminés présente dans la partie C-terminale de la protéine : EP possède des répétitions Glu-Pro et GPEET des répétitions Gly-Pro-Glu-Glu-Thr (Roditi, Carrington, et Turner 1987) (Mowatt et Clayton 1987) (Mowatt, Wisdom, et Clayton 1989). Dès le passage dans la mouche, les premières formes procycliques expriment EP et GPEET, mais après 7 jours d'infection seul EP est retrouvé (Vassella et al. 2000) (Acosta-Serrano et al. 2001). EP est également détecté dans les formes épimastigotes puis disparaît dans les formes métacycliques qui réactivent le manteau de VSG. Bien que la délétion des quatre gènes codant la procycline ne soit pas létale et n'empêche pas le parasite d'accomplir son cycle, il a été suggéré que la fonction de la procycline serait une protection du parasite pour augmenter sa valeur adaptative (Vassella et al. 2009).

1.1.9.7. Facteurs trypanolytiques

Le sérum humain est fortement toxique pour la plupart des espèces de trypanosomes (Laveran et Mesnil 1912), induisant rapidement leur lyse. L'activité trypanolytique du sérum humain est réalisée par deux facteurs trypanolytiques : Trypanosome Lytic Factors TLF-1 et TLF-2. TLF-1 et TLF-2 contiennent l'apolipoprotéine L1 (ApoL1) et la protéine liée à l'haptoglobine (HRP). L'HRP interagit avec le récepteur de surface du trypanosome *TbHpHbR* (Vanhollebeke et al. 2008) et permet l'entrée de TLF-1 à l'intérieur du parasite.

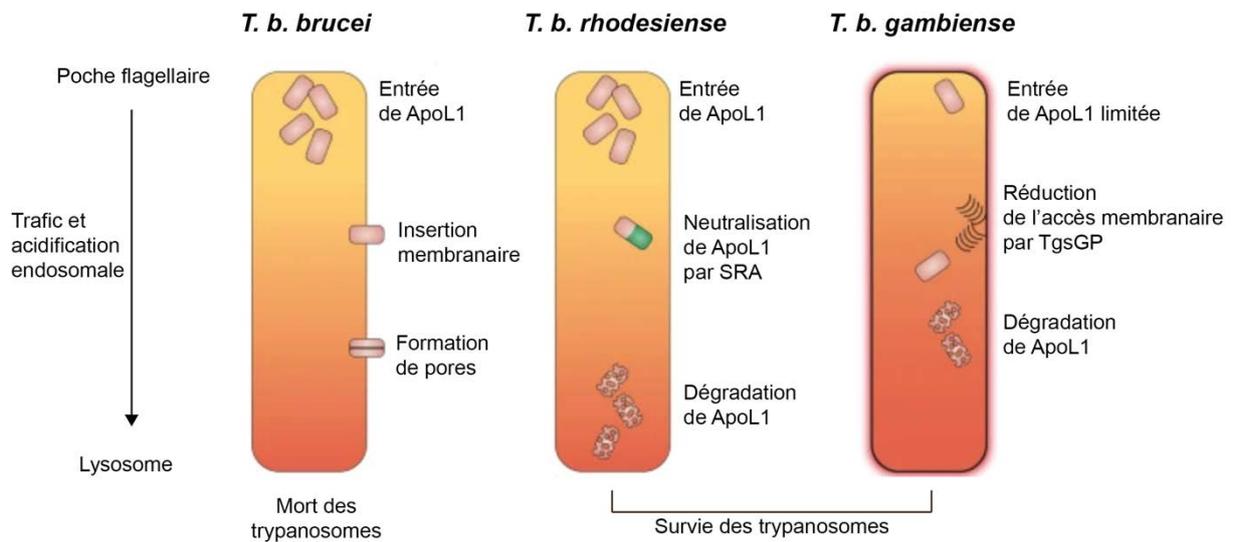


Figure 14 : Différentes réponses à APOL1 dans les trois sous-espèces de trypanosomes

Dans *T. b. brucei*, APOL1 échappe à la dégradation en s'insérant dans les membranes endosomales et entraîne la mort du parasite par la formation de pores. Dans *T. b. rhodesiense*, la protéine de résistance au sérum SRA interagit avec APOL1 empêchant son insertion dans les membranes ce qui conduit à la résistance du parasite. Enfin dans *T. b. gambiense*, l'entrée de APOL1 est réduite grâce à l'inactivation du récepteur *TbHpHbR*. De plus, TgsGP empêche l'insertion dans les membranes de APOL1 en interagissant avec les lipides des membranes endosomales modifiant ainsi leur rigidité. (Pays et al. 2014)

Le récepteur de TLF-2 reste inconnu. Une fois TLF-1/TLF-2 dans le parasite, ApoL1 permet la formation de pores dans les membranes lysosomales, ce qui conduit à la lyse du parasite (Vanhamme et al. 2003) (Pérez-Morga et al. 2005).

Parmi l'ensemble des espèces de trypanosomes africains uniquement deux sous-espèces sont responsables de la maladie chez l'Homme : *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*. Tandis que *T. b. brucei* en contact de sérum humain est rapidement lysé, *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* ont développé une résistance à cette lyse.

T. b. rhodesiense est résistant grâce à l'expression du gène de résistance associé au sérum (SRA) (Xong et al. 1998) (Vanhamme et al. 2003). La protéine SRA interagit et neutralise ApoL1. Pour *T. b. gambiense*, la résistance au sérum humain est permise par l'expression de TbgsGP qui induit une augmentation de la rigidité de la membrane lysosomale, empêchant l'insertion de ApoL1 (Uzureau et al. 2013). Une réduction de l'expression et de l'activité du récepteur *TbHpHbR* seraient également à l'origine de sa résistance (Uzureau et al. 2013) (**Fig. 14**).

1.1.10. Le métabolisme

Au cours de son cycle de vie, *T. brucei* s'adapte à des environnements très différents. Il doit rapidement reprogrammer son métabolisme pour s'adapter aux sources de nutriments disponibles.

1.1.10.1. Forme sanguine

La forme sanguine présente dans l'hôte mammifère vit dans un environnement riche en glucose (5 mM) et contenant entre 0,6 à 0,8 g/mL de protéines. Les formes sanguines utilisent le glucose comme source de carbone pour produire leur ATP via la glycolyse. La glycolyse a lieu principalement à l'intérieur des glycosomes, organelles spécialisées dans la glycolyse puisqu'elles possèdent les sept premières enzymes de cette voie métabolique (Oppendoes et Borst 1977). Le glucose est donc transformé en 3-phosphoglycérate dans les glycosomes puis les dernières enzymes de la glycolyse retrouvées dans le cytosol permettent la formation de pyruvate. Afin de réoxyder le NADH produit lors de la glycolyse, les formes sanguines utilisent une navette G3P/DHAP (glycérol-3-phosphate/dihydroxyacétone phosphate) entre les glycosomes et la mitochondrie (Oppendoes et Borst 1977). La forme sanguine n'utilise pas le métabolisme mitochondrial pour produire de l'ATP par conséquent la majeure partie des enzymes du cycle de Krebs, les cytochromes et les complexes de la chaîne respiratoire ne sont pas exprimés.

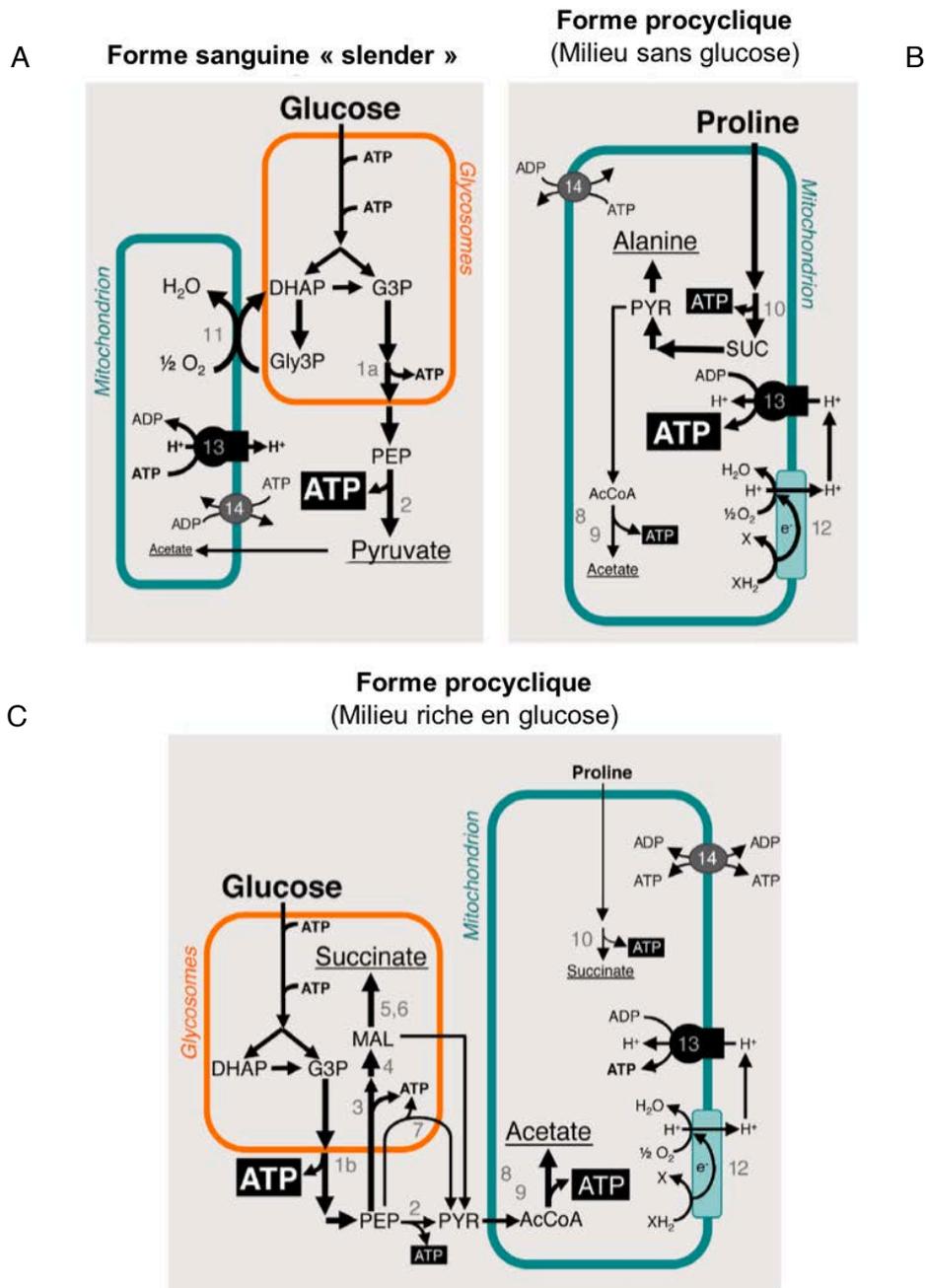


Figure 15 : Multiples voies de production d'ATP dans *Trypanosoma brucei*

Catabolisme des sources de carbones majoritaires (A) dans la forme sanguine, en condition (B) sans glucose ou (C) avec glucose dans la forme procyclique.

Étapes enzymatiques clés: 1a, phosphoglycérate kinase glycosomale; 1b, phosphoglycérate kinase cytosolique; 2, pyruvate kinase; 3, phosphoénolpyruvate carboxykinase; 4, malate déshydrogénase glycosomale; 5, fumarase cytosolique; 6, fumarate réductase NADH-dépendante glycosomale; 7, pyruvate phosphate dikinase; 8, acétate:succinate coenzyme A-transférase, ou ASCT; 9, acétyl-coenzyme A thioestérase; 10, succinyl-coenzyme A synthétase; 11, oxydase alternative du trypanosome; 12, chaîne respiratoire; 13, F_0F_1 -ATP synthase; 14, échangeur ADP/ATP mitochondrial.

AcCoA, acétyl-coenzyme A; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; G3P, glycéraldéhyde 3-phosphate; Gly3P, glycéril 3-phosphate; MAL, malate; PEP, phosphoénolpyruvate; PYR, pyruvate; SUC, succinate. (Smith et al. 2017)

Dans la mitochondrie, les électrons produits sont transmis à l'ubiquinone puis à l'accepteur final, une oxydase alternative TAO qui réduit l'oxygène en eau, sans transfert de protons dans l'espace intermembranaire (Chaudhuri, Ott, et Hill 2006). L'ATP synthase F_0-F_1 maintient un gradient électrochimique membranaire en fonctionnant en sens inverse, c'est-à-dire qu'elle produit de l'ADP et du phosphate à partir d'ATP en transférant des protons dans l'espace intermembranaire (Schnauffer et al. 2005). (**Fig. 15**).

1.1.10.2. Forme procyclique

La forme procyclique est retrouvée dans l'intestin de l'insecte vecteur après ingestion par la mouche des formes stumpy présentes dans l'hôte mammifère. La température de l'intestin de la mouche est d'environ 28°C avec un pH variable. Son environnement est alors pauvre en glucose mais riche en acides aminés (Balogun 1974). Les formes procycliques utilisent préférentiellement la proline comme source de carbone à l'intérieur de la mouche (Mantilla et al. 2017). La L-proline est catabolisée à l'intérieur de la mitochondrie où elle est transformée en glutamate puis le glutamate est utilisé par les enzymes du cycle de Krebs. L'utilisation de la proline permet la formation de nombreux cofacteurs réduits, qui seront réoxydés dans la chaîne respiratoire par la phosphorylation oxydative. La forme procyclique possède les quatre complexes de la chaîne respiratoire ainsi que l'ATP synthase F_0-F_1 qui utilise le gradient électrochimique pour phosphoryler l'ADP et produire de l'ATP (**Fig. 15**). D'autres acides aminés sont utilisés par la forme procyclique, notamment la thréonine, importante dans la biosynthèse des acides gras (Millerioux et al. 2013). Néanmoins, en présence de glucose dans le milieu de culture les formes procycliques vont préférentiellement utiliser le glucose via la glycolyse pour produire leur ATP (Lamour et al. 2005), ce qui montre la capacité d'adaptation métabolique des trypanosomes. Tout comme la forme sanguine, les premières réactions enzymatiques de la dégradation du glucose sont réalisées dans les glycosomes jusqu'à la formation du 1,3 bisphosphoglycérate (1,3-BPGA). Le 1,3-BPGA est ensuite transformé en phosphoénolpyruvate (PEP) puis le PEP peut prendre deux voies :

- Le PEP retourne dans les glycosomes où il sera transformé en malate puis succinate (Besteiro et al. 2002).
- Le PEP est transformé en pyruvate dans le cytosol puis est transporté dans la mitochondrie afin d'être converti en acétyl-CoA puis en acétate (Van Hellemond, Opperdoes, et Tielens 1998). L'acétate est par la suite transporté dans le cytosol où il servira de précurseur dans la voie de biosynthèse des acides gras.

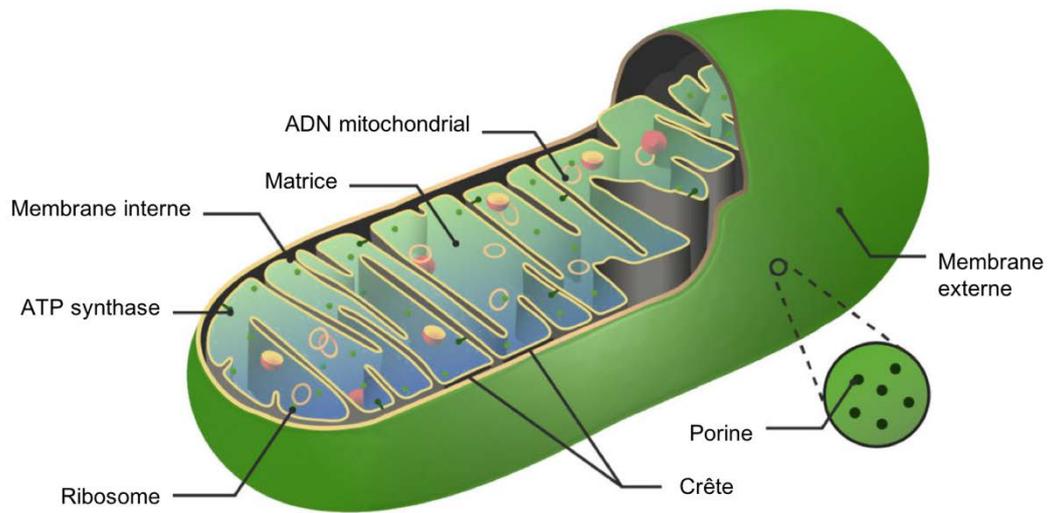


Figure 16 : Schéma d'une mitochondrie
Adapté de Lecturio.



Figure 17 : Section d'une mitochondrie provenant d'un hépatocyte de rat en microscopie électronique
 x100 000. Source : George E. Palade EM Collection.

1.2. Les mitochondries

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires semi-autonomes retrouvées dans la quasi-totalité des cellules eucaryotes (**Fig. 16** et **Fig. 17**). Le mot mitochondrie provient du grec *mitos* « fil » et *khondros* « grain », décrivant la forme de ces organelles au microscope optique. Elles seraient à l'origine une alphaprotéobactérie endosymbiotique d'un ancêtre d'une cellule eucaryote (Margulis 1970). L'événement endosymbiotique aurait eu lieu il y a plus de 1,5 milliard d'années. Elles sont entourées par deux membranes, la membrane externe et la membrane interne séparées par l'espace intermembranaire. La membrane interne forme de nombreuses crêtes, qui s'étendent dans l'espace matriciel. Les mitochondries possèdent leur propre génome, généralement circulaire, présent en multiples copies. Le génome mitochondrial code pour des protéines de la chaîne respiratoire, des ARN ribosomiques et des ARN de transfert. Elles permettent de nombreuses fonctions cellulaires essentielles : la production d'énergie, sous forme d'ATP grâce à la respiration cellulaire, le métabolisme des acides gras, des carbohydrates et des acides aminés ainsi que l'homéostasie du fer et du calcium. Les mitochondries sont également une importante source de production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Les EROs sont également un moyen de communication entre la mitochondrie et le reste de la cellule puisqu'ils sont impliqués dans la signalisation Redox. Cependant ils sont également à l'origine de dommages pouvant mener à des dysfonctionnements mitochondriaux, à la mort de la cellule et sont liés à plusieurs pathologies humaines ainsi qu'au vieillissement. L'étude de la biologie de la mitochondrie dans son ensemble, a longtemps été et reste aujourd'hui, d'un vaste intérêt scientifique.

1.2.1. Organisation de la mitochondrie

La mitochondrie est formée de quatre compartiments qui sont retrouvés également chez le parasite : la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne et la matrice.

1.2.1.1. La membrane externe

La membrane externe de la mitochondrie est en contact direct avec le cytosol et l'espace intermembranaire. Elle est le centre de communication entre le cytosol, les organelles et la mitochondrie.

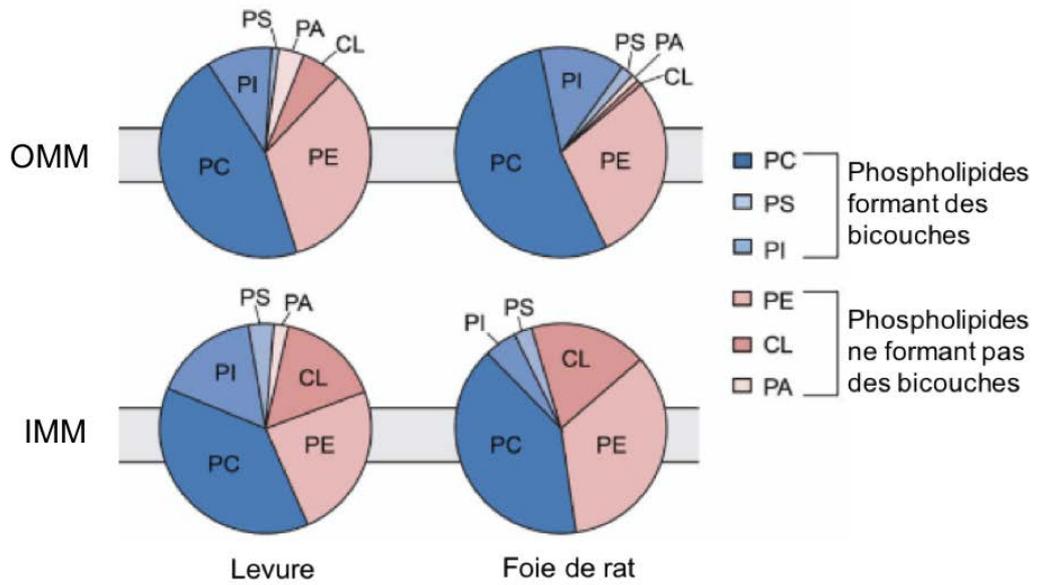


Figure 18 : Composition en phospholipides des membranes mitochondriales

Composition en phospholipides des membranes externe (OMM) et interne (IMM) de la mitochondrie de la levure et des cellules de foie de rat. PC, phosphatidylcholine : PS, phosphatidylserine : PI, phosphatidylinositol : PE, phosphatidylethanolamine : CL, cardiolipine : PA, acide phosphatidique. (Ball, Neff, et Gohil 2018)

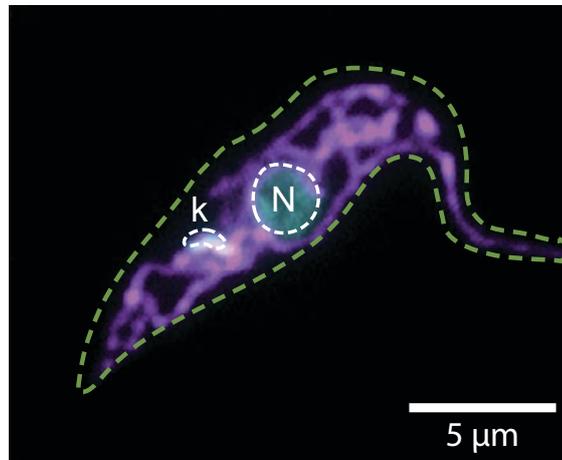
Elle est composée d'une bicouche lipidique. Sa composition est proche de la membrane plasmique, avec une conservation en phospholipides au cours de l'évolution. Elle possède une forte proportion de phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylinositol. La phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique et les cardiolipines sont présents en plus faible proportion (Daum 1985) (Sperka-Gottlieb et al. 1988) (Zinser et al. 1991) (**Fig. 18**). Elle est relativement poreuse ce qui permet le passage d'ions et de métabolites entre le cytosol et l'espace intermembranaire. Le passage est permis par un nombre important de porines, telles que le canal ionique dépendant du voltage (VDAC) formant un canal aqueux qui permet le passage passif des molécules solubles de moins de 10 kDa jusqu'à l'espace intermembranaire (Bayrhuber et al. 2008). Les protéines de poids moléculaire plus important doivent être importées de manière active par des translocases.

1.2.1.2. L'espace intermembranaire

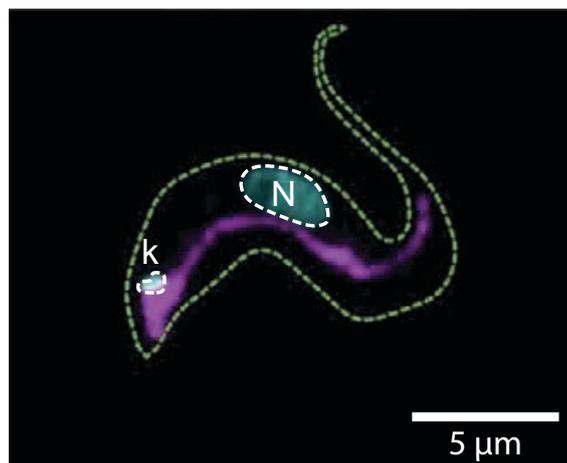
L'espace intermembranaire sépare la membrane externe de la membrane interne, avec une taille d'environ 20 nm. Du fait de la forte porosité de la membrane externe de la mitochondrie, la composition de l'espace intermembranaire est proche du cytosol. De plus, il possède un des éléments majeurs de la chaîne respiratoire, le cytochrome c qui est séquestré dans les invaginations de la membrane interne.

1.2.1.3. La membrane interne

La membrane interne se trouve entre l'espace intermembranaire et la matrice. Sa composition en phospholipides est différente de celle de la membrane externe, les phosphatidyléthanolamines et les cardiolipines y sont enrichies (Daum 1985) (**Fig. 18**). Du fait de sa composition particulière en phospholipides, la membrane interne est très peu perméable, faisant de celle-ci une barrière sélective pour l'accès à la matrice. L'oxygène, le CO₂ et l'eau sont les seuls pouvant traverser librement. La diffusion des ions et autres molécules ne peut se faire que par des protéines de transport. La membrane interne possède un potentiel électrochimique d'environ 180 mV. Elle forme des invaginations appelées crêtes mitochondriales (Sjostrand 1953) (Palade 1953). Ainsi, la membrane interne est jusqu'à 5 fois plus grande que la membrane externe. Les crêtes mitochondriales sont considérées comme un sous-compartiment de la membrane interne. La formation et le maintien des crêtes sont permis par plusieurs complexes multiprotéiques tels que MICOS ou l'ATP synthase (Harner et al. 2011; Hoppins et al. 2011; John et al. 2005; von der Malsburg et al. 2011; Rabl et al. 2009).



Forme procyclique (PCF)



Forme sanguine (BSF)

Figure 19 : Mitochondrie dans la forme procyclique et dans la forme sanguine de *Trypanosoma brucei*

Immunofluorescence montrant la structure de la mitochondrie (violet) dans les deux formes du parasite. Abréviations : k, kinétoplaste ; N, noyau. Adapté de (Trikin et al. 2016:102).

Les crêtes possèdent la majeure partie des complexes de la chaîne respiratoire et du complexe F_0-F_1 de l'ATP synthase, elles sont également enrichies en protéines de la biogenèse des centres fer-soufre (Vogel et al. 2006) (Gilkerson, Selker, et Capaldi 2003).

1.2.1.4. La matrice

La matrice est l'espace le plus à l'intérieur de la mitochondrie entouré par la membrane interne. La composition de la matrice est fortement similaire à la composition du cytoplasme bactérien. La matrice possède un pH élevé d'environ 7,9 – 8 (Llopis et al. 1998). Elle est l'endroit où ont lieu la réplication, la transcription et la traduction de l'ADN mitochondrial ainsi que de nombreuses réactions métaboliques.

1.2.2. La mitochondrie unique de *Trypanosoma brucei*

Depuis de nombreuses années, l'étude de l'origine des mitochondries et leur évolution jusqu'aux organismes multicellulaires a fait l'objet d'un vaste intérêt. Tandis qu'une majorité des Opisthocontes, super-règne rassemblant de nombreux eucaryotes dont les Metazoa, a évolué vers une multiplicité de leur mitochondrie, d'autres organismes dont les Kinétoplastida ont gardé une mitochondrie unique. Les kinétoplastidés dont fait partie *T. brucei* ne possèdent qu'une seule mitochondrie géante, avec la particularité d'avoir leur ADN mitochondrial (ADNk) compacté en une structure unique nommée kinétoplaste (Lukeš et al. 2002) (**Fig. 19**). Ce choix évolutif semble résider dans le besoin de simplicité, leur attribuant cette capacité extraordinaire de s'adapter à des modifications drastiques des paramètres environnementaux.

Chez le trypanosome africain, la mitochondrie connaît des modifications importantes de morphologie au cours de son cycle parasitaire (Verner et al. 2015). Dans la forme sanguine, la mitochondrie est réprimée, tubulaire, cette forme n'utilise pas le métabolisme mitochondrial pour produire son énergie, son activité mitochondriale est fortement restreinte. Dans la forme procyclique, la mitochondrie est réticulée, active et son activité est fortement requise puisque cette forme utilise la phosphorylation oxydative pour produire son ATP. Il y a une variabilité des fonctions mitochondriales et de la structure de la mitochondrie en fonction de son stade et de son environnement (Verner et al. 2015). Sa mitochondrie unique, son changement de métabolisme et de structure, font de *T. brucei* un modèle de choix pour l'étude des fonctions mitochondriales dont la répression et l'activation de voies spécifiques à la mitochondrie, les mécanismes ou conséquences de la perte de fonctions mitochondriales : telles que la perte de l'ADNk ou les mécanismes de fusion et fission mitochondriales (**Fig. 19**).

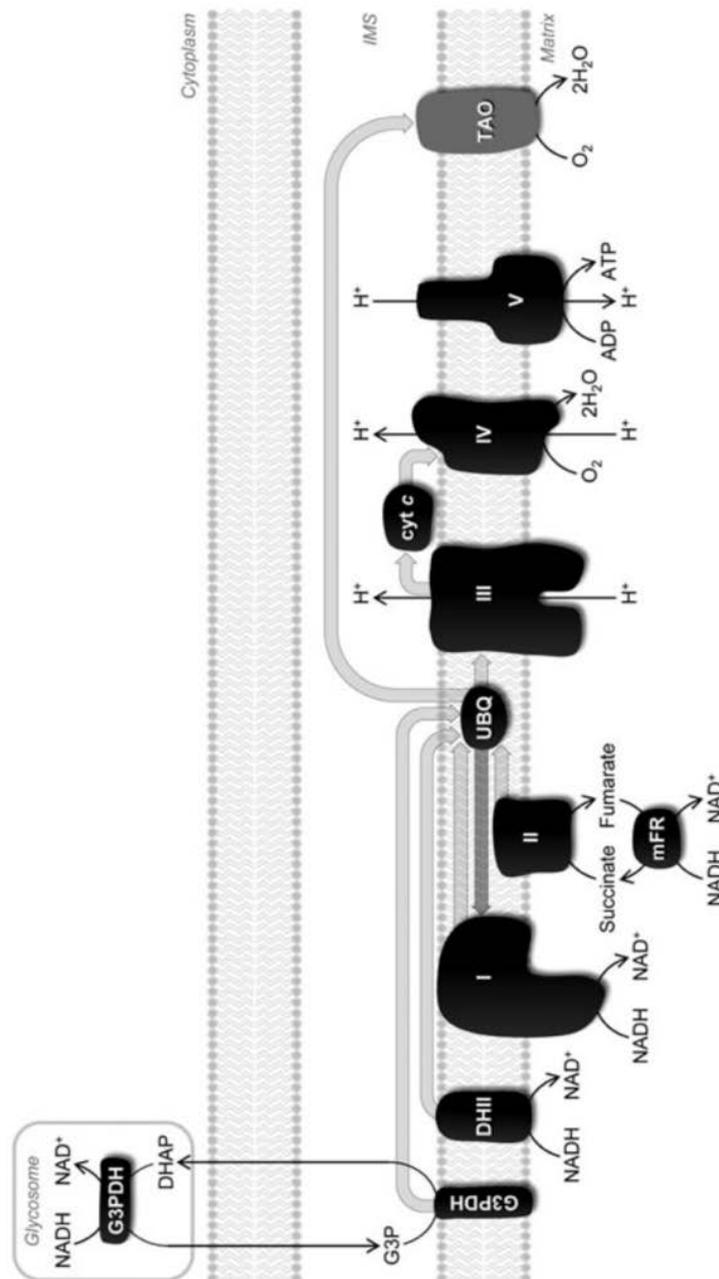


Figure 20 : Composition de la chaîne respiratoire de *Trypanosoma brucei*

Les équivalents réducteurs entrent dans la chaîne respiratoire par le complexe I, la NADH déshydrogénase de type II (DHII) et le complexe II puis ils vont réduire l'ubiquinone. Les électrons sont ensuite transférés au complexe III puis au cytochrome c et au complexe IV, qui réduit l'O₂ en H₂O. Les complexes III et IV transfèrent des protons H⁺ de la matrice à l'espace intermembranaire, ce qui conduit à la formation d'un gradient électrochimique qui sera utilisé par le complexe V/ ATP synthase pour produire de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate. En plus de ces complexes, *T. brucei* possède la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) qui sert de donneurs d'électrons directement à l'ubiquinone. Il possède également l'alternative oxydase des trypanosomes (TAO) qui sert d'accepteur final et réduit l'O₂ en H₂O principalement dans les formes sanguines. (Tomás et Castro 2013) Abréviations : mFR, fumarate réductase mitochondriale ; TAO, alternative oxydase des trypanosomes ; G3PDH, glycérol-3-phosphate déshydrogénase ; cyt c, cytochrome c ; UBQ, ubiquinone ; DHII, NADH déshydrogénase de type II.

1.2.3. Respiration cellulaire

Les mitochondries sont connues pour être le centre énergétique de la cellule en produisant la majeure partie de l'énergie via la phosphorylation oxydative (Nelson et Cox 2000). La phosphorylation oxydative est un processus défini comme une chaîne de transfert d'électrons générée par l'oxydation d'un substrat et conduisant à la production d'ATP par l'intermédiaire d'un gradient électrochimique transmembranaire. Les électrons sont transportés par la chaîne respiratoire, composée de quatre complexes protéiques nommés I, II, III et IV, localisés dans la membrane interne de la mitochondrie. Les électrons provenant du NADH entrent dans la chaîne respiratoire par le complexe I (NADH déshydrogénase) et ceux provenant du FADH₂ par le complexe II (succinate déshydrogénase). Ils sont ensuite transférés à l'ubiquinone (coenzyme Q), puis le complexe III (cytochrome c oxydoréductase) transporte les électrons au cytochrome c. Le complexe IV (cytochrome c oxydase) oxyde le cytochrome c et transfère les électrons à l'accepteur final l'oxygène O₂ qui sera réduit en H₂O. Le transfert d'électrons au sein des complexes I, III et IV s'accompagne d'un transfert de protons H⁺ de la matrice à l'espace intermembranaire conduisant à la génération d'un gradient électrochimique. Le gradient de protons est utilisé par l'ATP synthase pour produire l'ATP via la phosphorylation de l'ADP.

Chez *T. brucei*, la forme procyclique utilise la phosphorylation oxydative pour produire la majeure partie de son ATP via la chaîne respiratoire et l'ATP synthase (Zíková et al. 2009) (Horváth et al. 2005) (**Fig. 20**). Elle possède une chaîne de transport d'électrons contenant quatre complexes qui transportent les électrons jusqu'au pool d'ubiquinone : deux NADH:ubiquinone oxydoréductases (le complexe I et une enzyme insensible à la roténone), le complexe II et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Les électrons sont transférés de l'ubiquinol au cytochrome c par le complexe III puis à l'accepteur final l'oxygène par le complexe IV. Les complexes III et IV pompent les protons H⁺ dans l'espace intermembranaire. Enfin l'ATP synthase F₀-F₁ utilise le gradient électrochimique de protons pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate (Zíková et al. 2009).

Contrairement à la forme procyclique, la forme sanguine ne possède pas de chaîne respiratoire dépendante du cytochrome c. Elle contient une chaîne de transport d'électron unique avec la glycérol-3-phosphate déshydrogénase ainsi que l'oxydase alternative également connue sous le nom d'oxydase alternative spécifique des trypanosomes TAO (Chaudhuri et al. 2006). TAO est également exprimée dans les formes procycliques mais à un niveau réduit.

TAO transfère les électrons de l'ubiquinol à l'oxygène, réduisant l'oxygène en eau, sans produire de gradient électrochimique. Le potentiel de membrane est maintenu grâce à l'ATP synthase qui fonctionne dans le sens inverse en hydrolysant l'ATP pour produire de l'ADP et du phosphate et expulser des protons (Schnauffer et al. 2005). (**Fig. 20**).

1.2.4. Transport à la mitochondrie

La quasi-totalité des protéines essentielles pour des fonctions mitochondriales est codée par le génome nucléaire. Le passage des protéines, synthétisées dans le cytosol, à la mitochondrie est donc un processus essentiel qui nécessite de traverser la membrane externe puis la membrane interne pour rejoindre la matrice mitochondriale.

Afin de reconnaître et de cibler les protéines qui doivent se rendre à la mitochondrie, il existe des signaux d'adressage. Les signaux d'adressage sont des séquences particulières présentes dans la protéine, nécessaires et suffisantes pour emmener cette protéine à la mitochondrie (Hurt, Pesold-Hurt, et Schatz 1984) (Horwich et al. 1985). La plupart des signaux d'adressage à la mitochondrie (MTS) sont présents en N-terminal de la protéine et font entre 20 et 60 acides aminés avec une abondance de charges positives. La plupart sont par la suite clivés dès le passage de la membrane interne. Il existe également des séquences d'adressage interne, telles que pour l'ATP/ADP translocase.

Le transport des protéines du cytosol à l'espace intermembranaire nécessite le passage de la membrane externe. Cette fonction est réalisée par un complexe protéique appelé TOM (translocase de la membrane externe). La composition du complexe TOM implique notamment deux sous-complexes : Tom20 et Tom70 qui se lient à la préprotéine puis l'envoient dans le canal formé par Tom40 (Hill et al. 1998).

Les protéines à tonneau β ciblées à la membrane externe de la mitochondrie (OMM) sont, après passage par TOM, adressées à l'OMM par une machinerie appelé SAM (machinerie de tri et assemblage) (Wiedemann et al. 2003) (Kutik et al. 2008).

Pour les protéines ciblées à la membrane interne ou à la matrice ; le transport de l'espace intermembranaire à la matrice via la membrane interne est permis par un complexe appelé TIM/TIM23 (translocase de la membrane interne). TIM23 possède dix sous-unités : Tim50, Tim23, Tim17, Tim44, Tim14/Pam18, Tim16/Pam16, Pam17, Tim21, mtHsp70 et Mge1.

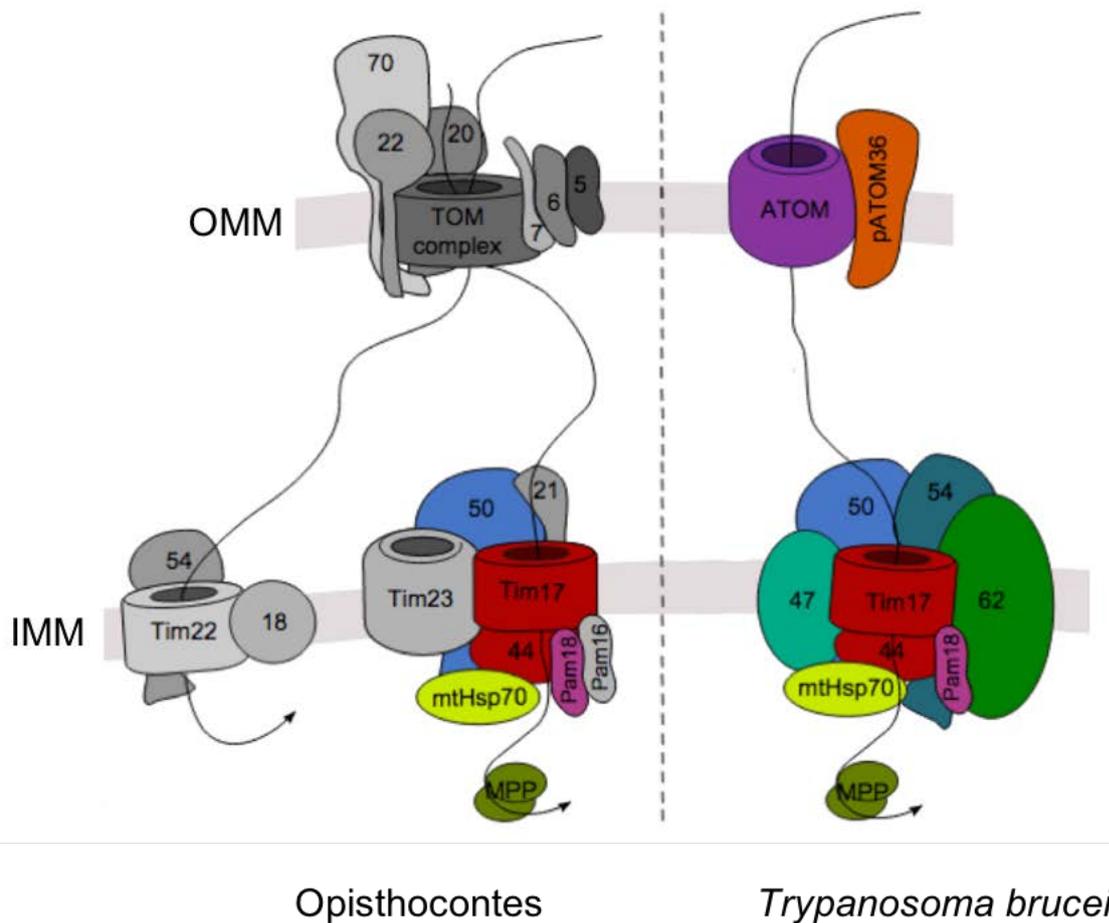


Figure 21 : Machinerie de translocation mitochondriale comparative entre les Opisthocoetes et *Trypanosoma brucei*

Voie d'import de la membrane externe des protéines par le complexe TOM ou ATOM. Voie d'import par le complexe TIM de la membrane interne pour les protéines matricielles. Chez les Opisthocoetes, Tim22 permet la translocation et l'insertion des protéines dans la membrane interne. MPP clive le signal d'adressage à la mitochondrie (MTS). OMM, membrane externe de la mitochondrie ; IMM, membrane interne de la mitochondrie ; Adapté de (Verner et al. 2015).

Le complexe comporte deux parties : la partie ancrée dans la membrane incluant Tim23, Tim17, Tim21 et Tim50 qui forment le canal et la partie soluble qui forme le moteur du complexe composé de Tim44, Tim14/Pam18, Tim16/Pam16, Pam17, mtHsp70 et Mge1 (Mokranjac et al. 2009) (Yamamoto et al. 2002) (Mokranjac et al. 2003) (**Fig. 21**). A la suite du passage par TIM, les préprotéines subissent un clivage du MTS par des peptidases mitochondriales (MPP).

Un second complexe permet le passage de l'espace intermembranaire à la matrice des protéines ne possédant pas de séquence d'adressage en N-terminal permettant leur ancrage dans la membrane interne. Ce complexe nommé Tim22 est composé de Tim22, Tim54 et Tim18 qui sont ancrés dans la membrane interne (Sirrenberg et al. 1996) (Kerscher et al. 1997) (Kerscher, Sepuri, et Jensen 2000) (Koehler et al. 2000). (**Fig. 21**).

Dans les trypanosomes, comme chez les autres eucaryotes, le passage des protéines du cytosol à la mitochondrie requiert le passage des membranes externe puis interne. Les mécanismes de translocation, malgré des divergences, restent conservés (Eckers et al. 2012). Il semblerait qu'il y ait une simplification du processus en comparaison avec les autres eucaryotes, mais la capacité de transfert des protéines dans la mitochondrie n'est pas altérée chez les trypanosomes. Une translocase archaïque présente dans la membrane externe (ATOM) pourrait avoir la même activité que TOM en permettant le passage des protéines dans la membrane externe (Pusnik et al. 2011). ATOM n'a pas d'origine évolutive commune avec TOM mais semble être originaire d'un ancêtre bactérien (Pusnik et al. 2011). ATOM forme une structure en tonneau β qui est sur-régulée dans la forme procyclique (Pusnik et al. 2011) (Urbaniak, Guther, et Ferguson 2012). Il est composé de sept sous-unités dont ATOM40 qui partage la même fonction que Tom40. Un autre composant de la machinerie de transport a été identifié : pATOM36. pATOM36 est impliqué dans l'ancrage/assemblage de protéines (dont ATOM) dans la membrane externe de la mitochondrie ainsi que la ségrégation de l'ADN mitochondrial (Pusnik et al. 2012) (Käser et al. 2016). Pour les protéines à ancrage dans la membrane externe, un homologue de SAM50, faisant partie du complexe de SAM, nommé Tob55 est retrouvé chez *T. brucei* (Sharma, Singha, et Chaudhuri 2010). (**Fig. 21**). Le complexe MICOS est également retrouvé chez les trypanosomes et est à la fois responsable de la structure des crêtes mitochondriales et du transport des protéines dans l'espace intermembranaire (Kaurov et al. 2018).

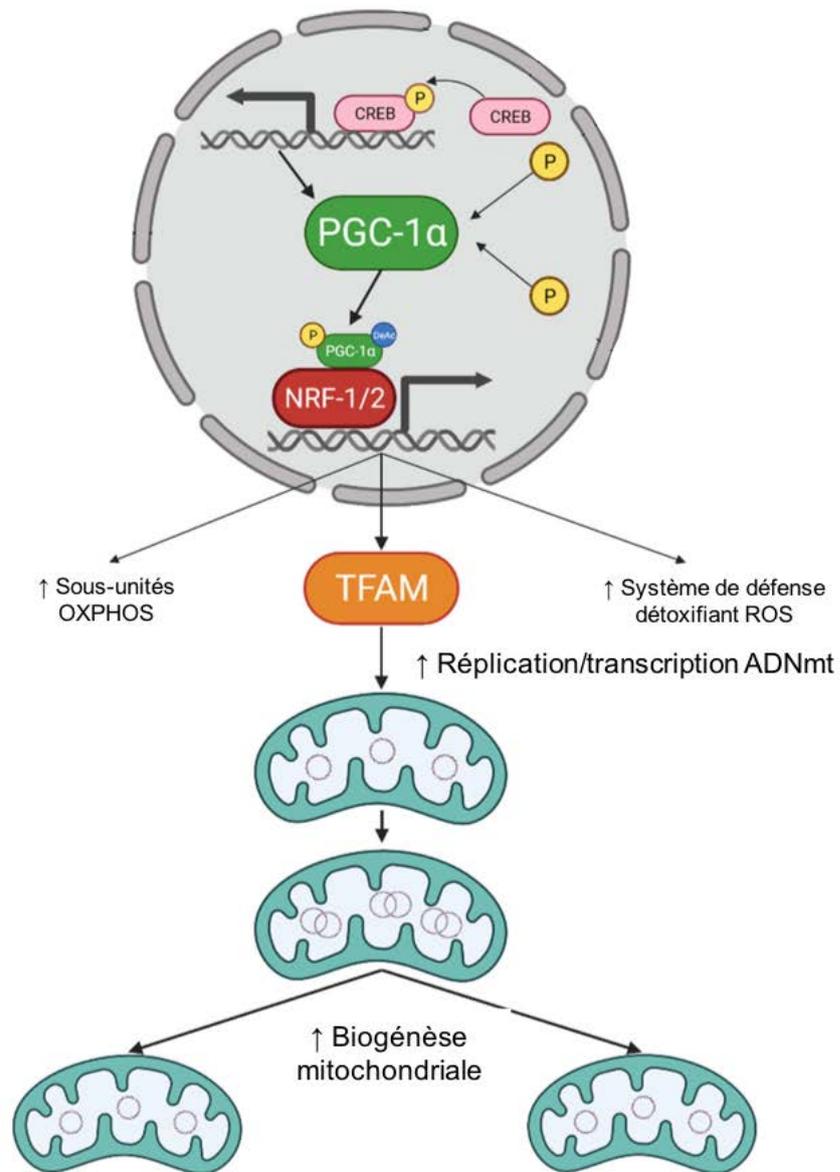


Figure 22 : Mécanismes de la biogenèse mitochondriale

Activation de PGC-1 α qui se lie à NRF-1/2 pour induire l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la biogenèse dont TFAM. TFAM induit une augmentation de la réplique et de la transcription de l'ADNmt conduisant à une biogenèse mitochondriale. OXPHOS, phosphorylation oxydative ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; P, phosphorylation. (Cardanho-Ramos et Morais 2021)

Les protéines ciblées dans la membrane interne ou la matrice traversent ensuite la membrane interne grâce au complexe TIM. Des orthologues de Tim17 et Tim50 sont retrouvés chez *T. brucei* (Singha et al. 2008) (Duncan, Fullerton, et Chaudhuri 2013:50). De plus Tim47, Tim54 et Tim62 ont été identifiés comme des nouveaux composants de la machinerie de TIM (Singha et al. 2012) (Singha, Hamilton, et Chaudhuri 2015) (Singha et al. 2021). Les composants du moteur du complexe Tim23 : Mge1, mtHsp70, Tim44 et Tim14/Pam18 sont retrouvés chez *T. brucei* (Schneider, Bursać, et Lithgow 2008). Enfin, le signal d'adressage est clivé par la peptidase MPP (**Fig. 21**).

1.2.5. Homéostasie mitochondriale

L'homéostasie mitochondriale est préservée par la coordination de deux processus contraires : la biogenèse mitochondriale et la mitophagie. Ce contrôle qualité des mitochondries est essentiel au bon fonctionnement de la cellule. Ensemble, ces deux processus permettent de répondre aux stimuli environnementaux, de développer ou de réduire le réseau mitochondrial en cas de besoin ou de privation énergétique, de réguler la quantité d'ERO dans les mitochondries.

1.2.5.1. La biogenèse mitochondriale

La biogenèse mitochondriale est le processus par lequel les mitochondries vont grandir en nombre et en taille toujours à partir d'une mitochondrie existante. La biogenèse a généralement lieu dans des cellules saines en réponse à des stimuli physiologiques. Elle est impliquée dans l'augmentation de la capacité de phosphorylation oxydative, la réparation des dysfonctionnements mitochondriaux, et la régulation de la production de ERO par la mitochondrie. L'altération de ce mécanisme conduit à un dysfonctionnement mitochondrial et un stress oxydatif. Une coordination entre les génomes mitochondrial et nucléaire est nécessaire pour la biogenèse mitochondriale puisque les deux sont impliqués dans le processus. Elle est régulée par une multitude de facteurs permettant une cascade de signalisation. Elle implique des coactivateurs de la transcription, notamment PGC-1 (proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator 1) (**Fig. 22**). PGC-1 interagit directement avec des facteurs de transcription cibles pour coordonner de nombreuses voies de signalisation. Il est lui-même positivement régulé par plusieurs facteurs dont CREB (cAMP response element-binding protein) (Herzig et al. 2001). Les phosphorylations de CREB ou PGC-1 α induisent l'activation de PGC-1 α (Delghandi, Johannessen, et Moens 2005) (Akimoto et al. 2005).

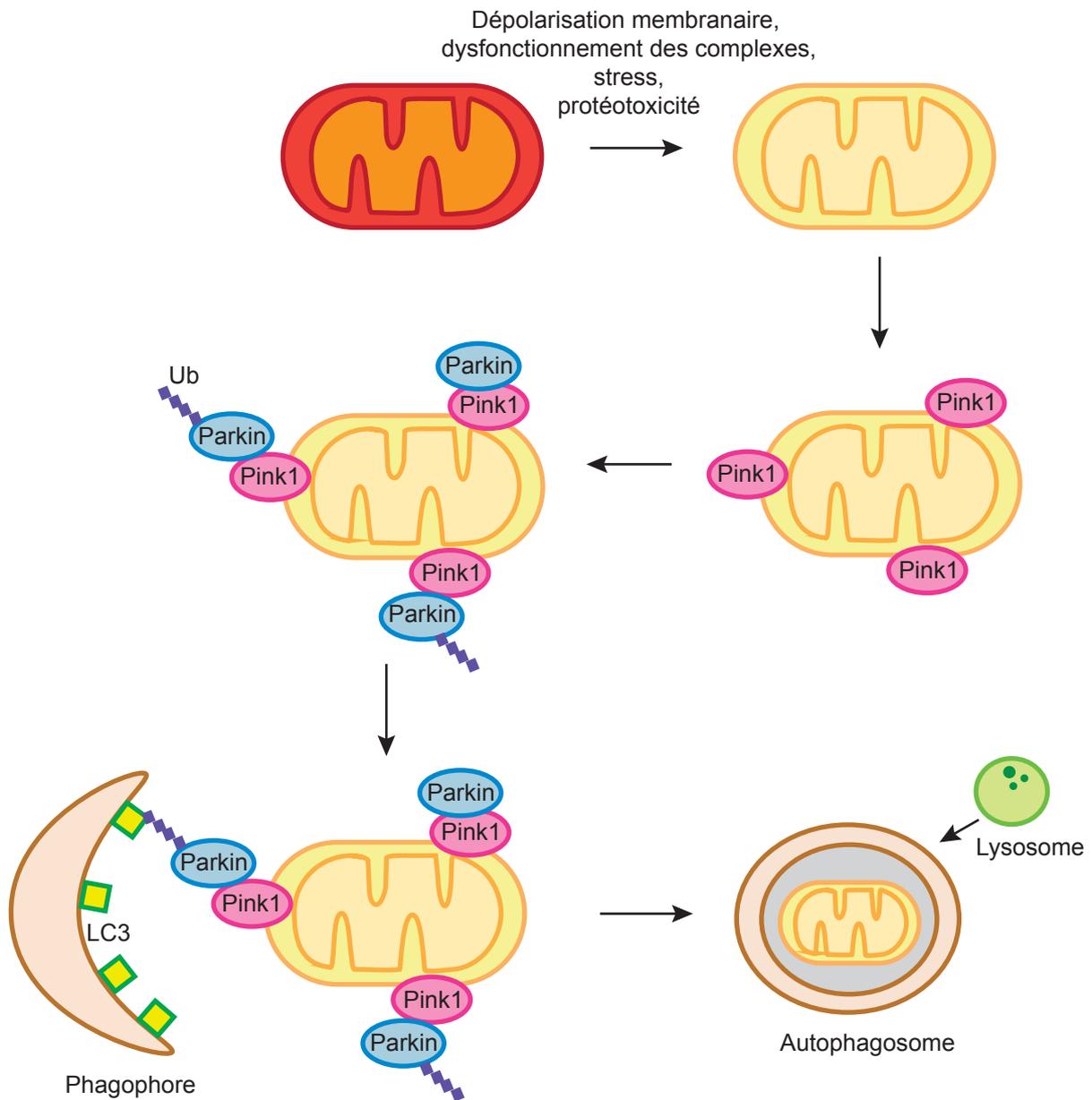


Figure 23 : Une des voies de la mitophagie

Description de la voie de dégradation des mitochondries par le système Parkin/Pink1. Les mitochondries endommagées induisent une activation de Pink1/Parkin qui recrute l'autophagosome via notamment la protéine LC3. L'autophagosome est dégradé par les lysosomes. Ub, ubiquitine. Adapté de (Ge, Dawson, et Dawson 2020)

NRF1 et NRF2 sont des facteurs respiratoires nucléaires clés de la régulation de la biogenèse et PGC-1 α active ces deux facteurs (Wu et al. 1999) (Scarpulla 2008). Ils régulent l'expression des sous-unités de la chaîne de transfert d'électrons codées par le génome nucléaire (Evans et Scarpulla 1990). NRF1, en particulier, régule l'expression de TFAM en se liant à des sites promoteurs spécifiques (Virbasius et Scarpulla 1994). TFAM est le facteur de transcription A et son expression est essentielle pour la réplication de l'ADN mitochondrial et permet une régulation du nombre de copies de l'ADNmt (Larsson et al. 1998) (**Fig. 22**).

Chez *T. brucei*, la modification de structure de la mitochondrie entre la forme sanguine et la forme procyclique suggère qu'à un moment du cycle cellulaire le parasite a besoin d'une biogenèse mitochondriale pour passer d'une forme tubulaire à une forme ramifiée (Bílý et al. s. d.). La réactivation de la mitochondrie de la forme sanguine à la forme procyclique est permise par une régulation du génome mitochondrial et nucléaire. Cependant, les mécanismes régulant ce phénomène ne sont que faiblement connus (Priest et Hajduk 1994) (Schneider 2001).

1.2.5.2. La mitophagie

L'autophagie spécialisée dans l'élimination des mitochondries défectueuses, s'appelle la mitophagie. La mitophagie permet une dégradation sélective des mitochondries altérées par un ensemble de voies de signalisation. Elle contribue à maintenir la qualité des mitochondries et leur quantité. Dans la levure, la mitophagie est principalement réalisée via Atg32, une protéine transmembranaire présente dans la membrane externe de la mitochondrie (Okamoto, Kondo-Okamoto, et Ohsumi 2009) (Kanki et al. 2009). La mitophagie est déclenchée par la phase stationnaire de croissance ou la privation en azote (Tal et al. 2007) (Kanki et Klionsky 2008) (Okamoto et al. 2009). Atg32 est alors induite et son accumulation dans les membranes va former des complexes avec Atg8 et Atg11. Atg8 est localisée au niveau des autophagosomes et Atg11 permet le recrutement par d'autres Atg et la formation d'autophagosome (Bhatia-Kissova et Camougrand 2021) Dans les cellules de mammifère, la mitophagie est induite par de nombreux signaux de stress cellulaire, comme la perte du potentiel de membrane mitochondriale (Elmore et al. 2001). Il existe plusieurs voies de signalisation conduisant à la mitophagie. Une des voies de signalisation contenant PINK1 (PTEN-induced putative protéine kinase 1) et l'E3 ubiquitine ligase Parkin, répond à la perte de potentiel de membrane en ciblant les mitochondries dysfonctionnelles pour être éliminées (Narendra et al. 2008) (**Fig. 23**).

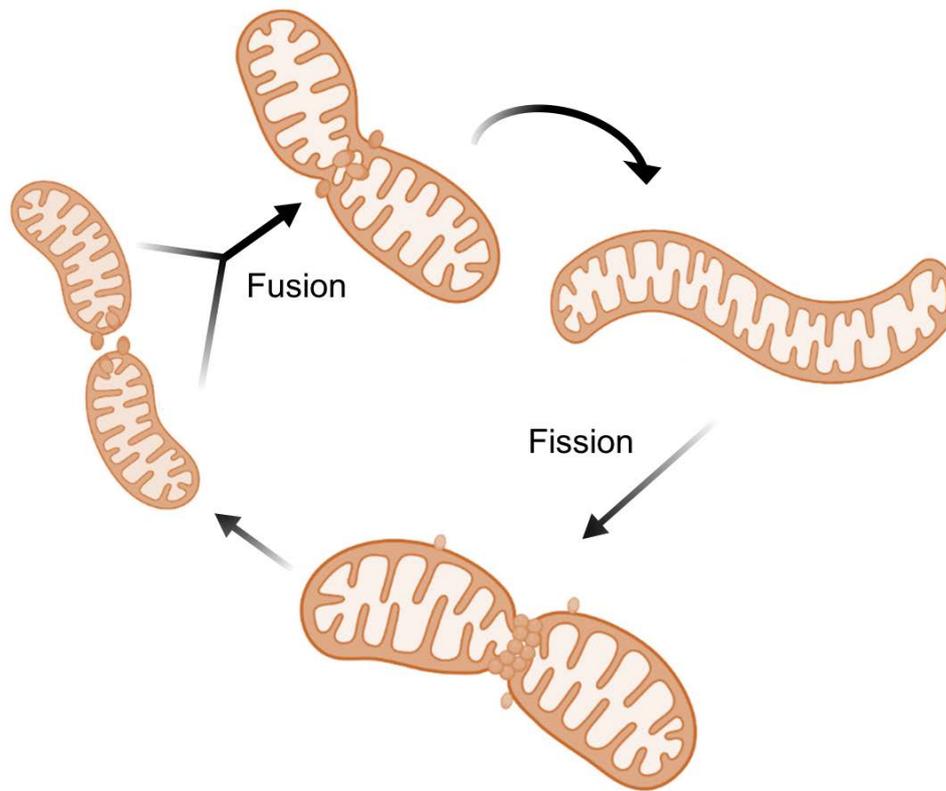


Figure 24 : Dynamique mitochondriale

L'équilibre mitochondrial est maintenu grâce à une balance des événements de fusion et de fission. Adapté de (Leduc-Gaudet et al. 2021)

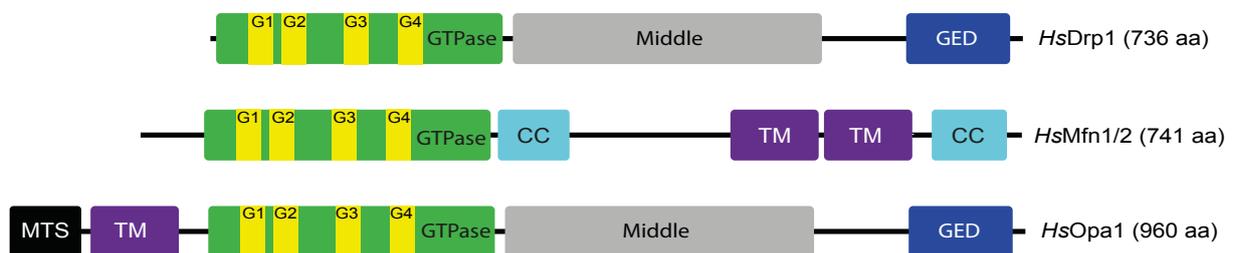


Figure 25 : Comparaison des domaines des protéines Drp1, Mfn1/2 et Opa1 impliquées dans la dynamique mitochondriale

Abréviations : MTS, signal d'adressage à la mitochondrie ; TM, domaine trans-membranaire ; CC, « coiled coil »/superhélice ; Middle, domaine central ; GED, domaine effecteur.

PINK1 en condition saine est importée dans la mitochondrie où elle est dégradée par plusieurs protéases. La perte de potentiel membranaire empêche l'import de PINK1, elle va donc se stabiliser dans la membrane externe de la mitochondrie. Cette accumulation de PINK1 induit la translocation de Parkin du cytosol à la mitochondrie puis son activation (Narendra et al. 2010) (Matsuda et al. 2010) (Vives-Bauza et al. 2010). Parkin ubiquitinylyse de nombreuses protéines mitochondriales de surface qui seront reconnues par les adaptateurs se liant à l'ubiquitine tels que p62, permettant l'adressage des mitochondries endommagées vers l'autophagosome grâce à l'interaction avec la protéine autophagosomale LC3 (Geisler et al. 2010) (Pankiv et al. 2007). De plus, Parkin ubiquitinylyse ses substrats (Mfn1, Mfn2, vDAC1) induisant leur dégradation ce qui produit une fragmentation mitochondriale (Tanaka et al. 2010) (**Fig. 23**).

Aucune preuve de la mitophagie n'a été découverte chez le parasite *T. brucei*. Néanmoins, de fortes indications montrent que *T. brucei* effectue de l'autophagie pour réguler le nombre, la taille et le contenu enzymatique des glycosomes (Herman et al. 2008). La plupart des orthologues des protéines ATG sont retrouvés dans le génome du parasite (Herman et al. 2006). Il serait alors envisageable que des événements de mitophagie se produisent, mais ceci reste à démontrer.

1.2.6. La dynamique mitochondriale

Les mitochondries forment un réseau hautement dynamique, qui continuellement subit des événements de fusion et de fission (**Fig. 24**). Cette balance entre les événements de fission et de fusion permet un maintien de l'équilibre mitochondrial et joue un rôle essentiel dans le bon fonctionnement des mitochondries. La dynamique mitochondriale est un point essentiel lors de la division cellulaire, la mitophagie et de nombreux autres processus cellulaires. Notamment, en permettant une réponse rapide face à des stimuli de stress environnementaux ou métaboliques. Des défauts dans cette dynamique conduisent à des altérations de processus cellulaires essentiels, pouvant aboutir à des maladies sévères, telles que des maladies neurodégénératives, des désordres métaboliques, des cancers mais seraient également à l'origine du vieillissement (Chan 2020).

La dynamique mitochondriale est réalisée par de nombreux acteurs, généralement des dynamines qui sont des protéines à domaine GTPase avec pour fonction principale le remodelage des membranes (**Fig. 25**). Les dynamines subissent des modifications conformationnelles qui dépendent de l'hydrolyse du GTP et qui vont induire de la fusion ou de la fission des membranes.

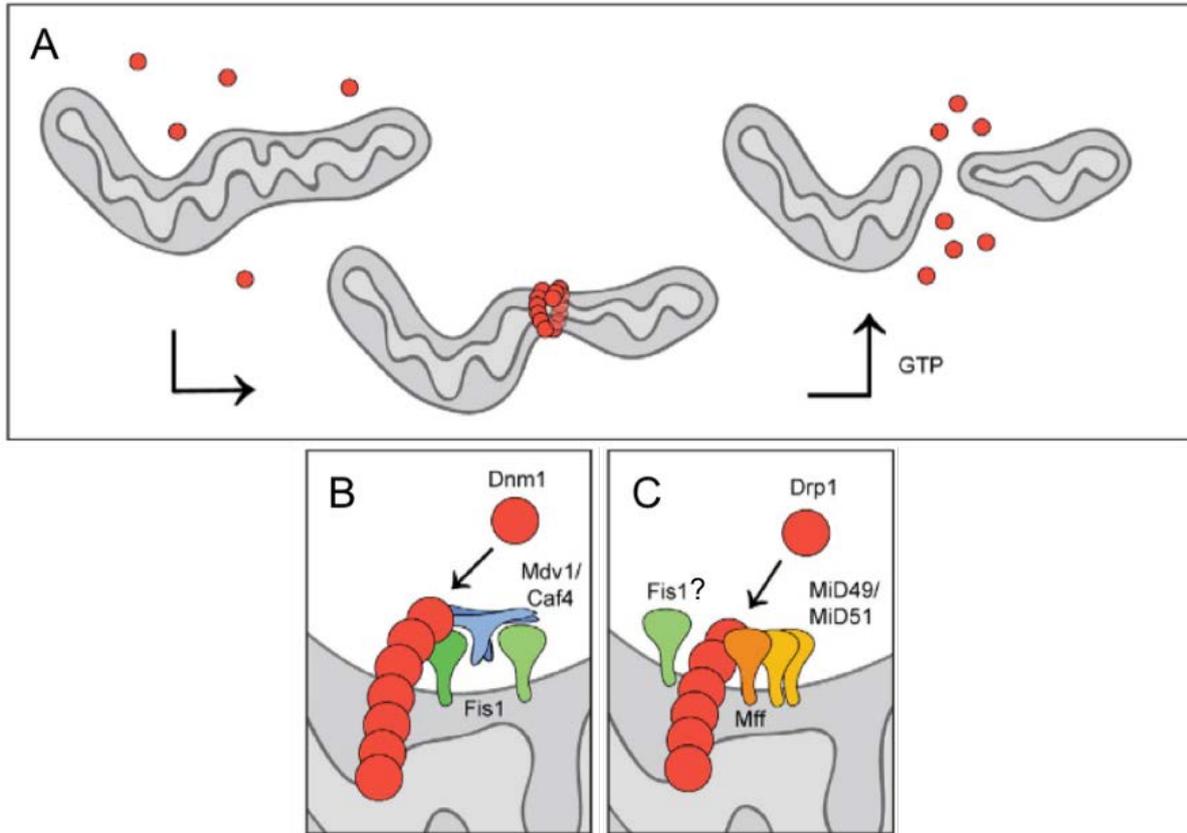


Figure 26 : Fission mitochondriale chez la levure et les cellules de mammifère

La fission mitochondriale chez la levure et les cellules de mammifère qui partagent une protéine clé Drp1/Dnm1. (A) Elle s'oligomérisse en une spirale autour de la mitochondrie, qui est constrictée et se divise en deux grâce à l'hydrolyse du GTP. (B) Chez la levure, Fis1 interagit avec Mdv1/Caf4 permettant le recrutement de Drp1. (C) Chez les mammifères, la fission est médiée par les récepteurs Mff/MiD49/MiD51 qui recrutent Drp1 et s'y associent. Adapté de (Elgass et al. 2013)

1.2.6.1. La fission

La fission mitochondriale est le processus par lequel une mitochondrie unique se sépare en deux mitochondries (**Fig. 26 A**). La fission mitochondriale est essentielle pour la croissance cellulaire et la survie de la cellule. Elle est également requise pour d'autres processus cellulaires, tels que le transport de l'organelle, le contrôle qualité des mitochondries, et la mitophagie.

1.2.6.1.1. Drp1 : protéine clé de la fission mitochondriale

La première étape de la division mitochondriale est le marquage du site de constriction par le réticulum endoplasmique. Le réticulum endoplasmique s'enroule autour de la mitochondrie et conduit à la pré-constriction de la mitochondrie permettant la réduction du diamètre de celle-ci (Friedman et al. 2011).

La suite de la division de la mitochondrie est permise par un des acteurs clés de la fission, une protéine à domaine GTPase nommée Drp1. Drp1 est très conservée entre les organismes, son rôle dans la fission a été décrit dans *Caenorhabditis elegans* (Labrousse et al. 1999), la levure (Dnm1) (Sesaki et Jensen 1999) (Bleazard et al. 1999) puis dans les cellules de mammifère (Smirnova et al. 2001). Drp1 est une protéine cytosolique composée de quatre domaines : en N-terminal un domaine GTPase, un domaine central, un domaine variable et en C-terminal le domaine effecteur GTPase (GED) (**Fig. 25**). La perte de Drp1 induit l'élongation de la mitochondrie et des peroxysomes dans de nombreux types cellulaires (Koch et al. 2003).

Durant la division mitochondriale, Drp1 est recrutée à la membrane externe de la mitochondrie au niveau du site de constriction, où elle s'associe sous une structure en forme d'anneau autour de la mitochondrie induisant un rétrécissement de la membrane. L'hydrolyse du GTP induit la constriction de la membrane qui marque le site de la scission. L'assemblage de Drp1 à la membrane externe de la mitochondrie est médié par le domaine central de Drp1. Drp1 est recrutée à la membrane par d'autres protéines adaptatrices (**Fig. 26**).

1.2.6.1.2. Autres acteurs de la fission mitochondriale

Chez la levure, le recrutement est effectué par un récepteur Fis1 ainsi que deux protéines adaptatrices Mdv1 et Caf4 (Mozdy, McCaffery, et Shaw 2000:1) (Tieu et Nunnari 2000) (Griffin, Graumann, et Chan 2005:40).

Fis1 est une protéine ancrée dans les membranes, elle permet le recrutement de Drp1 à la membrane externe. La surexpression de Fis1 induit une fragmentation de la mitochondrie (James et al. 2003) (Yoon et al. 2003). Mdv1 a été identifiée comme une protéine adaptatrice permettant le lien entre Fis1 et Dnm1 (Tieu et Nunnari 2000) (Naylor et al. 2006). Plus récemment, Num1 et Mdm36 ont été montrées comme interagissant avec Dnm1 pour permettre la fission mitochondriale. La délétion de l'une ou l'autre de ces protéines conduit à la formation d'un réseau mitochondrial fusionné. Num1 et Mdm36 interagissent avec Dnm1 pour ancrer les mitochondries au cortex cellulaire permettant une division mitochondriale par tension membranaire (Cervený et al. 2007) (Hammermeister, Schödel, et Westermann 2010:36). Ainsi, chez la levure, deux complexes incluant Dnm1 ; Dnm1/Mdv1/Fis1 et Dnm1/Num1/Mdm36 co-existeraient (**Fig. 26 B**).

Chez les mammifères, malgré la présence d'un homologue de Fis1, de nombreuses preuves montrent que celui-ci ne semble pas être impliqué dans la fission des mitochondries de cellules mammifères. D'autres acteurs ont été identifiés ; un facteur de fission mitochondrial (MFF) (Gandre-Babbe et van der Blik 2008) et les protéines de dynamiques mitochondriales 49 et 51 (MiD49 et MiD51) qui agissent comme récepteurs pour Drp1 (Palmer et al. 2011) (Losón et al. 2013). MFF permet le recrutement de Drp1 indépendamment de Fis1 (Otera et al. 2010). MFF est ancré dans la membrane externe mitochondriale et la partie C-terminale est retrouvée dans le cytosol. La diminution de l'ARNm de MFF par ARN interférence conduit à une élongation mitochondriale et une réduction de l'association de Drp1 à la mitochondrie alors que la surexpression de MFF conduit à une fragmentation mitochondriale (Otera et al. 2010). MiD49 et MiD51 sont deux orthologues et sont ancrées dans la membrane externe de la mitochondrie avec le C-terminal exposé dans le cytosol. Lors de la surexpression de ces protéines, Drp1 est recruté à la membrane mitochondriale mais se retrouve séquestré sous une forme non-fonctionnelle, conduisant à l'hyperfusion de la mitochondrie. L'ARN interférence de MiD49/MiD51 conduit à une diminution de la présence de Drp1 à la membrane avec un réseau mitochondrial réticulé (Palmer et al. 2011). Des études supplémentaires seront nécessaires pour complètement comprendre l'implication de MiD49 et MiD51 dans la dynamique mitochondriale (Zhao et al. 2011) (Palmer et al. 2011) (**Fig. 26 C**).

La capacité de Drp1 à terminer la fission n'est pas complètement connue. Il semblerait que l'étape finale de scission requiert un procédé supplémentaire. Dyn2/Dnm2 est un candidat pour cette dernière étape.

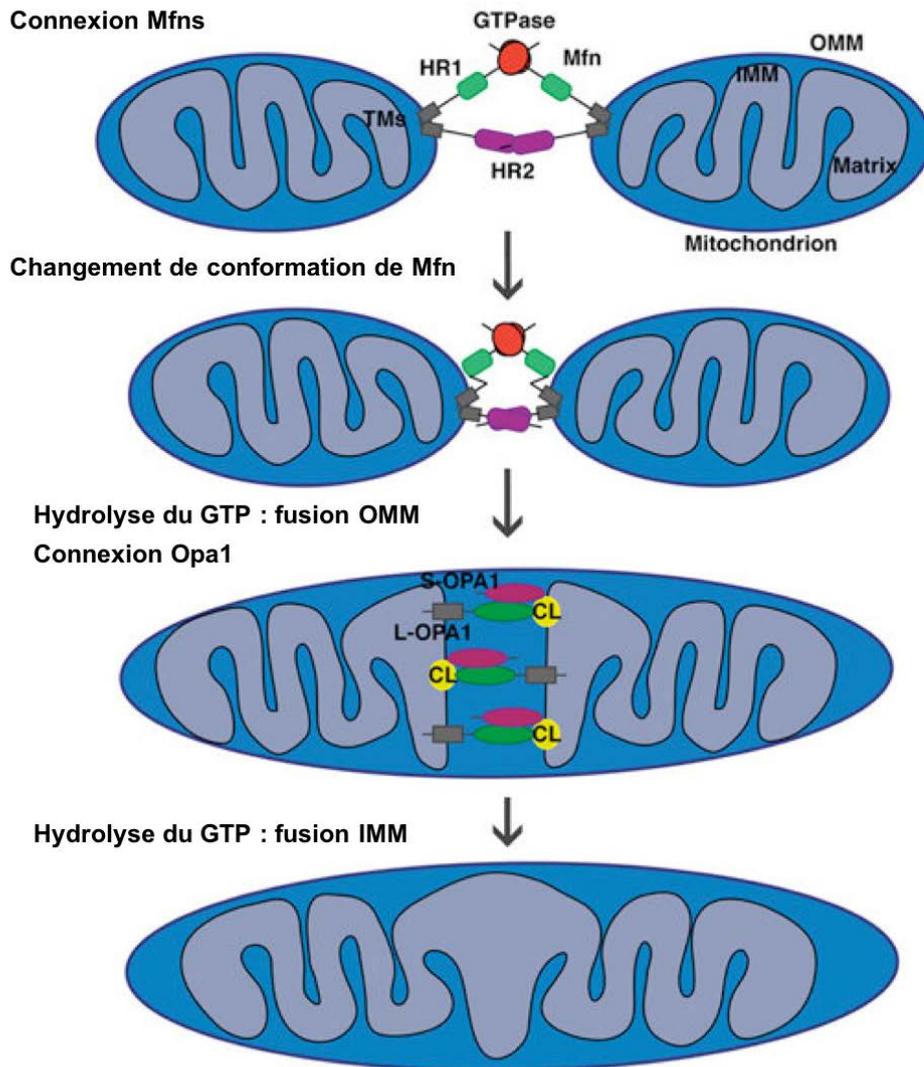


Figure 27 : Fusion mitochondriale chez les mammifères

Représentation schématique de la fusion mitochondriale. Interaction en *trans* des domaines HR2 et/ou des domaines GTPase de deux Mfns. Changement de conformation induisant une augmentation de la surface de contact des mitochondries. L'hydrolyse du GTP par Mfn induit la fusion des membranes externes (OMM). Suivant la fusion de la membrane externe, Opa1 interagit avec la membrane interne opposée. La fusion de la membrane interne est permise par l'hydrolyse du GTP par Opa1. CL, cardiolipine ; OMM, membrane externe de la mitochondrie ; IMM, membrane interne de la mitochondrie ; HR : heptad-repeat ; TM, domaine transmembranaire. Adapté de (Tilokani et al. 2018).

Il possède un domaine GTPase qui s'oligomérisent sous la forme d'un collier autour du site de constriction. Dyn2/Dnm2 est recruté de manière transitoire et spécifique au niveau des sites de constriction de Drp1 et induit la fission (Lee et al. 2016).

1.2.6.2. La fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale est le processus par lequel deux mitochondries distinctes vont se mélanger pour devenir une seule mitochondrie ; les membranes, l'espace intermembranaire ainsi que la matrice seront fusionnés (**Fig. 27**). La fusion mitochondriale permet le maintien de l'homéostasie de la mitochondrie en maintenant une homogénéité génétique et biochimique ; notamment en diluant les espèces réactives de l'oxygène (ERO), en mélangeant les contenus matriciels (enzymes, métabolites etc), en répartissant l'ADNmt et en repolarisant les membranes (Chen et al. 2010).

La fusion mitochondriale requiert deux événements coordonnés et séquentiels qui sont la fusion de la membrane externe puis la fusion de la membrane interne (Song et al. 2009) (Malka et al. 2005). Ces fonctions sont assurées par une machinerie centrale composée de protéines à larges domaines GTPase faisant partie de la famille des dynamines.

1.2.6.2.1. Fusion de la membrane externe de la mitochondrie (OMM)

La fusion de la membrane externe est médiée par des mitofusines, premières protéines découvertes comme importantes pour la fusion de la mitochondrie. Fzo/Fzo1/Mfn, premièrement caractérisée chez *Drosophila melanogaster* (Fzo) (Hales et Fuller 1997), est conservée chez la levure (Fzo1) (Hermann et al. 1998) et chez les mammifères (Mfn) (Santel et Fuller 2001) (Legros et al. 2002) (Eura et al. 2003). Chez les mammifères, il existe deux homologues Mfn1 et Mfn2, partageant 80% de similarité. Des mutations dans le gène de Mfn2 sont reliées à une maladie nommée Charcot-Marie Tooth de type 2A.

La surexpression de chaque Mfn induit une agrégation de la mitochondrie autour du noyau (Legros et al. 2002) (Eura et al. 2003), la délétion de Mfn1 induit une fragmentation mitochondriale et la délétion de Mfn2 conduit à des mitochondries sphériques (Chen et al. 2003). La délétion de l'une ou de l'autre est fatale *in utero* chez la souris (Chen et al. 2003). Le défaut de fusion mitochondriale lié à l'absence de Mfn1 et/ou de Mfn2 peut être restauré par l'expression de l'une ou de l'autre (Chen et al. 2003).

Bien que Mfn1 et Mfn2 soient impliquées dans la fusion, chacune possède des particularités. Mfn1 et Mfn2 sont fortement exprimées dans de nombreux tissus mais leur niveau d'expression diffère (Santel et al. 2003). Mfn1 possède une plus forte affinité pour le GTP (Ishihara 2004).

Mfn1 et Mfn2 partagent une structure moléculaire similaire, en N-terminal on retrouve le domaine GTPase suivi du domaine d'interaction « coiled-coil » (CC) ou HR1 (Heptad-repeat), deux domaines transmembranaires et en C-terminal le domaine d'interaction HR2 (**Fig. 25**).

Elles sont ancrées dans la membrane externe grâce aux deux domaines transmembranaires de la protéine séparés par une boucle laissant la partie C-terminale possédant le domaine d'interaction HR2 (heptad-repeat) ainsi que la partie N-terminale contenant le domaine GTPase et le domaine HR1 dans le cytosol (Rojo et al. 2002). Plus récemment, un second modèle de topologie a été envisagé. Dans ce modèle, Mfn possède un seul domaine transmembranaire conduisant à retrouver la partie C-terminale au niveau de l'espace intermembranaire (Mattie et al. 2018) (**Fig. 27**).

La fusion de la membrane externe est réalisée en trois grandes étapes ; premièrement la connexion entre deux mitochondries est permise par l'interaction en *trans* des domaines HR2 et/ou des domaines GTPases des mitofusines, formant ainsi des homo-hétérodimères (Mfn1-Mfn1, Mfn1-Mfn2, Mfn2-Mfn2). Deuxièmement, l'augmentation de la surface de contact et la diminution de la distance entre les deux mitochondries grâce à un changement de conformation des mitofusines. Enfin, la dernière étape est la fusion des deux membranes grâce à l'hydrolyse du GTP. (Koshiba et al. 2004) (Qi et al. 2016) (Cao et al. 2017). (**Fig. 27**).

La composition de la membrane externe de la mitochondrie semble également jouer un rôle dans la fusion dépendante de Mfn puisqu'il a été montré que l'accumulation en acide phosphatique induit la fusion médiée par les mitofusines (Choi et al. 2006). De plus, chez la levure, les cardiolipines ainsi que les phosphatidyléthanolamines sont impliquées dans la fusion mitochondriale montrant le rôle central des phospholipides et de la composition des membranes dans la dynamique mitochondriale (Joshi et al. 2012).

1.2.6.2.2. Fusion de la membrane interne de la mitochondrie (IMM)

La fusion de la membrane interne de la mitochondrie est coordonnée à celle de la membrane externe, elle s'effectue dès la fin de la fusion de la membrane externe (**Fig. 27**).

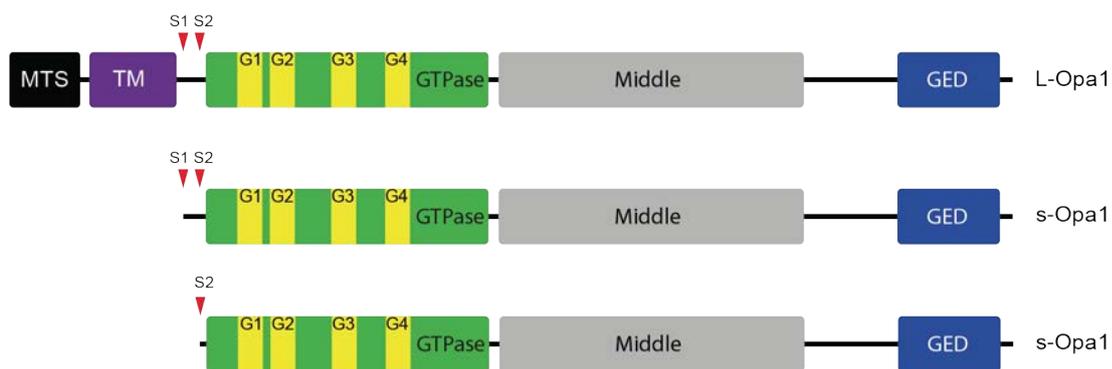


Figure 28 : Formes longue et courte de Opa1

La forme longue de Opa1 possède deux sites S1 et S2 permettant le clivage protéolytique par OMA1 ou YME1 à l'origine de la forme courte.

Une protéine à domaine GTPase Opa1 joue un rôle crucial pour la fusion de la membrane interne, mais aussi pour la maintenance de l'ADN mitochondrial, l'assemblage des supercomplexes de la chaîne respiratoire et l'efficacité énergétique (Elachouri et al. 2011:1) (Cogliati et al. 2013). Opa1, comme les autres mitofusines, est très conservée au travers des espèces, elle a premièrement été décrite chez la levure (Mgm1) (Sesaki et al. 2003). C'est au début des années 2000 que des mutations dans la séquence codante Opa1 ont été montrées comme étant à l'origine d'une dégénérescence optique nommée atrophie optique dominante (AOD) (Delettre et al. 2000). La déplétion de Opa1 conduit à une altération de la forme des crêtes et de la morphologie mitochondriale.

Opa1 est localisée dans l'espace intermembranaire ancré dans la membrane interne de la mitochondrie (Olichon et al. 2002). Il existe 8 variants de l'ARNm de Opa1 lié à des modifications post-transcriptionnelles, chaque variant est exprimé mais leur abondance varie en fonction du tissu (Olichon et al. 2007). Les 8 variants de l'ARNm proviennent d'un épissage alternatif de l'exon 4. Opa1 est composée d'une séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS) en N-terminal, suivie par un domaine transmembranaire puis un domaine d'interaction, le domaine GTPase, un domaine central et enfin un domaine effecteur de la GTPase (GED) en C-terminal (**Fig. 25**).

Opa1 possède deux formes majoritaires qui sont la forme longue et la forme courte. La balance entre ces deux types de forme est directement impliquée dans la balance de la fusion et le maintien du réseau mitochondrial. En excès de forme courte, il y a une inhibition de la fusion avec l'apparition d'un réseau fragmenté, ce phénomène est impliqué dans le contrôle qualité des mitochondries et la mitophagie. (Duvezin-Caubet et al. 2006) (Song et al. 2007)

Dès l'entrée de la protéine dans la mitochondrie, le MTS est clivé formant l'isoforme long de Opa1. La forme longue de Opa1 peut subir des clivages protéolytiques qui généreront les formes courtes solubles retrouvées dans l'espace intermembranaire (**Fig. 28**). Les clivages sont réalisés par deux métalloprotéases OMA1 et YME1L, qui clivent respectivement le site S1 et le site S2 (**Fig. 28**) (Song et al. 2007) (Griparic, Kanazawa, et van der Bliek 2007) (Head et al. 2009) (Ehnes et al. 2009).

La présence de cardiolipines dans les membranes est essentielle pour la fusion de la membrane interne de la mitochondrie (DeVay et al. 2009) (Ban et al. 2017) (**Fig. 27**). La composition lipidique des membranes est un facteur primordial dans la fusion. Les cardiolipines sont des lipides chargés négativement, retrouvés principalement dans la membrane interne des mitochondries. Les cardiolipines stimulent l'assemblage et l'activité de Opa1 (Ban et al. 2010) (Ban et al. 2017).

De plus, Mfn1 mais pas Mfn2 est essentielle pour la fusion de la membrane interne par Opa1, ce qui suggère une potentielle interaction entre les deux dynamines (Cipolat et al. 2004).

1.2.6.3. Modifications post-traductionnelles régulant la dynamique

De nombreuses modifications post-traductionnelles des composants clés de la dynamique mitochondriale sont à l'origine de la régulation de ces mécanismes.

Les modifications post-traductionnelles régulant les mécanismes de fission et notamment impliquant Drp1 ont été fortement étudiées. Les phosphorylations de la sérine 616 et de la sérine 637 de Drp1 sont impliquées dans la régulation de la fission. La phosphorylation de la sérine 616 par la cdk1/cyclin B kinase de Drp1, favorise la fission lors de la mitose (Taguchi et al. 2007). La phosphorylation de la sérine 637 par la protéine kinase A inhibe la fission protégeant la mitochondrie de la dégradation (Chang et Blackstone 2007). En plus de la phosphorylation d'autres modifications peuvent être effectuées sur Drp1 pour réguler son potentiel de fission telles que la SUMOylation et l'ubiquitylation (Figueroa-Romero et al. 2009) (Karbowski, Neutzner, et Youle 2007). Les récepteurs de Drp1 subissent aussi des modifications post-traductionnelles à l'origine de la régulation de la dynamique mitochondriale. La phosphorylation de MFF induit le recrutement de Drp1 et conduit à la fission mitochondriale (Toyama et al. 2016). MiD49 peut être ubiquitylé par MARCH5/MITOL conduisant à sa dégradation (Xu et al. 2016).

La régulation des mécanismes de fusion par des modifications post-traductionnelles est moins décrite que pour la fission. Mfn1 et Mfn2 peuvent être ubiquitylées pour réguler leur activité et leur stabilité (Gegg et al. 2010) (Chen et Dorn 2013:1) (Park et al. 2014) (Glauser et al. 2011). En plus, Mfn1 peut subir d'autres modifications telles que l'acétylation ou la phosphorylation (Lee et al. 2014) (Park et al. 2014) (Pyakurel et al. 2015). La régulation de Opa1 par des clivages protéolytiques joue un rôle essentiel, en plus de ces modifications Opa1 peut être acétylée (Samant et al. 2014).

1.2.6.4. La dynamique mitochondriale des protistes

Bien que les mécanismes de la dynamique mitochondriale aient fortement été étudiés chez les organismes modèles tels que la levure, la drosophile ou les mammifères, très peu de ces mécanismes sont connus chez les parasites protozoaires. Les mécanismes et les voies de régulation de cette dynamique mitochondriale peuvent être conservés avec d'autres organismes.

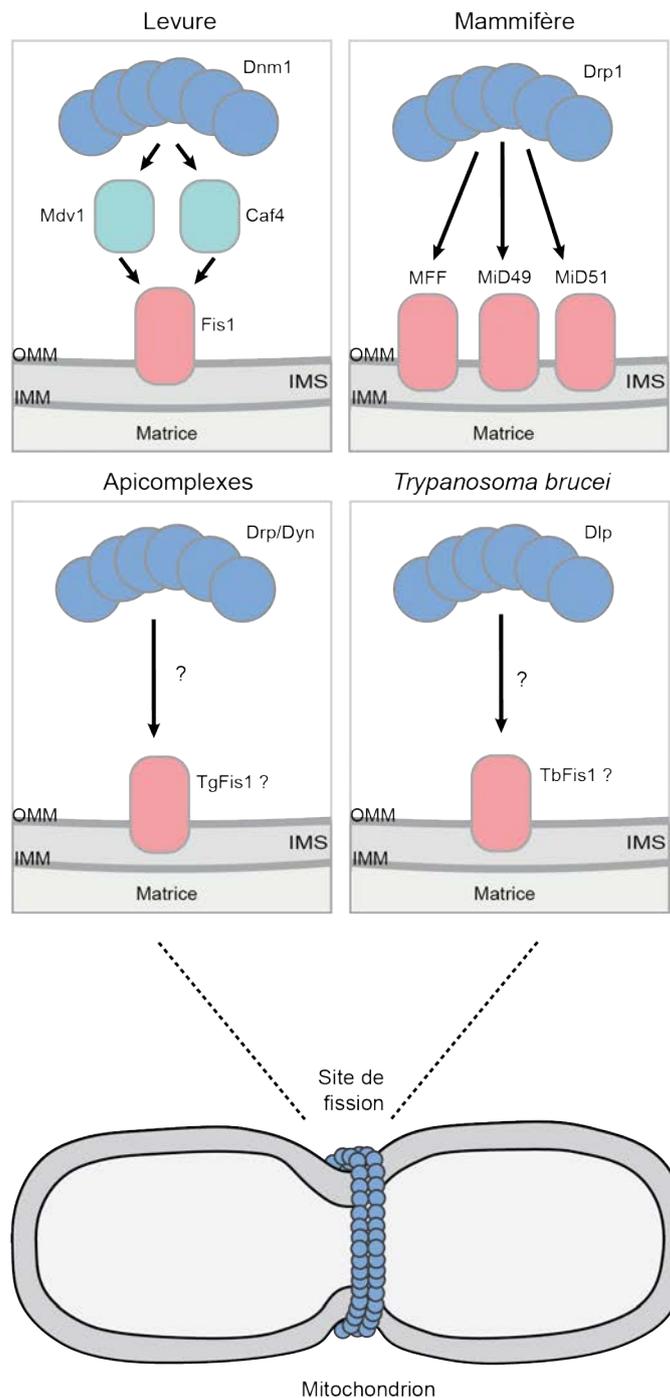


Figure 29 : Comparaison des systèmes de fission entre la levure, les cellules de mammifère, les parasites Apicomplexes et *Trypanosoma brucei*

Des orthologues de Dnm1/Drp1 sont retrouvés chez *Plasmodium spp*, *Toxoplasma gondii* et *T. brucei*. Un orthologue de Fis1 est retrouvé chez *T. gondii* et chez *T. brucei* mais il ne semble pas impliqué dans la fission, ce qui signifie qu'il existe probablement d'autres récepteurs. Adapté de (Verhoef, Meissner, et Kooij 2021).

De par leur cycle de vie complexe, impliquant des changements d'environnement drastiques, la mitochondrie et la dynamique mitochondriale chez ces organismes présentent des particularités uniques.

1.2.6.4.1. Les apicomplexes

L'embranchement des apicomplexes regroupe des eucaryotes unicellulaires intracellulaires possédant un complexe apical : *Plasmodium spp* ainsi que *Toxoplasma gondii* font partie des apicomplexes.

Plasmodium spp est un parasite qui comprend 5 espèces responsables du paludisme chez l'Homme ainsi que chez d'autres mammifères, il est transmis par un insecte hématophage l'anophèle (Cowman et al. 2016).

T. gondii est un parasite infectant son hôte définitif le félin. Il est responsable de la toxoplasmose avec notamment l'Homme comme hôte intermédiaire, transmis par l'intermédiaire de viandes crues ou peu cuites contaminées par des formes kystiques ou par l'ingestion d'oocytes lors de manipulation de litière de chat ou de jardinage (Tenter, Heckeroth, et Weiss 2000).

Plasmodium spp comme *T. gondii* possède une mitochondrie unique et bien qu'une forte synchronie ait été observée entre la division de la cellule et celle de la mitochondrie les mécanismes moléculaires de la fusion et de la fission sont mal connus (Melo, Attias, et De Souza 2000) (Stanway et al. 2011). Aucune preuve de la fusion mitochondriale n'a été observée chez les deux parasites. La fission est quant à elle essentielle pour la division de la mitochondrie. Deux orthologues des dynamines ont été identifiés chez *Plasmodium spp* ; Dyn1 et Dyn2 mais la machinerie de la fission reste inconnue (Li et al. 2004) (Charneau et al. 2007). Pour *T. gondii*, trois protéines Drp sont retrouvées dans son génome : TgDrpA, TgDrpB et TgDrpC. TgDrpA et TgDrpB sont impliquées dans la biogenèse de l'apicoplaste (van Dooren et al. 2009) (Breinich et al. 2009). TgDrpC semble être impliquée dans la division mitochondriale, en effet des défauts de morphologie mitochondriale sont observés lors de la modification du taux de la protéine (Heredero-Bermejo et al. 2019) (Melatti et al. 2019). L'homologue de Fis1 est retrouvé dans le génome de *T. gondii* mais n'est pas directement impliqué dans les mécanismes de fission mitochondriale contrairement à chez la levure (Melatti et al. 2019) (**Fig. 29**).

1.2.6.4.2. *Trypanosoma brucei*

Le trypanosome africain possède aussi une mitochondrie unique qui subit des modifications drastiques de morphologie au cours du cycle de vie du parasite. Dans la forme sanguine, la mitochondrie est tubulaire, tandis que dans la forme procyclique la mitochondrie est réticulée. La dynamique mitochondriale qui accompagne ce changement de structure mitochondriale au cours du cycle de vie est peu connue.

Deux orthologues des protéines Drp1 et Fis1 ont été retrouvés dans le génome de *T. brucei*. *TbDlp*, orthologue à Drp1, est localisée au niveau de la mitochondrie et de la poche flagellaire. La délétion de *TbDlp* conduit à une altération de la division mitochondriale et de l'endocytose (Morgan, Goulding, et Field 2004) (Chanez et al. 2006). Aucune preuve que la fission mitochondriale a lieu en dehors de la division n'a été cependant montrée (Hughes et al. 2017).

En ce qui concerne la fusion mitochondriale, il n'existe pas de preuve directe que celle-ci a lieu. Chez le protozoaire apparenté à *T. brucei* : *Crithidia fasciculata*, la mitochondrie unique a été reportée comme étant un réseau dynamique, effectuant de la fission et de la fusion mais à un niveau bien plus faible que chez la levure ou les cellules de mammifère (DiMaio et al. 2018). Il existe cependant un homologue des mitofusines, *TbMfnL*, dans le génome de *T. brucei*. La réduction de l'expression par ARN interférence de cette protéine induit une augmentation de la réticulation de la mitochondrie dans la forme sanguine, ce qui la caractérise plus comme une protéine de fission (Vanwalleghem et al. 2015).

Enfin, le protéome de la membrane externe de la mitochondrie, a permis de révéler un certain nombre de protéines spécifiques des trypanosomes et dont la fonction reste inconnue (Niemann et al. 2013). Parmi celles-ci, l'ablation individuelle de POMP9, POMP14 ou POMP40 affecte la morphologie de la mitochondrie. Il s'agit des premières protéines spécifiques des trypanosomes qui semblent être impliquées dans la maintenance de la morphologie mitochondriale (Niemann et al. 2013). L'étude de leur mode d'action et de leur implication dans la dynamique mitochondriale pourrait permettre de découvrir de nouveaux mécanismes et fonctionnements de la dynamique mitochondriale.

Bien que quelques acteurs de la dynamique mitochondriale aient été identifiés chez ces protozoaires, une grande partie des mécanismes de la dynamique mitochondriale reste inconnue.

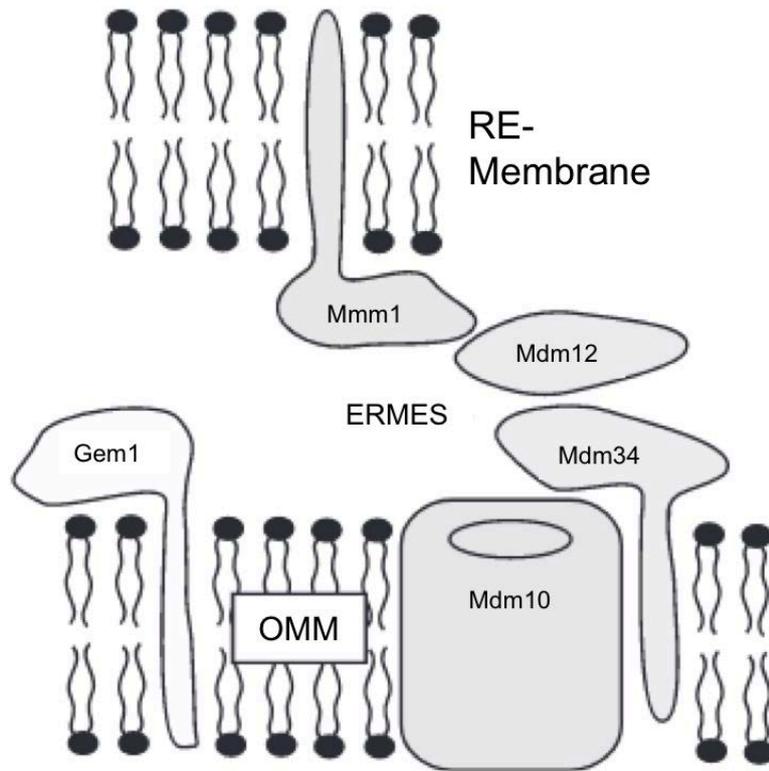


Figure 30 : Le complexe ERMES

Le complexe ERMES est composé de Mmm1, Mdm12, Mdm34 et Mdm10. Gem1 est un régulateur du complexe. OMM, membrane mitochondriale externe ; RE, réticulum endoplasmique. Adapté de (Wideman et al. 2013)

Certains acteurs de la fission ont été identifiés mais la balance permanente de la fusion et de la fission observée chez les organismes modèles n'a, à ce jour, pas été observée chez ces parasites. De par leur unique mitochondrie cette dynamique pourrait être réduite et se faire seulement à des moments-clés du cycle de vie du parasite.

1.2.7. Interaction des mitochondries avec les autres organelles de la cellule

Les mitochondries interagissent en permanence avec les autres organelles de la cellule. Cette communication peut se faire par des cascades de signalisation, mais également via des contacts directs avec les autres organelles.

1.2.7.1. RE-mitochondrie et le complexe ERMES

Le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie sont deux organelles qui échangent et communiquent grâce à des connexions physiques permettant de nombreuses fonctions essentielles à la cellule. La région d'interaction entre le RE et la mitochondrie est appelée MAM (membranes associées à la mitochondrie). L'une des fonctions des MAMs est l'échange de lipides. Le RE est le centre de production des phospholipides et les distribue par transport vésiculaire. La mitochondrie de par ses doubles membranes ne reçoit pas de phospholipides provenant du trafic vésiculaire du RE. De ce fait, les contacts entre le RE et la mitochondrie ont été proposés comme une voie d'échange lipidique (Vance 1990). Une autre fonction de cette communication est l'échange de calcium.

Le calcium est un régulateur intracellulaire impliqué dans une grande variété de processus. La mitochondrie et le RE sont des organelles de stockage du calcium et le transfert du calcium entre les organelles est crucial pour la vie cellulaire. Il est faiblement importé dans les mitochondries isolées. Cependant, lors de relargage de calcium dans la cellule par le RE, une augmentation dans le cytosol et dans les mitochondries est observée (Rizzuto et al. 1993). L'interaction entre le RE et la mitochondrie permet cet échange.

Chez la levure, il existe de nombreuses protéines impliquées dans ce processus d'interaction entre RE et mitochondrie (Kornmann et al. 2009). Mdm12, a été la première protéine découverte, présente dans la membrane externe de la mitochondrie. Elle est dans un complexe contenant Mdm10 et Mdm34 d'autres protéines de la membrane externe de la mitochondrie ainsi que Mmm1 une protéine du réticulum endoplasmique. Les quatre protéines forment un complexe stable entre le RE et la mitochondrie nommé ERMES (ER-Mitochondria Encounter Structure) (Kornmann et al. 2009) (Boldogh et al. 2003) (**Fig. 30**). Le régulateur de ce complexe est la GTPase Miro Gem1.

Gem1 co-localise avec le complexe ERMES (**Fig. 30**). La délétion de Gem1 ne modifie pas la formation du complexe ERMES mais son organisation cellulaire (Kornmann, Osman, et Walter 2011:1) (Stroud et al. 2011).

Chez les mammifères, le complexe ERMES n'est pas retrouvé, à l'exception du régulateur Gem1 qui possède un orthologue Miro-2. La première protéine découverte comme régulateur des MAMS est PACS-2 (Phosphofurin Acidic Cluster Sorting 2). PACS-2 est nécessaire à la communication, l'homéostasie du RE et pour l'apoptose qui se produit après un transfert massif de calcium du RE aux mitochondries (Simmen et al. 2005). Mfn-2, acteur-clé de la fusion de la membrane externe, est également impliquée dans les connections entre la mitochondrie et le RE (de Brito et Scorrano 2008).

1.2.7.2. La mitochondrie et les autres organelles

Les peroxysomes sont des organelles dynamiques possédant une seule membrane composée d'une bicouche lipidique, leur nombre ainsi que leur activité s'adaptent aux différents stimuli environnementaux. Ils jouent un rôle dans la biosynthèse et la transduction des signaux incluant la biosynthèse d'étherphospholipides, l' α et la β oxydations des acides gras et le catabolisme des acides aminés. La communication entre les peroxysomes et les mitochondries est impliquée dans le maintien de la balance lipidique et des EROs. Les deux organelles sont liées par des sites de contacts étroits et précis (Cohen et al. 2014). Dans les cellules de mammifère, le contact entre les deux est permis par un complexe comprenant l'isomérase enoyl-CoA2 (ECI2) (Fan et al. 2016).

Les gouttelettes lipidiques sont des organelles spécialisées de la cellule couvertes par une monocouche lipidique. Leur fonction est le stockage des lipides neutres, leur transport, leur synthèse et l'hydrolyse lipidique. Les mitochondries interagissent avec les gouttelettes lipidiques pour maintenir une homéostasie des lipides, en permettant notamment l'échange des acides gras. Certaines mitochondries co-purifiées avec les gouttelettes lipidiques peuvent être séparées à forte centrifugation tandis que d'autres restent associées à celles-ci. Ce phénomène semble révéler l'existence de deux types de sites de contacts entre les mitochondries et les gouttelettes lipidiques : les stables et les dynamiques. Le rôle et les acteurs permettant ces contacts restent encore mal connus. (Cui et Liu 2020)

1.2.7.3. Interaction de la mitochondrie chez le trypanosome africain

Dans le génome de *T. brucei*, on retrouve des orthologues aux composants du complexe ERMES tels que MDM12, MDM34 et Gem1 (Wideman et al. 2013). MDM12 et MDM34 sont retrouvées au niveau du cytosol et Gem1 possède une localisation mitochondriale (TrypTag). Cependant, elles ne sont pas requises pour la maintenance de l'ADN mitochondrial comme chez la levure (Schnarwiler et al. 2014). Il n'y a à ce jour pas de preuve que *T. brucei* possède un complexe ERMES similaire et fonctionnel à celui retrouvé chez la levure.

Une étude récente a révélé qu'un complexe nommé *TbEMC* (Complexe de protéines de la membrane du RE) est localisé au niveau de l'interface entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Iyer et al. 2022). Ce complexe est composé de 9 sous-unités et la déplétion individuelle des sous-unités conduit à un arrêt de la formation *de novo* de phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine (Iyer et al. 2022). Sa localisation au niveau de l'interface entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, pourrait suggérer un potentiel rôle dans l'échange, entre la mitochondrie et le RE, de précurseurs des phospholipides (Iyer et al. 2022).

A part ces quelques études montrant une interaction potentielle entre la mitochondrie et le RE, il n'y a à ce jour pas d'autres preuves d'interaction de la mitochondrie avec d'autres organelles. Il reste néanmoins fortement envisageable que comme dans les autres organismes ces interactions soient présentes et requises pour de multiples fonctions biologiques.

Objectif :

La mitochondrie unique du parasite *Trypanosoma brucei* est une organelle essentielle participant à sa capacité d'adaptation aux différents environnements de ses hôtes et vecteurs. La dynamique mitochondriale, jouant un rôle déterminant dans le bon fonctionnement de la mitochondrie et plus globalement de la cellule, a été cependant peu décrite chez *T. brucei*. Chez les autres organismes modèles, la dynamique mitochondriale correspond à une balance entre des événements de fusion et de fission faisant intervenir de nombreux acteurs.

Cette thèse avait pour objectif d'identifier et de caractériser de potentiels candidats pouvant être impliqués dans la dynamique mitochondriale. Dans la première partie de ma thèse, j'ai étudié la mitofusine *TbMfnL* (Tb927.7.2410). Mes travaux ont permis la caractérisation de la première protéine impliquée dans la fusion mitochondriale chez le parasite *T. brucei*. De nombreux aspects ont été étudiés incluant la localisation de la protéine, son importance dans le cycle de vie du parasite, son rôle dans la structuration de la mitochondrie et son impact sur le métabolisme du parasite. Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai débuté la recherche de partenaires de *TbMfnL*. Cette étude servant de prémisse à la compréhension des mécanismes gouvernant la structure mitochondriale et sa dynamique.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Les lignées cellulaires

2.1.1.1. Les trypanosomes

Lors de ma thèse j'ai utilisé des lignées cellulaires de l'espèce *Trypanosoma brucei brucei*, exprimant de manière constitutive l'ARN polymérase du phage T7 (ARNpT7) ainsi que le répresseur à la tétracycline (TetR). Ces lignées permettent l'expression de manière inductible de gènes ectopiques dépendant de l'ajout de tétracycline dans le milieu de culture. La souche EATRO1125.T7T de la forme procyclique ainsi que la souche 427 90.13 de la forme sanguine ont été utilisées lors de cette étude, ces souches sont monomorphiques, par conséquent elles ne peuvent se différencier.

2.1.1.2. Les leishmanies

Un second modèle d'étude a été utilisé lors de ma thèse : les leishmanies, particulièrement la forme promastigote de l'espèce *L. mexicana*, forme présente dans le phlébotome. Les leishmanies contrairement à *T. brucei* ont la capacité à répliquer et conserver les plasmides au cours du temps mais le système inductible à la tétracycline n'est pas fonctionnel ainsi que l'ARN interférent.

2.1.1.3. Les bactéries

Les bactéries *E. coli* XL1-Blue cellules compétentes ont été utilisées pour la transformation et l'amplification des plasmides purifiés. Ces bactéries possèdent les caractéristiques suivantes ; elles sont déficientes pour l'endonucléase A (endA) induisant une amélioration de la qualité de l'ADN lors de l'extraction plasmidique, et elles sont déficientes pour la recombinaison (*recA*), permettant une meilleure stabilité de l'insert lors des clonages.

Les bactéries BL1-Star (ThermoFisher) ont été utilisées pour l'expression et la production de la protéine recombinante *TbMfnL*. Elles permettent l'expression et la production de protéines recombinantes en forte quantité.

Antibiotiques				
Nom	PCF	BSF	Leishmanies	Références
Hygromycine B	25 µg/ml	5 µg/ml	100 µg/ml	Ant-hg-1 Invivogen (Sigma)
Néomycine – G418	10 µg/ml	2,5 µg/mL	40 µg/ml	Ant-gn-1 Invivogen (Sigma)
Phléomycine	5 µg/ml	2,5 µg/mL	10 µg/ml	Ant-ph-1 Invivogen (Sigma)
Tétracycline	1 µg/ml	10 µg/mL	/	Sigma T-3383
Blasticidine	10 µg/ml	5 µg/mL	100 µg/ml	Ant-bl-1 Invivogen (Sigma)
Puromycine	1 µg/ml	0,1 µg/mL	100 µg/ml	Ant-pr-1 Invivogen (Sigma)

Tableau 2 : Antibiotiques utilisés

2.1.1.4. Cellules de mammifère

Les cellules de mammifère utilisées sont des fibroblastes d'embryon de souris (MEF). Ces cellules ont été utilisées pour exprimer la protéine d'intérêt dans un système hétérologue.

2.1.2. Milieux de culture

2.1.2.1. La forme procyclique

La forme procyclique est maintenue en culture à 27°C et 5% de CO₂ dans du milieu SDM79 contenant 10% (v/v) sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 5 µg/ml d'hémine, 20000 U de pénicilline, 20 mg de streptomycine, 25 µg/ml d'hygromycine et 10 µg/ml de néomycine (Brun et Schönenberger 1979).

Les parasites ont également été mis en culture dans un milieu appauvri en glucose (SDM80), avec ajout de 50 mM de N-acétylglucosamine, inhibant le transport du glucose résiduel présent dans le sérum (Allmann et al. 2013).

2.1.2.2. La forme sanguine

La forme sanguine est maintenue en culture à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) contenant 10% (v/v) sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 0.2 mM β-mercaptoéthanol, 36 mM NaHCO₃, 1 mM hypoxanthine, 0.16 mM thymidine, 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM bathocuprone et 1.5 mM L-cystéine 20000 U de pénicilline, 20 mg de streptomycine, 5 µg/ml d'hygromycine et 2.5 µg/ml de néomycine (Hirumi et Hirumi 1989).

2.1.2.3. Les leishmanies

Les leishmanies sont cultivées à 27°C et 5% de CO₂ dans du milieu SDM79 contenant 10% (v/v) sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 5 µg/ml d'hémine (citation), 20000 U de pénicilline, 20 mg de streptomycine. Ces conditions de culture sont similaires à celles de la forme procyclique de *T. brucei*, à l'exception des concentrations en antibiotiques utilisées pour maintenir les différentes lignées (**Tab. 2**).

2.1.2.4. Les bactéries

Les bactéries XL1-Blue et BL1-Star ont été cultivées à 37°C en milieu LB (Lysogeny Broth Base : 10 g/L Bacto-tryptone, 5 g/L extraits de levure, 10 g/L de NaCl) gélosé ou liquide.

2.1.2.5. Cellules de mammifère

Les MEF ont été cultivés dans du milieu « Dulbecco's modified Eagle's medium » (DMEM, Life Technologies) complété par 10 % de sérum de veau foetal (SVF, Life Technologies) et 1 % de pénicilline/streptomycine et ont été maintenus à 37°C dans 5 % de CO₂. Les expériences ont été réalisées par Manuel Rojo.

2.1.3. Vecteurs d'expression

2.1.3.1. Trypanosomes

2.1.3.1.1. pLew100

Le vecteur pLew100 (Wirtz et al. 1999) est un vecteur utilisé pour l'expression constitutive ou conditionnelle de gènes d'intérêt dans les parasites. Il possède une origine de répllication permettant son maintien et son amplification dans les systèmes bactériens. Il possède également un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection du plasmide dans les bactéries par sélection antibiotique avec de l'ampicilline. pLew100 s'intègre par recombinaison homologue dans une région de l'ARN ribosomique de *T. brucei*. La région de l'ARN ribosomique ciblée est une région fortement exprimée, permettant une forte expression des gènes contenus dans le plasmide. La sélection de l'intégration du plasmide dans les parasites est permise par la présence du gène de résistance à la phléomycine (Ble) sous contrôle du promoteur fort à la polymérase T7. Afin que pLew100 puisse permettre l'expression conditionnelle du gène d'intérêt, il possède, sous contrôle du promoteur fort GPEET, la séquence TetO, opérateur à la tétracycline. Ce système permet l'expression de manière inductible du gène d'intérêt dépendant de l'ajout de tétracycline. Pour que cela puisse convenablement fonctionner, les parasites doivent posséder le gène d'expression de la polymérase T7 ainsi que le gène TetR, tétracycline répresseur.

L'expression constitutive est également possible avec ce plasmide, pour ce faire le plasmide est similaire au pLew100 conditionnel, à la différence qu'il ne possède pas la séquence TetO. Par conséquent, pour que ce système fonctionne les parasites doivent uniquement posséder préalablement le gène d'expression de la polymérase T7.

2.1.3.1.2. pHD1336

La plasmide pHD1336 (Biebinger et al. 1997) est un vecteur d'expression conditionnelle utilisé dans les parasites *T. brucei*. Il possède les mêmes caractéristiques que le pLew100 à la différence de la sélection de l'intégration du plasmide dans les parasites, qui est permise par la présence du gène de résistance à la blasticidine (Bsd).

2.1.3.1.3. pPOT

Les vecteurs pPOT (Dean et al. 2015) sont une série de vecteurs permettant l'étiquetage endogène par amplification PCR de celui-ci. Le pPOTv7 est un dérivé du pPOTv4, ce plasmide contient partant du 5' au 3', un site unique de liaison pour l'amorce sens, une étiquette 10x HA suivi par le 3'UTR de la PFR (tige paraflagellaire), puis le gène de résistance à la blasticidine (bsd) et enfin un site unique de liaison pour l'amorce antisens.

2.1.3.2. Leishmanies

2.1.3.2.1. pNUS

Le plasmide pNUS (Tetaud et al. 2002) est un vecteur d'expression utilisé dans les leishmanies. Ce plasmide contient une origine de réplication, des séquences 5' et 3' UTR permettant l'expression du gène d'intérêt et des gènes de résistance à la néomycine pour la sélection dans le parasite et à l'ampicilline pour la sélection dans les bactéries.

2.1.3.3. Bactéries

2.1.3.3.1. pST32

pST32 est un vecteur d'expression bactérien. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline. L'expression du gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur à la polymérase T7. Au niveau de son site de clonage multiple, il possède une étiquette de 9 histidines suivie par un site de coupure par la protéase Tev, permettant, après expression et purification de la protéine d'intérêt, le clivage de l'étiquette histidine. Cette étiquette est placée au niveau 5' du gène d'intérêt afin d'étiqueter en N-terminal la protéine. Le plasmide possède aussi une étiquette de 8 histidines pouvant être positionnée en 3' du gène d'intérêt pour une étiquette C-terminale de la protéine. Ce vecteur a été utilisé pour la production de la protéine *TbMfnL* recombinante.

2.1.3.4. Cellules de mammifère

2.1.3.4.1. pQCXIB

pQCXIB est un plasmide d'expression constitutive dans les cellules de mammifère. Il contient également le gène de résistance à l'ampicilline, ainsi qu'un marqueur de résistance à la blasticidine. pQCXIB-mCherry contient en amont du multi-site de clonage une étiquette mCherry et pQCXIB-GFP contient en aval du multi-site de clonage une étiquette GFP. Ce plasmide a été utilisé pour l'expression hétérologue du gène de *TbMfnL* dans les cellules de mammifère.

Nom	Sequence 5'-3'	Approches
ET198 For ET199 Rev	TTCGTGTTGCCAACTACAAGGTGAAAAATTTCTGCGAGCTGGTGAACGGCAACCGC TGGGTAATGAGGTGAGGGTCAAAGTTCTGGTAGTGGTTCC CATGCTCGGCAACCTAAGCATGATAGTCCGCGGTAAGAGCAAAGAACCAGCGCCC CACGTAAATTTGCTTCCAACATTTCCAATTTGAGAGACCTGTGC	Etiquetage endogène
ET160 For ET161 Rev ET211 For ET242 Rev ET92 Rev ET93 For	CATAACGTTACCCACCACATCATCACTGAAGCGACTGTTGCGCAGAAGTCATGACCG AGTACAAGCCCACGGTG TG TAGTAGTCGAAAACACATGCGGTTAGTCGAACAGTTGGCACCCAACTTCAGGCA CCGGGCTTGCGGGTCATG ATTGACACTCCTATTCAATTTGAATGATCGGACATCAGTTGAGGGTCAGCTATGACCG AGTACAAGCCCACGGTG CACACCGTGAAGCAAACCAACGTGTCACGGCGAACAGATCATACCCCCTGTCAGGC ACCGGGCTTGCGGGTCATG GCGGCGAGGGTGCGTACGGCCCGG TCACCGTCACCGCCGACGTCGAGG	CRISPR/Cas9
ET189 For ET190 Rev ET191 For ET192 Rev	GATCAAGCTTCCACATCATCACTGAAGCGACTGT GATCCTCGAGGTTGGAGATACGCCGATCGCTGC GATCAAGCTTCTCGAGCCTCGGTTATGTGCTTCCACCAC GATCGGATCCCCACATCATCACTGAAGCGACTGT	RNAi
ET94 For ET95 Rev ET96 Rev ET102 For ET103 Rev ET104 Rev	GATCCATATGGGATCCAAGCTTATGAGGCAGTTAGGAAGTGCAG GATCGGTACCGCGCCGCTCTAGATTATTTGACCCTCACCTCATTACC GATCGGTACCTCTAGATTGACCCTCACCTCATTACCCAG GATCGCGGCCGCAAGCTTCATATGAGGCAGTTAGGAAGTGCAGTTTTAGCATGTGG GATCCAATTGGGTACCCTCGAGTCTAGATTTGACCCTCACCTCATTACCCAGCGTT GCCGTTT GATCCAATTGGGTACCCTCGAGTCTAGATTATTTGACCCTCACCTCATTACCCAGCG GTTGCCGTTT	TbMfnL
ET149 For ET150 Rev	GAACCACAGCGCGGGAGCGTCTACGATGATTAATC GATTAATCATCGTAGACGCTCCCGCGCTGTGGTTC	TbMfnLk141a
ET197 For	GATCGCGGCCGCAAGCTTCATATGGGTGCCAACTGCTCGACTAACC	TbMfnLΔMTS
ET292 For ET293 Rev	CCGGAAGATGAAGGTTAAGTCATTGGTTGACTTTG CAAAGTCAACCAATGACTTAACCTTCATCTTCCGG	TbMfnLΔTM
ET203 For ET204 Rev ET205 Rev ET206 Rev	CGCAAGTCATTGGTTGACTTTGAAAATGATGTGCTGACGAACATT GATCCTCGAGCCGGTATGTTGATACAATTTCA TTTCAAAGTCAACCAATGACTTGCGCCGGTATGTTGATACAATTTCA TTTCAAAGTCAACCAATGACTTGCGGTGTGGAATGTCCTTCATTTG	Production bactérienne
ET240 For ET258 Rev	GATCCTCGAGGTTGTTGCCACTTTGGCACCACCTGCGATTTTT GATCTCTAGATCACTTGCGCGTCTTCAAAGCGGCAAACACGGCGGC	TM
ET239 Rev	GATCCTCGAGTCTAGACAACACTGACTTCTGCGCAACAGTCG	MTS

Tableau 3 : Amorces

2.2. Méthodes

2.2.1. Biologie moléculaire

2.2.1.1. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Les PCR ont été effectuées à partir d'ADN génomique ou de plasmides recombinants afin d'amplifier des gènes ou des régions d'intérêt. 10 pg à 10 ng d'ADN génomique ou de plasmides recombinants sont mélangés avec 0.2 mM de dNTPs, 0.8 μ M d'amorce sens et 0.8 μ M d'amorce antisens (**Tab. 3**), 1 U/100 μ L de polymérase et le tampon de la polymérase correspondant. Selon les polymérases utilisées, l'ajout de magnésium MgCl₂ est nécessaire. La réaction en chaîne est réalisée dans un thermocycleur, la première étape de dénaturation est effectuée à 95°C pendant 2 minutes puis un cycle de 30 répétitions a lieu : 95°C 10 secondes (dénaturation), 50-60°C 30 secondes (hybridation), 72°C 1-2 minutes (élongation), une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 minutes termine l'amplification. Le produit PCR est conservé à 4°C.

2.2.1.2. Purification sur résine S300

Les produits PCR sont purifiés sur résine Séphacryl s-300 HR (Cytiva). Cette résine permet d'éliminer les amorces (inférieures à 30 nucléotides), le tampon et les dNTP. 700 μ L de la résine S300 HR, sont centrifugés sur une colonne (Micro spin, Biorad) pendant 1 minute à 845 g, le tube collecteur est changé puis 50 μ L de produit PCR sont déposés sur la colonne contenant la résine, qui est centrifugée 3 minutes à 845 g.

2.2.1.3. Clonage et transformation bactérienne

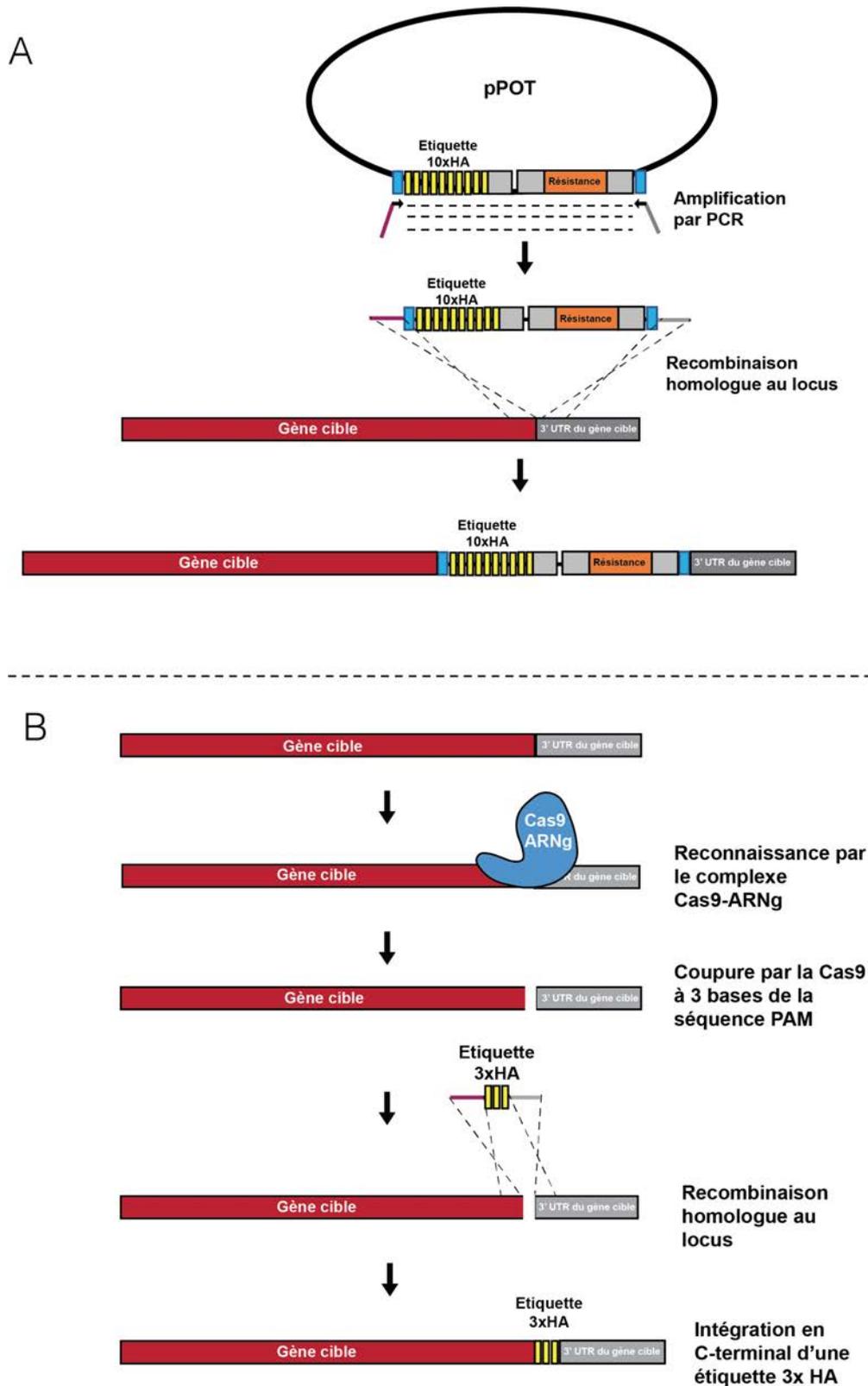
Les produits PCR sont purifiés sur gel grâce au kit NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup (Macherey-Nagel). Le clonage est réalisé par digestion respective du vecteur et de l'insert par des enzymes de restriction (2 FDU) (Anza, suivant les procédures du fabricant) puis par ligation des deux (50 ng du vecteur et 400 ng de l'insert). La ligation est effectuée par le kit Quick ligation (New England Biolabs M2200). La transformation bactérienne est effectuée dans la souche d'*E. coli* thermo-compétente XL1-Blue. 10 μ L du produit de ligation sont mélangés aux bactéries XL1-Blue (100 μ L). Après avoir placé la solution à 4°C pendant 30 minutes, un choc thermique est effectué 45 secondes à 42°C puis la solution est mise sur glace 2 minutes.

Le produit de transformation est incubé 1h à 37°C avec 500 μ L de milieu SOB (5 g/L extrait de levures, 20 g/L Tryptone, 585 mg/L NaCl, 186 mg/L KCl, 2 g/L MgCl₂ et 2.5 g/L MgSO₄). Après 3 minutes de centrifugation à 13000 g, les cellules sont étalées sur boîte LB contenant de l'ampicilline (Lysogeny Broth liquide, ampicilline 100 μ g/mL), puis incubées une nuit à 37°C. Les colonies sont récupérées de la boîte puis resuspendues dans 5 mL de LB liquide avec 100 μ g/mL d'ampicilline une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, les cultures sont centrifugées à 4300 g pendant 10 minutes et le culot est utilisé pour l'extraction plasmidique. L'extraction de plasmide est réalisée via le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Afin de permettre l'identification des plasmides ayant intégré le fragment d'intérêt, ils sont digérés par les enzymes de restriction (2 FDU) utilisées pour digérer les produits PCR et le vecteur (Anza suivant les procédures du fabricant). Enfin, les digestions sont analysées par migration sur gel 1% agarose en tampon TBE 0.5%. Les clones positifs sont séquencés.

2.2.1.4. Purification d'ADN génomique

La purification d'ADN génomique a été réalisée via deux techniques.

- La première est une extraction par Phénol/Chloroforme. Les cellules sont reprises dans 300 μ L de tampon de lyse (TELT : 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 62.5 mM EDTA, 2.5 M LiCl, 0,4% Triton X-100) et incubées 5 minutes à température ambiante. 300 μ L d'un mélange de Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (ratio 25:24:1) sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 5 minutes à température ambiante, puis centrifugé 5 minutes à 13000 g. La fraction aqueuse est ensuite précipitée par 600 μ L d'éthanol 100%, centrifugée pendant 10 minutes à 13000 g, le culot est lavé avec 500 μ L d'éthanol 100% puis à nouveau centrifugé 5 minutes à 13000 g. Le culot d'ADN est séché et repris dans 150 μ L de tampon Tris/EDTA (TE : 10 mM Tris/HCl et 0.1 mM EDTA pH 8) contenant de l'ARNase (0.13 μ g/mL), puis incubé 30 minutes à 37°C.
- La seconde méthode est l'utilisation du kit d'extraction d'ADN, NucleoSpin® Blood (Macherey-Nagel). 1 mL d'une culture cellulaire entre 5. 10⁶ et 2. 10⁷ cellules par mL est centrifugé puis repris dans 200 μ L de PBS. La suite du protocole est décrite dans la notice d'utilisation du NucleoSpin® Blood kit. L'ADN génomique extrait est conservé à 4 °C ou à -20 °C.



2.2.1.5. Séquençage

Un service de séquençage nous permet d'obtenir directement les séquences nucléotidiques de fragment d'intérêt, produits PCRs ou plasmides. En effet, nous avons vérifié tous les clones et plasmides afin de certifier l'intégration du fragment d'intérêt et de garantir l'absence de mutation dans les séquences. Le séquençage est effectué par Eurofins via le kit Mix2Seq, 15 µL de plasmide à 100 ng/µL et 2 µL d'amorce à 10 µM sont déposés dans un tube prévu à cet effet. Les séquences sont analysées par le logiciel Genious.

2.2.1.6. Précipitation à l'éthanol

Les plasmides ainsi que les cassettes de recombinaison sont précipités à l'éthanol afin d'être resuspendus dans un plus petit volume, pour les purifier et permettre la transfection des parasites. Pour ce faire, le plasmide ou la cassette est mélangé à trois fois son volume en éthanol 96 % et 10 % de son volume en acétate de sodium 3 M, pH5.2, pendant une nuit à -20 °C. Le produit est ensuite centrifugé à 4 °C à vitesse maximale pendant 30 minutes. Le tube est complètement vidé et repris dans 700 µL d'éthanol 70 % avant d'être centrifugé 10 minutes à vitesse maximale à 4 °C. Le tube est ensuite séché en condition stérile et l'ADN est finalement repris dans 5-10 µL d'H₂O.

2.2.1.7. Étiquetage endogène

Deux méthodes ont été utilisées pour l'étiquetage de gène de manière endogène. Ces techniques permettent l'ajout d'une étiquette en N-terminal ou en C-terminal de la protéine (**Fig. 31**).

- La première technique consiste en l'amplification par PCR d'une séquence d'ADN contenant l'étiquette souhaitée, un gène de résistance à un antibiotique, et une séquence homologue au gène d'intérêt de 80 pb en 5' et en 3'. L'amplification PCR est réalisée sur un plasmide particulier nommé pPOT, le produit PCR est ensuite purifié, précipité puis transfecté dans les parasites. La sélection des parasites ayant intégré le fragment d'ADN est effectuée par ajout de l'antibiotique adéquat, puis clonage par FACS, extraction d'ADNg, PCR et séquençage. Cette technique permet l'étiquetage endogène d'un seul des deux allèles (**Fig. 31 A**).

- La seconde technique est l'utilisation de la technique Crisp-Cas9. Des ARNg sont conçus de façon à cibler la partie N-terminale ou C-terminale du gène d'intérêt. La cassette de recombinaison contient 50 pb d'homologie avec la séquence endogène, l'étiquette souhaitée suivie de trois codons stop (dans le cas d'une étiquette en C-terminal) et 50 pb d'homologies. La sélection des parasites est effectuée par clonage par FACS, extraction d'ADNg, PCR et séquençage. Cette méthode permet d'obtenir l'étiquetage endogène d'un seul ou des deux allèles (**Fig. 31 B**).

2.2.1.8. Mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée a pour but d'introduire une mutation à un endroit précis d'une séquence d'ADN. Nous avons utilisé cette technique afin de surexprimer une version de la protéine d'intérêt avec une modification d'un acide-aminé dans une région-clé. La méthode choisie est celle de la mutagénèse dirigée par PCR. Les amorces sont conçues de façon à avoir la ou les modifications nucléotidiques au centre de celle-ci. La partie 3' de l'amorce doit être strictement identique à la séquence nucléotidique de référence afin d'avoir une bonne hybridation entre l'amorce et la séquence d'ADN. Deux PCRs distinctes sont effectuées ;

- Une PCR avec une amorce sens 5' du gène cible, nommée A, et l'amorce antisens 3' possédant la modification nucléotidique.
- Une PCR avec une amorce antisens 3' du gène cible, nommée B, et l'amorce sens 5' possédant la modification nucléotidique.

Les produits PCRs ainsi obtenus sont mélangés et une troisième PCR est effectuée avec les amorces 5' et 3' utilisées précédemment, A et B. A l'issue de la PCR, est obtenue une amplification de la séquence d'intérêt possédant la mutation souhaitée. Le produit PCR est ensuite cloné dans un vecteur pLew100 et celui-ci est introduit dans les parasites.

2.2.1.9. Dosage de l'ADN

Les dosages d'ADN sont effectués sur un spectrophotomètre (FluoStar Omega, BMG Labtech), avec une mesure de l'absorbance à 260 nm. Une absorbance de 1 équivaut à 50 µg/mL d'ADN double brin.

2.2.2. Biologie cellulaire

2.2.2.1. Courbe de croissance

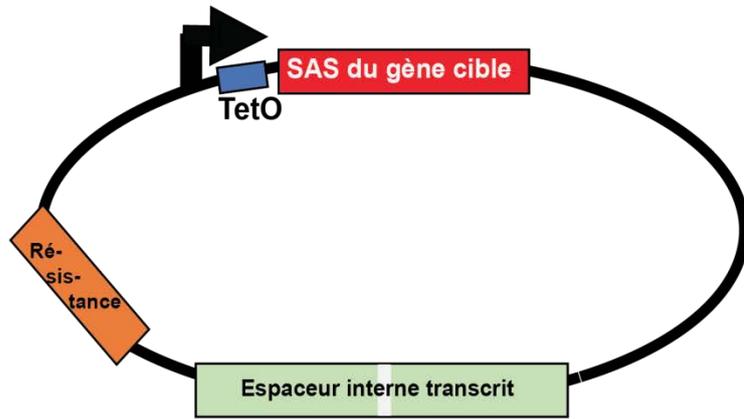
Afin de réaliser des courbes de croissance, les parasites sont mis en culture à 1.10^6 cellules par mL pour les formes procycliques et 1.10^5 cellules par mL pour les formes sanguines. La culture cellulaire est comptée chaque jour grâce à des compteurs de cellules, Guava® Muse® et Guava® *easyCyte*™. Après comptage, les cultures sont diluées à leur concentration initiale pour le jour suivant. Les courbes de croissance ont lieu sur 7 jours.

2.2.2.2. Transfection

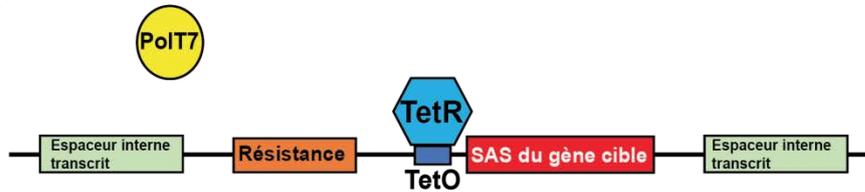
Les parasites, entre 1.10^6 cellules et 1.10^7 cellules, sont centrifugés à 500 g pendant 10 minutes, puis lavés en PBS, et enfin repris dans un mélange de 100 µL d'Amaxa™ Basic parasite Nucleofector™ Kit 2 (LonzaVMI.1021) et 1-10 µg de plasmide préalablement digéré par l'enzyme Not1 ou non digéré pour les leishamnies. L'électroporation est effectuée avec l'Amaxa Nucleofector™ device (Lonza) et le programme X-001 pour les trypanosomes ou U-033 pour les leishmanies. Après électroporation, les cellules sont immédiatement reprises dans 5 mL de milieu SDM79/IMDM sans antibiotique. Le lendemain, l'antibiotique de sélection est ajouté aux cellules en culture (**Tab. 2**).

2.2.2.3. Clonage des parasites

Le service de tri cellulaire associé à la fluorescence (FACS) de la plateforme TBMCORE nous a permis de cloner les parasites. 100 µL de milieu contenant les antibiotiques de sélection sont ajoutés par puits dans une plaque 96 puits. 1 mL d'une culture cellulaire (entre 5.10^6 - 1.10^7 cellules par mL) est lavé en PBS puis repris dans 1 mL de PBS contenant 10 % de sérum de veau foetal. La suspension cellulaire est triée et une cellule est déposée dans chaque puits. Les plaques 96 sont ensuite placées dans les incubateurs, 37°C pour les BSF pendant une semaine et 27°C pour les PCF pendant deux semaines. Par la suite, les cellules sont amplifiées en plaques 24 puits puis en flasques de 5 mL avant analyse et congélation.



- Tétracycline



+ Tétracycline

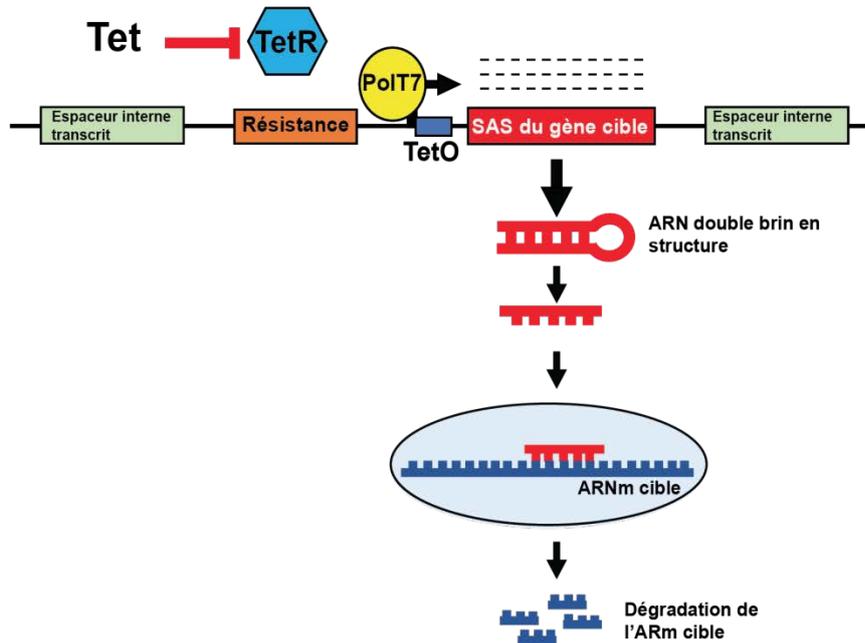


Figure 32 : Principe de l'ARN interférence chez *Trypanosoma brucei*

Une séquence sens-antisens du gène cible est clonée dans le vecteur pLew100. Le plasmide est intégré dans la région de l'espaceur interne transcrit du génome du parasite. Sans tétracycline, le répresseur Tet se fixe sur l'opérateur empêchant la fixation de la polymérase T7 (PoIT7), la séquence n'est pas transcrite. En présence de tétracycline, la séquence sens-antisens (SAS) est transcrite, l'ARN forme un double brin qui sera reconnu par le système permettant la dégradation ciblée de l'ARNm du gène correspondant.

2.2.2.4. Transduction virale

Les cellules de mammifère ont été transduites avec des particules rétrovirales selon le protocole décrit dans (El Fissi et al. 2018) par Manuel Rojo. Des particules virales ont été générées par la transfection de cellules de conditionnement rétroviral Plat-E (Cell Biolabs, Inc.) avec les plasmides rétroviraux codant pour *TbMfnL* fusionnée à la GFP ou à la mCherry (pQCXIB-*TbMfnL*::GFP / pQCXIB-mCherry::*TbMfnL*). Les MEF ont été transduits avec des surnageants viraux dilués dans un milieu de culture complet et complétés par 8 µg/ml de polybrène. Les cellules transduites ont été sélectionnées avec 20 µg/ml de blasticidine.

2.2.2.5. ARN interférence

La technique de l'ARN interférence a été utilisée afin de réduire de manière inducible (ajout de tétracycline), le niveau de l'ARNm ciblé et ainsi de réduire la quantité de la protéine ciblée dans la cellule (**Fig. 32**). Le principe repose sur la production d'une structure tige-boucle reconnue par le système d'ARN interférence qui permettra la dégradation de l'ARNm. Pour ce faire un fragment d'ADN contenant 400 pb de la séquence sens d'intérêt, 50 pb servant de lien et 400 pb correspondant à la même séquence en antisens est amplifié par PCR, cloné dans le vecteur pLew100 puis il est transfecté dans les parasites (**Fig. 32**). Les parasites sont sélectionnés par résistance à la phléomycine. L'induction est réalisée par ajout de 1 µg/mL de tétracycline dans le milieu de culture, chaque jour pendant 5 à 7 jours.

2.2.2.6. Technique Crispr-Cas9 pour inactivation de gènes

L'inactivation de gènes d'intérêt a été effectuée grâce à la technique de Crispr-Cas9. La conception des ARN guides (ARNg) est réalisée sur EuPaGDT, provenant de la base de données des trypanosomes TriTryp <http://tritrypdb.org>. Les critères pour les ARNg sont une longueur de 20 nucléotides, une séquence PAM NGG sur la partie 3' de la séquence. Les ARNg sélectionnés, ont été choisis sur des critères de « on-target » avec une analyse d'homologie de 50 nucléotides, une identité et une couverture de 0.7 et des critères de « off-target » maximum de 3 mésappariements.

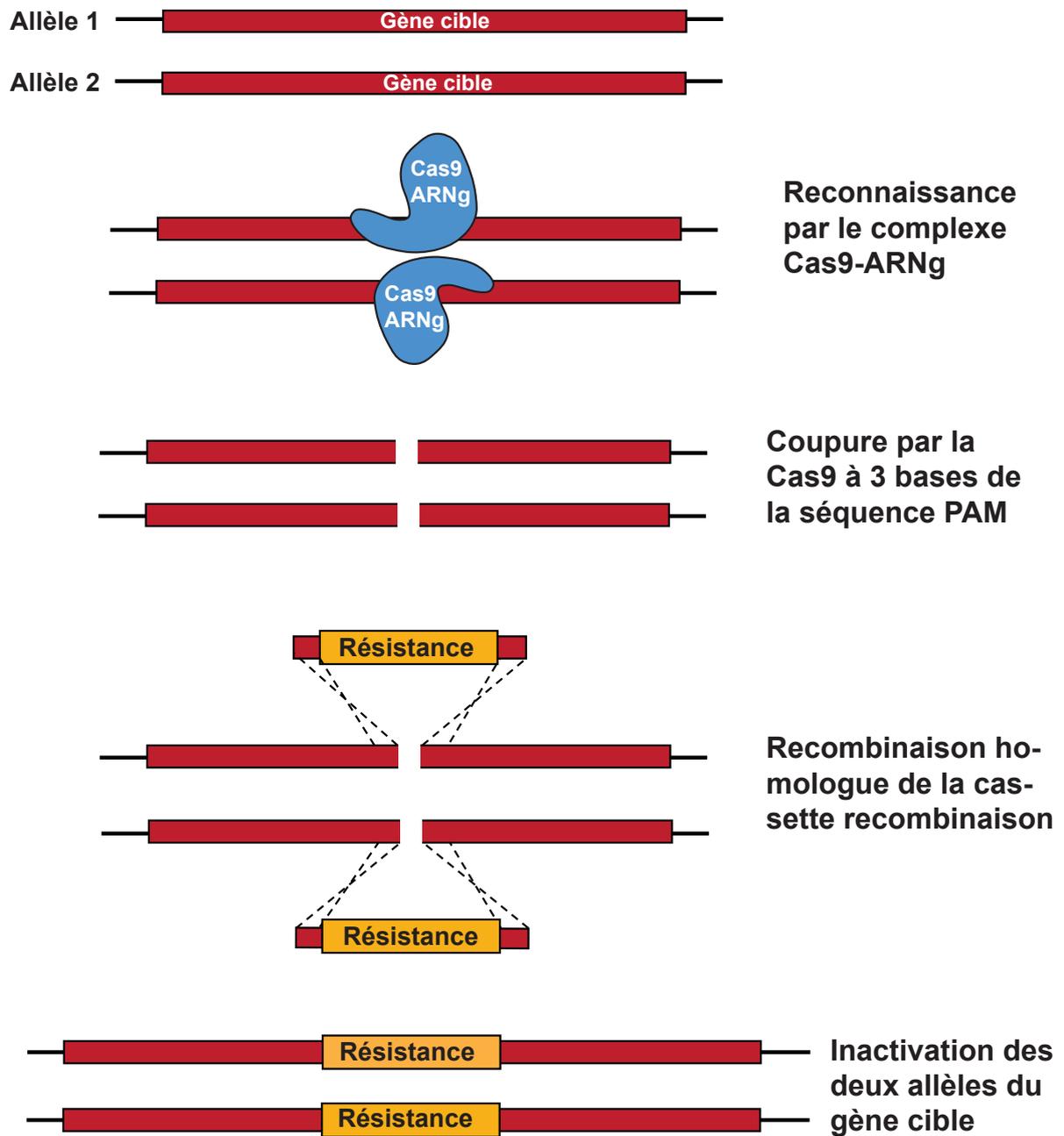


Figure 33 : Inactivation des gènes par la technique Crispr-Cas9

Une cassette de recombinaison contenant un marqueur de sélection, gène de résistance à la puromycine (PAC), est amplifiée en utilisant des longs oligos possédant 50 pb d'homologies avec la séquence 5' et 3' du gène d'intérêt en partant du site de coupure de la Cas9 défini par l'ARNg (**Fig. 33**). La souche EATRO1125.T7T PCF, la souche 427 90.13 BSF et *L. mexicana* sont transfectées, en utilisant l'Amaza NucléofectorII, avec 5-10 µg de cassette préalablement purifiée, 50 µg de la protéine Cas9 ainsi que 0.4 µmol de TracrRNA et 0.4 µmol de gRNA, ces deux derniers étant préchauffés ensemble 5 minutes à 95°C. Les 1.10⁶ cellules sont transfectées en utilisant le programme X-001 (U-033 pour les leishmanies), puis sélectionnées en milieu SDM79 pour les PCF et les leishmanies contenant 1 µg/mL de puromycine et 100 µg/mL de puromycine respectivement et en milieu IMDM pour les BSF contenant 0.1 µg/mL de puromycine. Les cellules sont ensuite clonées par FACS (TBM Core), puis la sélection des KI pour les deux allèles est réalisée par extraction d'ADN, amplification par PCR et séquençage.

2.2.2.7. Expression inductible protéine ectopique

L'expression inductible de protéine ectopique dans les trypanosomes est permise par l'introduction dans le génome des trypanosomes d'un vecteur pLew13 codant pour la polymérase T7, d'un vecteur pLew90 codant pour le répresseur à la tétracycline et d'un vecteur pLew100 ou pHD1336 possédant un promoteur à la polymérase T7 suivi de la séquence opérateur à la tétracycline (TetO) puis par le gène cible. En culture, l'induction de l'expression de la protéine ectopique est permise par l'ajout dans le milieu de culture de tétracycline à 1 µg/mL pour les formes procycliques et 10 µg/mL pour les formes sanguines.

2.2.3. Biochimie

2.2.3.1. Extraits totaux

Les parasites sont comptés à l'aide de compteurs de cellules (GUAVA/MUSE), puis 5.10⁶ cellules sont centrifugées 10 minutes à 500 g, lavées en PBS et reprises dans 10 µL de SDS 2% contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases (Calbiochem). Les échantillons peuvent être utilisés directement ou congelés à -20 °C.

Nom	Espèce	Dilution	Source/ref
Anticorps primaires			
Anti-Ty1	Souris	WB 1:800	iMET
		IF 1:500	
		UExM 1:250	
Anti-HA	Souris	WB 1:1000	Biolegend
		IF 1:1000	
		UExM 1:500	
Anti-Tdh	Lapin	WB 1:500	iMET
		IF 1:200	
		UExM 1:100	
Anti-Enolase	Lapin	WB 1:100000	P. Michels, Edimbourg, UK
Anti-ATP synthase sous-unité β	Lapin	WB 1:2000	A. Zikova, République tchèque
Anti-Frdg	Lapin	WB 1:50	iMET
Anti-Hsp60	Souris	IF 1:500	iMET
Anti-TAO	Souris	WB 1:100	M. Chaudhuri, USA
Anti-Cytochrome C1	Lapin	WB 1:500	S.L. Hadjuk, USA
Anti-Citrate synthase	Lapin	WB 1:2000	M. Boshart, Munich, Allemagne
Anti-ASCT	Lapin	WB 1:500	iMET
Anti-IDHm	Lapin	WB 1:500	M. Boshart, Munich, Allemagne
Anti SCoAS	Lapin	WB 1:1000	A. Zikova, République tchèque
Anti-FBPase	Lapin	WB 1:250	P. Michels, Edimbourg, UK
Anti Pex5	Lapin	WB 1:1000	P. Michels, Edimbourg, UK
Anti-Hexokinase	Lapin	WB 1:5000	P. Michels, Edimbourg, UK
Anti-Aldolase	Lapin	WB 1:10000	P. Michels, Edimbourg, UK
Anti-G6PDH	Lapin	WB 1:1000	P. Michels, Edimbourg, UK
Anti-PFR	Souris	WB 1:10000	K. Gull, Manchester, UK
Anti-GFP	Lapin	WB 1:1000	Abcam
Anti-ATOM40	Lapin	WB 1:10000	A. Schneider, Berne, Suisse
		IF 1:1000	
		UExM 1:500	
Anticorps secondaires			
Anti-Souris HRP	Chèvre	WB 1:5000	Bio-Rad
Anti-Lapin HRP	Chèvre	WB 1:10000	Bio-Rad
Anti-Souris Alexa Fluor 594	Âne	IF 1:400	ThermoFisher
		UExM 1:250	
Anti-Souris Alexa Fluor 488	Âne	IF 1:400	ThermoFisher
		UExM 1:250	
Anti-Lapin Alexa Fluor 594	Chèvre	IF 1:400	ThermoFisher
		UExM 1:250	
Anti-Lapin Alexa Fluor 488	Âne	IF 1:400	ThermoFisher
		UExM 1:250	

Tableau 4 : Anticorps primaires et secondaires

2.2.3.2. Western Blot

Afin de réaliser un Western blot, les extraits totaux sont mélangés à du Laemmli contenant du β -mercaptoéthanol (14,3 M) puis ils sont chauffés à 100 °C pendant 10 minutes. La migration des protéines s'effectue sur un gel de gradient 4-20% polyacrylamide (Mini-Protean® TGX Stain-Free™, Bio-Rad). L'équivalent de $5 \cdot 10^6$ cellules est déposé par piste. L'électrophorèse s'effectue à 200 V pendant 1h dans une solution tampon Tris-glycine SDS 1X (TG-SDS EuromedexEU0510). Le gel est ensuite transféré sur une membrane polyvinylidene difluoride (PVDF) pendant 10 minutes à 25 V et 1.3 Amp (Trans-blot® Turbo™ Bio-Rad). La membrane est ensuite saturée avec 15 mL de tampon phosphate tween (PSBT : 0.005% Tween 20) contenant 5% de lait (Regilait®) pendant 45 minutes à 1 heure sous agitation. La détection des protéines est réalisée par l'incubation de la membrane avec 10 mL de PBST 5% lait contenant un anticorps primaire (**Tab. 4**) pendant une nuit à 4°C, suivi de 5 lavages en PBST. Puis la membrane est incubée avec un anticorps secondaire (**Tab. 4**) couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) (15 mL PBST 5% lait) pendant 1 heure, suivi de nouveau par 5 lavages en PBST. La révélation est réalisée par chemiluminescence avec une solution de peroxyde et une solution luminol/enhanceur (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad) avec un ration 1:1 et imagée au ImageQuant™LAS 4000. Laemmli : SDS 20%, Tris-HCl pH 6.8 1M, Glycérol 100 %, H₂O et quelques mg de bleu de bromophénol.

2.2.3.3. Perméabilisation à la digitonine

Les trypanosomes (sachant que 1 mg de protéines équivaut à $3 \cdot 10^8$ cellules procycliques) ont été lavés deux fois en PBS puis quantifiés. La quantification protéique est réalisée avec la méthode PierceBCA (ThermoScientific). Les cellules sont resuspendues à 10 mg de protéines par mL dans du tampon STE contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Des aliquots de 100 μ L sont incubés avec des quantités croissantes en digitonine pendant 4 minutes à 25°C, avant d'être centrifugés 2 minutes à 14000 g. Les fractions solubles sont ensuite analysées par western blot. STE : 250 mM sucrose, 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, supplémenté de 150 mM NaCl et 1mM DTT.

2.2.3.4. Gel natif (BN-PAGE)

Les échantillons analysés en gel natif (Schägger, Cramer, et von Jagow 1994) correspondent aux surnageants obtenus après perméabilisation à la digitonine.

Les échantillons sont déposés sur des gels de Bis-Tris polyacrylamide (3-12%) (Invitrogen) en présence d'un tampon ayant une faible concentration en bleu de bromophénol (light blue, Invitrogen). La migration est effectuée à 150 V constant et entre 16 et 2 mA pendant 3 heures à température ambiante. Après l'électrophorèse, les gels sont transférés sur membrane PVDF grâce au TransBlot Turbo Midi size (Biorad), puis colorés au rouge ponceau. Après lavage, l'immunodétection est réalisée comme décrite dans la section Western blot.

2.2.3.5. Activité des voies métaboliques

Afin d'analyser les métabolismes énergétiques des différences souches de parasites que nous possédons, nous avons choisi une approche large pour cribler différentes sources de carbone et d'azote. Pour ce faire, nous avons utilisé le système Phenotype MicroArrays™ Panels PM-M1 et PM-M2 (Biolog). Les métabolismes cellulaires qui sont stimulés par l'une des molécules présentes dans l'un des puits, vont générer des équivalents réducteurs qui sont alors révélés par le système Biolog Redox. Nous avons utilisé les plaques de sources énergétiques et de carbones PM-M1 Microplate™ et de métabolisme de l'azote PM-M2 Microplate™. Le système Biolog Redox utilise un colorant tétrazolium qui peut être réduit en formazan de couleur violette qui est analysé au spectrophotomètre à 590 nm.

En amont de l'expérience, une culture cellulaire est préparée pour atteindre $1 \cdot 10^7$ cellules par mL. La culture est lavée en PBS deux fois puis les cellules sont reprises dans un milieu approprié nommé IF-M1 pour PM-M1 (Biolog) et IF-M2 pour PM-M2 (Biolog), à raison de $1 \cdot 10^7$ cellules par mL. 50 μ L de la suspension cellulaire sont déposés dans chaque puits de la plaque 96. La plaque est ensuite incubée pendant une heure à 27°C, 5 % CO₂. Il y a donc $5 \cdot 10^5$ cellules par puits. Par la suite, 10 μ L de mix colorant redox, nommé mix MB, sont ajoutés à chaque puits et la plaque est incubée 24 heures à 27 °C. L'absorbance peut être suivie au cours du temps ce qui permet de suivre la cinétique de l'utilisation de la molécule, et en point final au bout de 24 heures. L'absorbance en point final est mesurée avec un spectrophotomètre (FluoStar Omega, BMG Labtech).

2.2.3.6. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Préalablement à l'analyse RMN, les cellules ($2 \cdot 10^7$) sont centrifugées pendant 10 minutes à 580 g, lavées dans 10 mL de PBS-NaHCO₃ (5 g/L) et finalement reprises dans 1 mL de PBS-NaHCO₃ (5 g/L). 0.5 mL de PBS-NaHCO₃ (5 g/L) contenant la source de carbone d'intérêt ([U-¹³C] Thréonine, [U-¹³C] Proline ou [U-¹³C] Glucose 1 mM) sont ajoutés au 1 mL de PBS-NaHCO₃ contenant les cellules pendant 6 heures à 27°C. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 10 minutes à 1500 g et 1 mL de surnageant est conservé à -20°C pour les analyses de RMN du proton. Seul le surnageant des cultures est analysé par RMN du proton, l'analyse nous permet de déterminer les métabolites excrétés par le parasite. Les analyses RMN et les quantifications ont été réalisées par Marc Biran au Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques de Bordeaux.

2.2.3.7. Production protéine recombinante

Les bactéries BL21 Star sont transformées avec les plasmides pST32 et étalées sur boîtes LB contenant de l'ampicilline. Les colonies sont reprises dans une pré-culture de 10 mL de LB avec de l'ampicilline à 37°C sous agitation pendant une nuit. Les bactéries sont par la suite amplifiées dans 100 mL de LB avec 2 mL de précultures. Puis elles sont cultivées jusqu'à obtenir une densité optique entre 0.6 et 0.8. L'induction de la culture est effectuée par ajout de isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) à une concentration finale à 0.5 mM pendant 2h à 30°C ou 37°C sous agitation ou sur la nuit à 18°C sous agitation. La culture est ensuite centrifugée pendant 10 minutes à 4000 g et les culots sont lysés avec 750 μL d'un tampon de lyse (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4 et 4 mM MgCl₂), puis ils sont soniqués (3 cycles de 20 secondes intercalés de 20 secondes) et centrifugés 30 minutes à 14000 g. Les surnageants sont séparés des culots et les culots sont repris dans 200 μL de tampon de lyse. Les échantillons sont analysés par SDS-PAGE.

2.2.3.8. BioID

La technique du Proximity-dependant Biotin Identification (BioID) a été employée afin de déterminer si notre protéine d'intérêt *TbMfn* possède des partenaires. Préalablement, l'étiquette BirA est ajoutée en C-terminal de la protéine dans le vecteur pLew100 puis le plasmide est transfecté dans les parasites. Les cellules sont mises dans du milieu Creeks et induites à la tétracycline pendant 48h puis 50 μM de biotine sont ajoutés pendant 12h.

Les cellules sont lavées en PBS trois fois (centrifugation de 10 minutes à 580g) avant d'être lysées dans du tampon de lyse (50 mM Tris, pH7.4, 500 mM NaCl, 0.4% SDS, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, inhibiteurs de protéases) puis soniquées (Bioruptor, 2 cycles de 30/30sec, fort). Les cellules sont reprises dans du Triton X-100 2%, à nouveau soniquées et reprises dans 500 μ L de Tris 50 mM (pH7.4) puis soniquées une dernière fois. Les cellules sont centrifugées à 16 000 g pendant 15 min à 4°C, le surnageant est conservé pour la suite. Les 60 μ L de billes aimantées couplées à de la streptavidine (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen) sont lavées 2 fois avec le tampon de lyse avant d'être incubées avec le surnageant pendant 4 heures à 4°C. Les billes sont séparées de la fraction non liée avec un aimant (DynaMag-Spin, Invitrogen), puis elles sont resuspendues dans 500 μ L de PBS, cette opération de lavage est réalisée 7 fois. A la fin, les billes sont reprises dans 50 μ L Laemmli avec du β -mercaptoéthanol, elles sont chauffées à 100°C pendant 4 minutes et congelées à -20°C. Les échantillons ont été envoyés et traités par la plateforme CGFB protéome de Bordeaux. L'instrument de spectrométrie de masse utilisé est l'Orbitrap Fusion Lumos, pendant 76 minutes. Les spectres obtenus sont analysés par le logiciel Proteome Discoverer 2.5 avec les algorithmes suivants : Mascot, Sequest HT et MS Amanda.

2.2.4. Méthodes d'imagerie

2.2.4.1. Immunofluorescence

2.2.4.1.1. Parasites

Les cellules ($5 \cdot 10^7$) sont lavées deux fois en PBS (centrifugation de 5 minutes à 580 g) puis elles sont fixées dans 100 μ L de PBS et 300 μ L de paraformaldehyde (PFA) 2 % pendant 10 minutes. La neutralisation du PFA est réalisée par ajout de 40 μ L de Glycine 1 M. Les cellules sont lavées deux fois dans 500 μ L de PBS puis 20 μ L sont déposés sur des lames superfrost préalablement recouvertes avec 200 μ L de Poly-L-lysine pure (Sigma P8920) afin d'améliorer l'adhésion cellulaire. Après sédimentation des cellules sur la lame environ 10 minutes, les cellules sont perméabilisées par ajout de 30 μ L de Triton X-100 0.05% pendant 3 minutes. Trois lavages successifs sont réalisés de 30 μ L à 50 μ L de PBS puis un blocage des sites aspécifiques est effectué avec 30 μ L de PBS-BSA 4% pendant 20 minutes. Pour la révélation, 30 μ L d'anticorps primaire (**Tab. 4**) sont incubés par puits sur la lame pendant 45 minutes, puis après 4 lavages au PBS, 30 μ L d'anticorps secondaire (**Tab. 4**) sont incubés 45 minutes à l'abri de la lumière suivi de 3 lavages au PBS.

```

run("Duplicate...", "title=ORI duplicate channels=2");
run("Duplicate...", "title=Estfond");
run("Gaussian Blur...", "sigma=10");
imageCalculator("Divide create 32-bit", "ORI", "Estfond");
selectWindow("Result of ORI");
rename("OriCorr");
selectWindow("Estfond");
setAutoThreshold("Li dark");
run("Create Selection");
selectWindow("OriCorr");
run("Restore Selection");
run("Enlarge...", "enlarge=10 pixel");
setAutoThreshold("Li dark");
run("Analyze Particles...", "size=15-500 show=Masks");
rename("Mask");
run("Options...", "iterations=1 count=4 pad do=Open");
run("Duplicate...", "title=Skeleton");
setOption("BlackBackground", false);
run("Skeletonize");
run("Duplicate...", "title=Ends");
run("Options...", "iterations=1 count=7 pad do=Erode");
imageCalculator("Subtract create", "Skeleton", "Ends");
selectWindow("Result of Skeleton");
rename("Endpoints");
selectWindow("Skeleton");
run("Duplicate...", "title=Jonctions");
run("Options...", "iterations=1 count=6 pad do=Erode");
run("Analyze Particles...", "size=0-5000 summarize");
imageCalculator("Add create", "Endpoints", "Jonctions");
selectWindow("Result of Endpoints");
rename("Combo");
imageCalculator("Subtract create", "Skeleton", "Combo");
selectWindow("Result of Skeleton");
rename("Segments");
selectWindow("Combo");
close();
selectWindow("ORI");
setOption("ScaleConversions", true);
run("8-bit");
run("Merge Channels...", "c1=Jonctions c2=Endpoints c3=Segments c4=ORI create ignore");
close("\\Others");

```

Figure 34 : Script de la macro développée sur Fiji pour la quantification des jonctions mitochondriales

Un marquage de l'ADN est effectué avec 30 μL de DAPI à 10mg/ml (4',6-diamidino-2-phenylindole, SigmaD9542) (longueur d'émission 455 nm), suivi de 3 lavages au PBS. Finalement, 5 μL de Gold antifade (Invitrogen S36936) sont ajoutés par puits sur la lame, afin d'éviter le photo-blanchiment, et une lamelle est déposée et scellée par du vernis. Les images sont acquises sur le microscope Axioplan 2 ou Imager Z1 (Zeiss) avec le logiciel MetaMorph, puis elles sont analysées sur Fiji (Albiseti et al. 2017).

2.2.4.1.2. Cellules de mammifère

Le protocole a été adapté de (Daste et al. 2018). Les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde à 3,7 % dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec 0,1 % de Triton X- 100 pendant 5 minutes, et incubées avec l'anticorps primaire dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, l'anticorps secondaire a été ajouté pendant 30 minutes à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été lavées avec du PBS pour être montées sur des lames de verre à l'aide de MOWIOL et les cellules ont été imagées avec un microscope Olympus IX81 et un objectif 100X. Les expériences ont été réalisées par Manuel Rojo.

2.2.4.2. Marquage à la Rhodamine123

Afin de réaliser un marquage à la Rhodamide123, 500 μL d'une culture cellulaire (5×10^6 - 2×10^7 cellules par mL) sont incubés avec 4 μL de Rhodamine123 (2 mg/ mL) pendant 15 minutes à température ambiante, puis lavés deux fois en PBS avant d'être déposés sur des lames de microscopie. Les lames sont scellées par dépôt d'une lamelle et de vernis puis elles sont immédiatement analysées au microscope. Les images sont acquises sur le microscope Axioplan 2 avec le logiciel MetaMorph, puis elles sont analysées sur Fiji.

2.2.4.3. Quantification des jonctions mitochondriales

Pour quantifier le nombre de jonctions mitochondriales, une macro a été développée sur FIJI par Bordeaux Imaging Center (BIC) (**Fig. 34**). Cette macro permet dans un premier temps de dupliquer le canal d'intérêt, ici le canal rouge, puis un seuillage est effectué afin de limiter à la zone de fluorescence d'intérêt. Un masque de cette fluorescence est créé et la fonction « Skeletonize » est utilisée permettant d'obtenir le squelette de la fluorescence.

Puis la macro établit les segments, les jonctions et les points terminaux de ce squelette grâce à des fonctions d'érosion.

2.2.4.4. Microscopie d'expansion sur ultrastructure (UExM)

Les cellules sont lavées et reprises en PBS puis 500 μ L, contenant environ 4.10^6 cellules, sont déposés pour adhérer pendant 10 minutes sur des lamelles rondes de 12-mm, recouvertes préalablement de Poly-L-lysine (Sigma). L'excès de cellules est retiré et 1 mL d'une solution d'activation contenant 0.7 % de formaldéhyde et 1 % d'acrylamide en PBS est déposé sur la lamelle à 4°C une nuit avec faible agitation. La lamelle contenant les cellules est disposée sur 35 μ L d'une solution composée d'une solution de monomère (MS) (23 % Acrylate de sodium ; 10 % Acrylamide ; 0.1 % Bis-acrylamide en PBS), TEMED 0.5 % et persulfate d'ammonium (APS) 0.5 % final, pendant 5 minutes sur glace. Par la suite, la polymérisation a lieu pendant 60 minutes à 37 °C, puis la lamelle est transférée dans une plaque 6 puits contenant 1 mL de solution de dénaturation (200 mM SDS ; 200 mM NaCl et 50 mM Tris HCl pH 9.0) pendant 15 minutes sous agitation à température ambiante afin de détacher le gel de la lamelle. Une fois le gel détaché de la lamelle, celui-ci est transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL contenant la solution de dénaturation pour 90 minutes à 95°C dans un bain sec. Le gel est transféré dans une boîte de Pétri avec 40 mL d'eau déionisée, ceci permettant la première expansion. Après 30 minutes, l'eau distillée est changée. Cette étape est répétée deux fois supplémentaires puis l'eau est remplacée par 40 mL de PBS pour 10 minutes. Le lavage avec le PBS est répété deux fois. A l'issue, des lavages le gel est découpé de façon circulaire sur un diamètre d'environ 8 mm puis est transféré dans une plaque 24 puits avec une solution de blocage (BSA 2 %, Tween20 0.2 % en PBS) pendant 30 minutes. L'anticorps primaire (**Tab. 4**) dilué dans la solution de blocage est incubé pendant 3 heures à 37°C avec une faible agitation. Après trois lavages avec la solution de blocage, le gel est incubé avec l'anticorps secondaire (**Tab. 4**) pendant 3 heures à 37°C avec une faible agitation, à l'abri de la lumière. Après trois lavages en PBS, le gel subit une seconde expansion, dans une plaque de 6 puits avec 5 mL d'eau déionisée pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. L'eau est remplacée à nouveau deux fois afin que celui-ci atteigne sa taille finale. Le gel est ensuite positionné sur une lamelle puis il est monté sur une lame superfrost (ThermoScientific), pour être observé sur microscope.

Les images ont été observées et acquises sur un microscope confocal Leica SP5-MP (BIC) ou sur un microscope droit Zeiss Imager Z1 utilisant un objectif 63X à immersion. Les images sont analysées sur le logiciel Fiji.

2.2.4.5. Immuno-microscopie électronique

1.10⁹ parasites sont centrifugés 20 minutes à 500 g avant d'être lavés dans 10 mL de PBS puis ils sont repris dans 1 mL de PBS. Les cellules ont été placées sur la surface de grilles de cuivre recouvertes de formvar (400 mesh). Chaque boucle a été rapidement immergée dans du propane liquide (-180°C) et transférée dans une solution pré-refroidie d'acétate d'uranyle à 0,1% dans de l'acétone sèche pendant 3 jours à -82°C. Les échantillons ont été rincés à l'acétone à -20°C, et incorporés progressivement à -20°C dans la résine LR Gold (EMS, USA). La polymérisation de la résine a été effectuée à -20°C pendant 7 jours sous illumination UV. Les sections ultrafines LR Gold ont été recueillies sur des grilles de nickel recouvertes de formvar. Les sections ont d'abord été incubées pendant 15 min avec du NH₄Cl 500 mM dans du tampon tris salin (TBS) pH7.8, puis bloquées 2x10 min avec 2% de BSA dans du TBS pH 7.8. Les grilles ont été incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps anti-Ty1 dilué au 1:200 dans du TBS contenant 2% de BSA, puis rincées avec du TBS contenant 2% de BSA et avec du TBS contenant 1% de BSA. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 1 heure à température ambiante avec des IgG anti-souris diluées au 1:20 conjuguées à des particules d'or de 10 nm (BioCell). Les sections ont été rincées avec du TBS contenant 1% de BSA, et fixées avec 1% de glutaraldéhyde dans du TBS. Après rinçage avec du TBS, les grilles ont été contrastées par une incubation de 5 min avec de l'acétate d'uranyle à 2% dans l'eau, suivie d'une incubation de 1 min avec du citrate de plomb à 1%. Les observations ont été réalisées sur un microscope électronique HITACHI 7650 fonctionnant à 80 KV avec une caméra Gatan-11 MPx (Centre d'imagerie du PIE de Bordeaux). Les expériences ont été réalisées par Bénédicte Salin et Corinne Blancard à l'IBGC. Les quantifications des particules d'or ont été réalisées sur ImageJ.

2.2.4.6. Serial block face

1.10⁹ parasites sont centrifugés 20 minutes à 500 g avant d'être lavés dans 10 mL de PBS puis ils sont repris dans 1 mL de PBS.

Les cellules ont été préparées comme décrit par (Blancard et Salin 2017), à l'exception du milieu de congélation : 0,1% de permanganate de potassium pendant 24 heures suivi de 0,1% d'acide tannique pendant 24 heures, et 2% de tétroxyde d'osmium avec 1% d'acétate d'uranyle pendant 3 jours. Les échantillons enrobés de résine ont été coupés, montés et placés dans un Zeiss GeminiSEM300 équipé d'un système Gatan 3view (Gatan, Abingdon, UK). Des images en série de la face du bloc ont été enregistrées à une tension d'accélération de 1,2 kV. Toutes les images ont été prises avec les paramètres de balayage suivants : taille du pixel 10 nm, temps du pixel 5 μ s, épaisseur de la tranche 50 nm (tranche Z), taille de l'image 5000x5000. Entre 700 et 900 images ont été collectées pour chaque cycle. Les images ont été enregistrées avec Digital Micrograph (Gatan). Les images ont été combinées pour former une seule pile.

Traitement des données et analyse statistique : la segmentation a été réalisée à l'aide de l'AMIRA (version 5.2.0 Thermofisher Scientific). La segmentation manuelle des cellules et des organelles a été réalisée à l'aide de l'outil pinceau et s'est basée sur les caractéristiques d'ultrastructurales propres à chaque organelle. Chaque organelle a été segmentée en utilisant la membrane de l'organelle comme bord extérieur. Des modèles de surface ont été produits pour chaque organelle segmentée. Les volumes des organelles ont été générés automatiquement à partir des rendus de surface des données segmentées.

Les expériences ont été réalisées par Bénédicte Salin et Corinne Blancard, les acquisitions ont été effectuées par Etienne Gontier et les quantifications ont été réalisées par Bénédicte Salin.

2.2.5. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel Prism (GraphPad). Les résultats sont présentés par leur moyenne avec plus ou moins leur écart-type (SD). Les résultats ont été sujets à un test statistique correspondant au t-test de student, pour déterminer les différences statistiques entre les groupes comparés (* $p < 0.033$; ** $p < 0.002$; *** $p < 0.001$).

3. Résultats

3.1. Étude et caractérisation de *TbMfnL*

3.1.1. “An unusual mitofusin is involved in mitochondrial fusion in *Trypanosoma brucei*”

3.1.1.1. Résumé de l'article

Trypanosoma brucei est un parasite unicellulaire possédant une mitochondrie unique qui subit des modifications de structure considérables. Ces modifications suggèrent l'existence d'une machinerie mitochondriale de fusion et de fission. Quelques preuves, souvent indirectes, de l'existence de la dynamique mitochondriale ont cependant été publiées. En ce qui concerne la fission, les trypanosomes africains possèdent une protéine dynamine-like (*TbDLP*) qui semble participer à la division mitochondriale et vraisemblablement uniquement lors de la cytokinèse. Il n'y a pas à ce jour de protéine de fusion identifiée et caractérisée chez *T. brucei*.

Dans cette étude, nous avons caractérisé la première mitofusine impliquée dans la dynamique mitochondriale chez *T. brucei*, *TbMfnL*. Nous avons montré que *TbMfnL* est une protéine localisée dans la mitochondrie et plus précisément dans les membranes mitochondriales chez les deux formes du parasite. La surexpression de la protéine a montré, exclusivement dans la forme procyclique, une hyperfusion de la mitochondrie avec une forte augmentation des branchements, permettant de confirmer l'implication de *TbMfnL* dans la structuration de la mitochondrie. Nous avons également montré que le domaine GTPase de la protéine est fonctionnel et nécessaire à son activité, confirmant que *TbMfnL* est bien une protéine appartenant à la super famille des dynamines. L'inactivation de l'expression de la protéine n'induit pas de modification de la structure mitochondriale ce qui renforce l'idée que chez ce parasite, les processus de fission mitochondriale sont peu ou pas actifs. Enfin, aucune modification de la structure dans les formes sanguines n'a été mise en évidence dans cette étude lors de la surexpression ou l'inactivation de *TbMfnL*, ce qui reflète une faible dynamique mitochondriale aussi bien en termes de structuration que d'activité.

Une étude des domaines de la protéine a montré l'importance de deux types de domaines pour la localisation de la protéine : les domaines transmembranaires en C-terminal de la protéine ainsi que la séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS) en N-terminal. *TbMfnL* se distingue des mitofusines *Mfn* et *Opa1* par ce double adressage à la mitochondrie, suggérant un rôle dans les deux membranes mitochondriales.

Enfin, après une analyse de l'utilisation/consommation de 119 molécules différentes nous avons trouvé que trois d'entre elles, le glucose, la proline et l'éthanolamine, sont d'avantage utilisées/consommées dans les cellules surexprimant *TbMfnL*. Cette analyse suggère, d'une part une demande énergétique plus importante et d'autre part une probable biogenèse lipidique et plus particulièrement des membranes en lien avec les modifications de structure mitochondriale observées. Cette biogenèse lipidique n'étant pas restreinte à la mitochondrie mais de manière plus générale à l'ensemble des membranes de la cellule.

En conclusion, nous avons montré, pour la première fois, que *TbMfnL* est une protéine impliquée dans la dynamique mitochondriale du parasite *T. brucei*, et que cette protéine possède des particularités qui suggèrent la présence d'un mécanisme de fusion mitochondriale différent de celui retrouvé chez la levure ou les cellules de mammifère.

3.1.1.2. Article

An unusual mitofusin is involved in mitochondrial membrane fusion in *Trypanosoma brucei*

Running title: Mitochondrial dynamics in trypanosomes

Chloé Alexandra Morel¹, Corinne Asencio¹, Corinne Blancard², Bénédicte Salin², Etienne Gontier³, Stéphane Duvezin-Caubet², Manuel Rojo², Frédéric Bringaud¹ and Emmanuel Tetaud^{1*}

¹ Univ. Bordeaux, CNRS, MFP, UMR 5234, F-33000, Bordeaux, France

² Univ. Bordeaux, CNRS, IBGC, UMR 5095, F-33000, Bordeaux, France

³ Univ. Bordeaux, BIC, F-33000, Bordeaux, France

*Corresponding author: emmanuel.tetaud@u-bordeaux.fr

Tel: (+33) 0557574805

SUMMARY

- The kinetoplastid protein *TbMfnL* is an unusual mitofusin involved in mitochondrion fusion
- Overexpression of *TbMfnL* induces an increase in mitochondrial interconnection and branching
- Overexpression of *TbMfnL* induces alterations in energy and lipid metabolism resulting in a significant increase in cellular, nuclear and mitochondrial volume

ABSTRACT

Unlike most other eukaryotes, where mitochondria continuously fuse and divide, trypanosome mitochondria form a single and continuously interconnected network that only divides during cytokinesis. The machineries governing mitochondrial remodeling and interconnection, however, remain largely unknown. We identify and characterize an unusual dynamin-related protein (DRP) from *T. brucei* (*TbMfnL*) that depicts similarities with Opa1 and Mfn, which are the two mammalian DRPs involved in inner and outer mitochondrial membranes fusion, respectively. *TbMfnL* relies on the N-terminal MTS and on the C-proximal TM domains for targeting to mitochondrial membranes like Opa1 and Mfn, respectively.

Overexpression of *TbMfnL* induces (i) a strong increase in the interconnection and branching of mitochondrial filaments and a major increase in cellular, nuclear and mitochondrial volume and (ii) an increase in the levels of glucose and proline, its two major carbon sources, and of ethanolamine, a precursor of phosphatidyl-ethanolamine, a major lipid involved in membrane biogenesis and shaping. We propose that mitochondrial *TbMfnL* contributes to the formation of intermitochondrial connections by fusion.

INTRODUCTION

Trypanosoma brucei is a parasite responsible for African sleeping sickness as well as the related cattle disease Nagana, affecting sub-Saharan Africa. *T. brucei* is transmitted to mammals, its final host, by an insect vector: the tsetse fly. During the trypanosome life cycle, the parasite exists in at least two replicative forms; the procyclic form (PCF), transmitted by the tsetse fly *Glossina* spp., and the bloodstream form (BSF) responsible for diseases in vertebrates. The pathogenic trypanosomes have a single mitochondrion, unlike most other eukaryotes that contain numerous (Bohringer and Hecker, 1975). Trypanosome's mitochondrion is highly elongated and reticulated and its genome (mitochondrial DNA) is restricted to a specific structure at the basis of the flagellum known as kinetoplast (kDNA). During the trypanosome life cycle and its adaptation to different hosts and environments, the shape of its mitochondrial compartment undergoes spectacular changes that reflect its functional plasticity. Indeed, the mitochondrion of this parasite exists in at least two major forms: (i) the fully active and developed one characteristic for the PCF that harbors the oxidative phosphorylation complexes (OXPHOS) for energy production (Priest and Hajduk, 1994; van Hellemond et al., 2005) and (ii) the functionally less active and morphologically reduced form found in the bloodstream, with energy produced exclusively through glycolysis since OXPHOS is repressed (Michels et al., 2006). These modifications correlate with the adaptation of the parasite to the glucose-rich blood of a mammalian host and the proline-rich hemolymph and tissue fluids of the blood-feeding tsetse fly (Matthews, 2005). Studies in mammals and in yeast having unraveled tight links between mitochondrial bioenergetics, morphology and dynamics (Duvezin-Caubet et al., 2006; Sauvanet et al., 2010; Silva Ramos et al., 2016), it is tempting to assume that such close relationships not only regulate mitochondrial function and energy metabolism, but also the life cycle and pathogenic potential of trypanosomes.

However, in contrast to fungi and metazoa, where mitochondrial morphology and fusion/fission dynamics have been thoroughly characterized (Chan, 2012; Westermann, 2010), almost nothing is known about the factors and mechanisms governing mitochondrial morphology and dynamics in trypanosomes.

In most eukaryotes, mitochondria are very dynamic, alternating between two major events; fusion and fission. Mitochondrial dynamics allows to maintain mitochondrial morphology, distribution and size (Sauvanet et al., 2010). The main proteins involved in these events are large GTPase belonging to the dynamin family. The main GTPase responsible for mitochondrial fission in yeast and mammalian cells is Dnm1/Drp1, a soluble protein which is recruited to mitochondrial and peroxisomal membranes to exert its function (Otera et al., 2013; Sesaki et al., 2014). Mammalian mitochondrial fusion requires fusion of outer mitochondrial membrane (OMM) followed by fusion of inner mitochondrial membrane (IMM) which is carried out by mitofusins 1 and 2 (Mfn1 and Mfn2) and optic atrophy 1 (Opa1), respectively (Malka et al., 2005; Song et al., 2009). Alteration in one of these processes and of the equilibrium between them provokes mitochondrial fragmentation or hyperfusion (Legros et al., 2002; Sesaki et al., 2014) and is linked to diseases, notably neuropathies (Bertholet et al., 2016).

Mitochondrial fusion and fission in trypanosomes have been poorly investigated to date. Indirect evidence for mitochondrial fusion came 25 years ago from *in vivo* genetic exchange of mtDNA (Gibson et al., 1997). Another indication of fusion/fission dynamic stems from the observation of reversible mitochondrial fragmentation by the overexpression of mammalian Bax in trypanosomes (Esseiva et al., 2004) and from the observation that, in BSF, the mitochondrial network mostly grows from two areas where loops and branches eventually merge to build a complex network (Jakob et al., 2016). Unlike mammalian and yeast cells, it seems that in trypanosomes, mitochondrial fission is not an endogenous/spontaneous process but it has to be artificially induced to be observed (Chanez et al., 2006; Esseiva et al., 2004) and mitochondrial fission being mainly active during parasite division (Chanez et al., 2006; Hughes et al., 2017). The absence of spontaneous/ongoing/continuous fission could also explain the unique tubular and reticulated structure of the parasite mitochondrion, as observed in fission mutants in yeast or mammalian cells, thus altering the mitochondrial dynamic equilibrium in favor of fusion (Sesaki and Jensen, 1999) (Bleazard et al., 1999). Finally, a very recent study of the mitochondrial structure in another trypanosomatid (*Crithidia fasciculata*), revealed slow and discrete fission and fusion events during the cell cycle, suggesting that these mechanisms are indeed present in these parasites (DiMaio et al., 2018).

Two decades of research have revealed that numerous mitochondrial fusion and fission factors appear conserved in eukaryotes, with non-neglectable differences between fungi and mammals (Sauvanet et al., 2010). So far, only one dynamin-like protein, *TbDlp*, has been really described and studied in *T. brucei* and its ablation leads to impaired mitochondrial division (Chanez et al., 2006; Morgan et al., 2004).

TbDlp appears to be the functional homolog of Drp1/Dnm1 in mammals and yeast, suggesting its involvement in mitochondrial fission, but restricted to the cytokinesis (Chanez et al., 2006). Another putative dynamin called *TbMfnL*, which has similarity with fusion factors, has been reported to influence the mitochondrial shape but surprisingly its inactivation lead to a highly fenestrated mitochondrial network suggesting a role in mitochondrial fission (Vanwalleghem et al., 2015). To date, there is no characterized dynamins involved in mitochondrial fusion in trypanosomes.

In this study, we pursue the characterization of *TbMfnL* which has a unique domain organization and similarities with two mitochondrial Dynamin Related Proteins (DRPs) involved in fusion of inner and outer mitochondrial membranes, namely Opa1/Mgm1 and Mfn/Fzo. We show that *TbMfnL* localizes to mitochondrial membranes and is able to modulate mitochondrial branching and shape. In opposition to previous evidence (Vanwalleghem et al., 2015), suggesting a role in fission, our findings point to a role of *TbMfnL* in fusion.

RESULTS

1 - Identification of *TbMfnL* and in silico analysis

To identify potential fusion players, we started our search by careful re-examination of trypanosome genomic and proteomic databases for proteins showing sequence homology to known fusion factors (Opa1/Mfn1/2). We were only able to identify a dynamin-related protein, *TbMfnL* (Tb427.7.2410), that displays similarities with both mammalian fusion factors of the inner or outer membrane (**Figure 1 and S1**). Analysis of its sequence identified several motifs and domains found in other mitochondrial dynamins. Indeed, its N-terminal sequence displays a potential mitochondrial targeting signal (MTS) with several potential cleavage sites identified depending on the algorithm used (**Figure S1**), followed by a GTPase domain with conserved G1 to G4 motifs and, in its C-terminal region, two trans-membrane domains (TM) (**Figure 1 and S1**). Interestingly, the MTS points to inner membrane targeting (such as the inner membrane fusion factor Opa1 localizing to the intermembrane space), and its C-proximal transmembrane domains (TMs) are reminiscent of outer membrane Mfn. The overall structure (and/or) domain organization of *TbMfnL* displays however more similarity to human Mfn than to Opa1 (**Figure 1**).

2 - *TbMfnL* is localized in the mitochondrion

In order to determine the subcellular localization of *TbMfnL* in *T. brucei*, we appended a C-terminal 10xHA tag to endogenous *TbMfnL* (*TbMfnL::10HA*) in both PCF and BSF using the pPOTV7 vector series (Dean et al., 2015) (**Figure 2A**) and verified that the tag has no impact on cell growth (**Figure S2**). Expression of *TbMfnL::10HA* was confirmed by western-blot with anti-HA antibody in PCF and BSF (**Figure 2B**). It should be noted that the protein is about 2-fold more expressed in PCF than BSF which is in agreement with the data obtained by SILAC analysis (Urbaniak et al., 2012). The localization of the *TbMfnL* protein was studied by immunofluorescence using threonine dehydrogenase (Tdh, (Millerioux et al., 2013)) as a mitochondrial matrix marker (**Figure 2C**). *TbMfnL::10HA* and Tdh clearly colocalized in the mitochondrial compartment (**Figure 2C, Merge**). We also addressed, by immunofluorescence, *TbMfnL* subcellular localization in BSFs. For technical reasons (same secondary antibody), we could not perform a colocalization of the *TbMfnL::10HA* protein with a mitochondrial protein. However, we performed a parallel labeling of the mitochondria, with an antibody directed against the mitochondrial Hsp60 or against the HA tag. Under these conditions, we observe for these two labelings a tubular structure characteristic of the BSF mitochondrion (**Figure 2D**). The overall modular organization of *TbMfnL* and its subcellular localization confirm that *TbMfnL* is a mitochondrial protein, like the fusion factors Mfn/Fzo and Opa1/Mgm1.

3 - Knock-out of *TbMfnL* does not alter mitochondrial shape

Live microscopy of yeasts and cultured mammalian cells has revealed that mitochondrial morphology is continuously remodeled by antagonizing fission and fusion reactions (Nunnari et al., 1997). Under normal conditions, the fusion/fission balance is established in favor of fusion and the mitochondria appear filamentous. Inhibition of fusion leads to mitochondrial fragmentation by ongoing fission (Legros et al., 2002) and reversely its increase leads to hyperfused mitochondria (Sesaki et al., 2014). In contrast, trypanosomes show a single permanently branched and interconnected mitochondrion, with very few mitochondrial fission events reported, which appears to be restricted to cell division and especially cytokinesis (Chanez et al., 2006; Hughes et al., 2017). To investigate the role of *TbMfnL*, we first inactivated the gene encoding *TbMfnL* by CRISPR/Cas9 (Soares Medeiros et al., 2017) with an optimized protocol (see Materials and Methods). Both *TbMfnL* alleles were inactivated by integration of a puromycin resistance marker cassette into both PCF and BSF cells (**Figure 3A1**). Cloned parasites were analyzed by PCR to select double knockout cell lines (*KoTbMfnL*) (**Figure 3A2**). No significant impact on cell growth was observed in these PCF and BSF null-mutants over a period of 7 days compared to wild-type cells (**Figure S2**).

To investigate potential effect of *KoTbMfnL* on mitochondrial shape, we labeled PCF mitochondria with rhodamine-123 staining and analyzed mitochondrial shape in living cells. Since BSF were too mobile to obtain focused images with rhodamine 123, we stained mitochondria in fixed cells by immunofluorescence with mitochondrial Hsp60 antibodies. The knock-out of a fusion factor is often accompanied by mitochondrial fragmentation, but no significant difference was observed in the structure of the *KoTbMfnL* mitochondrion (**Figure 3B1 and 3C**). In order to identify and quantify discrete modifications of the mitochondrion shape that may escape detection upon qualitative visual analysis, we developed an ImageJ macro for the automatic analysis of the obtained images, which allows quantification of mitochondrial junctions (**Supplemental MMS1**). The number of mitochondrial junctions is equivalent in *KoTbMfnL* and wild-type PCF cells (8.5 ± 4.9 vs 9.4 ± 4.3) (**Figure 3B1**) confirming the qualitative analysis of the microscopy images (**Figure 3B2**). These data are not in line with a previous report describing a highly fenestrated mitochondrial network consecutive of a partial but significant inhibition (70%) of *TbMfnL* expression by RNAi in BSF (Vanwalleghem et al., 2015). To repeat this latter experiment, we conditionally down-regulated expression of *TbMfnL* using a stem-loop RNAi construct. This approach led to a significant reduction of *TbMfnL* expression ($\sim 85\%$) of the endogenously tagged *TbMfnL::10HA* in PCF (**Figure S3**). In agreement with our *KoTbMfnL* data, no fenestration phenotype was observed, regardless of the number of days of inhibition. The reason of this discrepancy with Vanwalleghem et al. is currently unknown.

4 - *TbMfnL* overexpression increases mitochondrial branching in PCFs

The lack of effect of *TbMfnL* knock-down and knock-out was unexpected for a factor we expect to be involved in mitochondrial fusion/fission dynamics. We therefore investigated the possible role of *TbMfnL* by conditional overexpression. Overexpression of C-terminal tagged (3xTy1) *TbMfnL* ($^{oe}TbMfnL::3Ty1$) in PCF (**Figure 4A1**) was confirmed by Western-blot analysis after 3 to 5 days of tetracycline induction (**Figure 4A2**). Rhodamine-123 staining showed that wild-type and non-induced $^{oe}TbMfnL::3Ty1$ cells harbor the expected reticulated mitochondrial structure, while the mitochondrion appears significantly more reticulated and branched in induced $^{oe}TbMfnL::3Ty1$ cells (**Figure 4A3, Figure S6**). For a more precise and quantitative description of the branching phenotype, we used our ImageJ macro allowing quantification of mitochondrial junctions. After 5 days of induction, the average number of mitochondrial junctions is more than 2-times higher in induced $^{oe}TbMfnL::3Ty1$ cells compared to non-induced or wild type cells (**Figure 4C**). These data suggest that overexpression of *TbMfnL* stimulates intermitochondrial connections by fusion.

5 - *TbMfnL* bears a bona fide GTPase

Dynamin-like proteins such as *HsMfn* have a GTP-binding domain that binds and hydrolyzes GTP upon membrane fusion. Several mutations located in the highly conserved domains interacting with GTP provoke dynamin-dysfunction by lowering GTP-binding and hydrolysis efficiency. To determine whether *TbMfnL* requires a functional GTPase domain to function, the key lysine 141 in the highly conserved G1 motif was converted to alanine, a mutation (K141A) significantly reducing GTP-binding of dynamins in other organisms (Hales and Fuller, 1997; Hermann et al., 1998; Santel et al., 2003).

The K141A mutation was introduced into the sequence of *TbMfnL* tagged with a C-terminal 3xTy1 (^{oe}*TbMfnL*K141A::3Ty1, **Figure 4B1**). Western-blot analyses after 3 to 5 days of tetracycline induction showed that overexpression of *TbMfnL*K141A::3Ty1 is similar to that of *TbMfnL*::3Ty1 (**Figure 4A2/B2**). As expected, the mutated protein localized in the mitochondria (**Figure 5C**) and does not alter mitochondrial shape (**Figure 4B3**, **Figure S6**) nor the number of mitochondrial junctions (**Figure 4C**), which clearly demonstrates that *TbMfnL* is a dynamin related protein that relies on a functional GTPase domain to modulate mitochondrial branching in trypanosomes.

6 - *Submitochondrial localization*

Mitochondrial localization of *TbMfnL* in PCF was also analyzed by co-labeling of ^{oe}*TbMfnL*::3Ty1 and Tdh, by immunofluorescence. The overexpressed *TbMfnL*::3Ty1 localized to mitochondria (**Figure 5A1**), as previously described for the endogenous protein (**Figure 2C**). Analysis of mitochondrial shape by immunofluorescence confirmed that overexpression of *TbMfnL* is linked to the appearance of hyper-reticulated mitochondrion (**Figure 5A1, d5.i**), as previously observed in living, rhodamine-123 labeled cells (**Figure 4A3**). For more precise *TbMfnL* localization, we performed Ultrastructure expansion Microscopy (U-ExM), which increases the size of a sample while preserving its ultrastructure (Amodeo et al., 2021; Gambarotto et al., 2021). By this approach, we show that both ^{oe}*TbMfnL*::3Ty1 (**Figure 5A2**) and the endogenous *TbMfnL*::10HA (**Figure 5B**) are not fully co-localized with the matrix marker (Tdh), but appears to be localized at the periphery of the mitochondria. Of note, *TbMfnL* depicts a non-continuous, punctate distribution within the membrane.

The localization of the wild-type *TbMfnL* and mutant *TbMfnL* (K141A) was also investigated by electron microscopy (EM) and immunogold-labeling using an anti-Ty1 antibody. As a control, we performed immunogold-labeling on non-induced cells in both ^{oe}*TbMfnL*::3Ty1 and ^{oe}*TbMfnL*K141A::3Ty1, allowing us to determine the background of primary and secondary antibodies (**Figure 6A1/B1 and D**). After induction and immunogold-labeling, both proteins are clearly localized in the mitochondrion (**Figure 6A3/B3**) which is also confirmed by gold-particles quantification (**Figure 6D**).

We then investigate the effect of *TbMfnL* expression in the BSF form, where the mitochondrial compartment is smaller and composed of shorter and less interconnected mitochondria. Overexpression of ^{oe}*TbMfnL::3Ty1* was monitored by western-blot (**Figure 5D2**), but unlike PCF, the mitochondrial structure was not at all altered (labeled here with mitochondrial Hsp60), remaining tubular and slightly reticulated like in wild-type cells (**Figure 5D1**). Induction over a longer period (up to 21 days) did not show mitochondrial alterations.

7 - Mitochondrial targeting and membrane anchoring of *TbMfnL*

To investigate in more detail the mechanisms ensuring mitochondrial targeting of *TbMfnL*, we first addressed the two domains that may determine *TbMfnL* localization: (i) the N-terminal MTS that could mediate inner membrane targeting and intermembrane space localization as the MTS of Opa1, and (ii) the C-proximal/terminal TMs that could mediate outer membrane anchoring, as the TMs of Mfn. To investigate their capacity to target mitochondria, we fused the MTS domain, or the two transmembrane domains, to GFP (**Figure 7A**). Fusion of the MTS at the N-terminus of GFP (_{MTS::GFP}) fully addressed GFP to the mitochondria (**Figure 7A**). Interestingly, the size of _{MTS::GFP} revealed by Western-blot is identical to that of cytosolic GFP without MTS (**Figure 7B**), suggesting that the MTS was cleaved by the mitochondrial Matrix Processing Peptidase (MPP) upon import of _{MTS::GFP} across the inner membrane. It is to note that *TbMfnL::3Ty1* and *TbMfnLK141A::3Ty1* showed the same apparent size as *TbMfnL*ΔMTS (without MTS) by western-blot analyses, indicating that MTS is cleaved in its natural context (**Figure 7C**).

We then investigated the addition of the 2 trans-membrane domains at the C-terminal extremity of GFP (GFP::TM). As expected, a size shift corresponding to the addition of transmembrane domains is observed by western-blot (**Figure 7B**). However, in contrast to _{MTS::GFP}, the GFP::TM was not targeted to mitochondria, but to unknown distinct structures, possibly membrane or ER as well as the flagellum which is different from a cytosolic labeling (see GFP alone) or from a mitochondrion labeling (here revealed with the anti-Tdh antibody) (**Figure 7A and Figure S5**). This shows that these TMs do not have mitochondrial targeting determinants, but targets GFP to other organellar membranes. The capacity to target GFP from the cytosol to other organelles, points to ability of these TMs to target and/or anchor the membrane.

Conversely, we expressed in PCF a tetracycline-inducible tagged *TbMfnL* without the potential MTS (^{oe}*TbMfnL*ΔMTS::3Ty1) or without TMs (^{oe}*TbMfnL*ΔTM::3Ty1) to investigate their functionality and role (**Figure 8A1 and 8B1**). Conditional expression of both recombinant *TbMfn* was confirmed by western blot, after 3 days or/and 5 days of induction (**Figure 8A2/4A2**).

In contrast to ${}^{oe}TbMfnL::3Ty1$, a significant proportion of ${}^{oe}TbMfn\Delta MTS::3Ty1$ doesn't colocalize with Tdh indicating that the N-terminal MTS is required for proper mitochondrial targeting of *TbMfnL* (**Figure 8A3, Figure S5**). Interestingly, the labeling observed for ${}^{oe}TbMfn\Delta MTS::3Ty1$ is somewhat similar to the labeling of GFP::TM (**Figure 8A3, Figure 7A and Figure S5**). We observed, however, that part of ${}^{oe}TbMfn\Delta MTS::3Ty1$ still remained close to Tdh signal. To analyze the localization of ${}^{oe}TbMfn\Delta MTS::3Ty1$ with more precision, we performed electron microscopy analysis with anti-Ty1 antibodies. We observed a dual localization of ${}^{oe}TbMfn\Delta MTS::3Ty1$, and gold-particles quantification revealed that 60% of ${}^{oe}TbMfn\Delta MTS::3Ty1$ is located in the cytosol and 40% inside or close to the mitochondrion membranes (**Figure 6C**). MTS is therefore important for the correct localization of *TbMfnL*, but without it, the protein is partially able to localize to the mitochondrion. If we refer to how HsMfn1/2 locate to mitochondria, we can hypothesize that this residual mitochondrial localization is driven by the C-proximal trans-membrane domains. Finally, overexpression of ${}^{oe}TbMfn\Delta MTS::3Ty1$ does not alter mitochondrial structure, indicating that its mitochondrial localization is essential for its function (**Figure 8A3/Anti-Tdh**). We then investigated the role of *TbMfnL* TM in mitochondrial targeting by overexpressing a version truncated for the TM (${}^{oe}TbMfn\Delta TM::3Ty1$, **Figure 8B1/B2**) and analyzed the mitochondrial shape and their localization by immunofluorescence (**Figure 8B3**). ${}^{oe}TbMfn\Delta TM::3Ty1$ is also well expressed (**Figure 8B2**) and perfectly colocalizes with the mitochondrial marker, like ${}_{MTS}::GFP$. This confirms that, even in the absence of C-proximal TM-domains, the N-terminal MTS sequence is sufficient for mitochondrial targeting of *TbMfnL*. However, no modification of the mitochondrial shape was observed (**Figure 8B3**) demonstrating the crucial role of the transmembrane domains and membrane anchoring in the establishment of proper membrane topology and activity.

8 – Impact of *TbMfnL* overexpression on metabolism

As previously presented in the introduction, the shape of the mitochondrion undergoes spectacular changes during the life cycle of the parasite, reflecting adaptation to different environments. These adaptations are also accompanied by a profound change in their metabolism. The question here is whether an alteration of the mitochondrial structure affects the metabolism of the parasite. To address this, we screened the use of 119 different carbon and nitrogen sources in parasites overexpressing or not *TbMfnL* (${}^{oe}TbMfnL::3Ty1$). Two carbon sources, D-glucose and L-proline (n°14/114) (**Figure 9**), are significantly more consumed/used in ${}^{oe}TbMfnL::3Ty1$ cells compared to non-induced cells, suggesting that modifications of the mitochondrial structure require increased energy consumption or to the opposite, that mitochondrial shape restructuring impacts metabolism.

Interestingly, ethanolamine (n°61) is also significantly more consumed/used in *oeTbMfnL::3Ty1* cells. This molecule is a precursor of phosphatidylethanolamine, an important component of mitochondrial membranes (Richmond et al., 2010), which in line with the observed increase in mitochondrial complexity. It seems, moreover, that the mitochondrial biogenesis observed in *oeTbMfnL::3Ty1* cells is restricted to lipid biogenesis, without an increase in the content of other mitochondrial components. Indeed, we did not observe differences in the amount of several mitochondrial, glycosomal or cytosolic metabolism-related proteins (**Figure S4**).

9 -*TbMfnL* overexpression induces a massive increase in cell, nucleus and mitochondrion volumes

Since overexpression of *TbMfnL* appears to stimulate lipid biogenesis, we wanted to determine whether mitochondrial volume could also be altered. To this end, we used a serial block face scanning electron microscopy (SBF-SEM) approach previously developed to determine BSF cell volumes (Hughes et al., 2017). With this technique, hundreds of images are collected to perform a 3D reconstruction of the whole cell, as well as spatial organization of the individual organelles within the cell.

Four to five wild-type and *oeTbMfnL::3Ty1* PCF cells were reconstructed in 3D, with a particular emphasis on the mitochondrion, the nucleus, the flagellar pocket and the cell outline. We have not been able to correctly identify the kinetoplast DNA on the electron microscopy images, thus preventing its 3D reconstruction. However, since kDNA is in close contact with the flagellar pocket, it is easy to position it. Other organelles (glycosomes, acidocalcisomes, golgi, flagellum, etc.) are not represented either in order to not overload the 3D representation. As expected, wild-type PCF cells showed a reticulated mitochondrion along the whole cell (**Figure 10AB**), a rather central nucleus and the flagellar pocket on the posterior side. The length of the wild-type and *oeTbMfnL::3Ty1* cells, varies between 20.4 ± 3.3 and 23 ± 4.7 μm , respectively. As observed by fluorescence microscopy, *oeTbMfnL::3Ty1* mitochondrion showed more areas with stronger reticulation (**Figure 10A/B, indicated by arrows**). Unexpectedly, in some cell this reticulation is even more prominent at the edges of the flagellar pocket, where the kDNA is located, as illustrated in **Figure 10B**, an observation that we had not identified by immunofluorescence microscopy approaches. This hyper-reticulated structure (leaving a few gaps in the mitochondrion) forms a globular structure and encapsulates the kDNA (**Figure 10B, indicated by arrows**). This structure has been already described in BSF and called kDNA pocket (Jakob et al., 2016), but this structure is even more prominent in the *oeTbMfnL::3Ty1* cells.

It should be noted that the 3D reconstruction of *oeTbMfnL::3Ty1* cells required the analysis of more slices in order to have a whole cell, suggesting a larger volume of the cell with a width at the nucleus of $\sim 3.96 \pm 1.19 \mu\text{m}$ for *oeTbMfnL::3Ty1* and $\sim 2.51 \pm 0.28 \mu\text{m}$ for wild-type cells, but no modification in the length of the parasite was observed. Wild-type cells exhibit a cell and nucleus volume around 53.5 ± 6.6 and $5 \pm 1 \mu\text{m}^3$ respectively, which are quite similar to the volumes measured in the different stages of the BSF cell cycle (cell $31\text{-}61 \mu\text{m}^3$ and nucleus $2.8\text{-}6.3 \mu\text{m}^3$) (Hughes et al., 2017) (**Figure 10C**). As expected, PCF mitochondrial volume is nearly doubled ($4.9 \pm 1 \mu\text{m}^3$) compared to the mitochondrial volume of BSF ($1.1\text{-}3 \mu\text{m}^3$) (Hughes et al., 2017; Jakob et al., 2016). Surprisingly, the mitochondrial, nuclear and the whole cell volumes were increased ~ 1.7 -fold in *oeTbMfnL::3Ty1* cells by compared to wild-type cells (**Figure 10C**). These observations resonate with the increased glucose and proline consumption and more importantly with the increased consumption of ethanolamine (**Figure 9**). Altogether these data suggest that *oeTbMfnL::3Ty1* cells need more energy and metabolic precursors, from increased catabolism of carbon sources, to fuel the increased membrane biosynthesis.

DISCUSSION

In trypanosome, no fusion proteins similar to the yeast and mammalian proteins had been identified so far, but our search by careful re-examination of genomic databases for proteins of trypanosomes with sequence homology to known fusion factors revealed only one dynamin-related protein, *TbMfnL*, that displays similarities to the fusion factors of outer or inner membrane: its N-terminal MTS, points to inner membrane targeting or anchoring (as inner membrane fusion factor Opa1) and its C-proximal transmembrane domains (TMs), are reminiscent of outer membrane Mfn. This “in between” organization suggests that *TbMfnL* may function within an unusual and trypanosome-specific fusion machinery. Indeed, it is very well possible that trypanosome machineries are highly divergent, as recently reported for the mitochondrial complexes involved in protein import (ATOM and TIM) (Harsman and Schneider, 2017) or the maintenance of cristae junctions with the MICOS complex (Kaurov et al., 2018).

To confirm the role of *TbMfnL* in mitochondrial fusion/fission, we altered the balance between these two processes. Over-expression of the *TbMfnL* protein in PCF modifies the structure of the mitochondrion, with a very strong increase of the connections, confirming its role in the structuring of the mitochondrion. Moreover, the inactivation of its GTPase domain (K141A mutation) also confirms its belonging to the large family of dynamins. Interestingly, a similar link between hyperconnection of a branching network and increased fusion processes has been reported in filamentous fungi, which grow as interconnected branching networks (Herzog et al., 2015).

It is therefore tempting to speculate that, in trypanosomes, excess *TbMfnL* increases the interconnectivity of mitochondrial networks by enhanced fusion.

The absence of fragmentation observed upon partial or total inactivation of *TbMfnL* expression suggests that trypanosomes differ from mammalian and yeast cells by the absence or a very low level of regular/permanently mitochondrial fission. This is in agreement with previous studies suggesting that fission only occurs during cell division (Chanez et al., 2006; Morgan et al., 2004). However, it should also be kept in mind that other proteins could be involved in the structuring of mitochondria as shown by studies on mitochondrial outer membrane proteome in *T. brucei* (Niemann et al., 2013; Povelones et al., 2013) and the presence of mitochondrial complexes such as recently characterized MICOS (Kaurov et al., 2018). It is also possible that very small changes in mitochondrial structure are present, but that our approach to measuring it is not sensitive enough.

Another intriguing point is the absence of alteration caused by overexpression of *TbMfnL* in the BSF, which seems to reflect the relatively low dynamics of the mitochondrial structuration in these parasitic forms. It is possible that *TbMfnL* interacts with other partners, in a possible branching complex, that might only be expressed in the PCF. However, one cannot exclude that overexpression of *TbMfnL* is not high enough to initiate an increase in interconnectivity.

Using several microscopy approaches, we have shown that *TbMfnL* is localized in the mitochondrion and more precisely in the mitochondrial membranes. As opposed to other fusion proteins, *TbMfnL* contains two domains involved in its mitochondrial addressing, an N-terminal sequence (MTS) and two C-terminal trans-membrane domains. All the other fusion proteins carrying only a C-terminal or C-proximal TM anchor appear exposed to the cytosolic face (Borgese and Fasana, 2011; Costello et al., 2017). However, proteins carrying a N-terminal MTS are not always fully imported to the matrix, as exemplified by the intermembrane space (IMS) proteins Opa1 and Apoptosis-inducing factor (AIF) that face of the inner membrane (Otera et al., 2005). The presence of two different targeting motifs thus points to complex and/or unique targeting and membrane topology/topologies of *TbMfnL*, different from that observed in the OM and IM fusion factors of mammals and fungi. Indeed, we have shown that *TbMfnL* MTS is functional, it is cleaved in the mitochondrion and its absence impacts the activity of the *TbMfnL* protein, suggesting that the protein crosses OMM and may be partially IMM. However, in its absence, the protein is still partially associated to the mitochondria through its two C-terminal transmembrane domains. Of note, our database searches did not allow us to identify a trypanosome homologue of dynamin resembling the IM-fusion factor Mgm1/Opa1.

It is thus tempting to speculate that *TbMfnL*, in contrast to *Mfn/Fzo*, contributes to inner and outer membrane fusion. How the protein is oriented in the membranes, is a point that remains to be studied.

In many eukaryotes, mitochondria display a dynamic behaviour of constant fission and fusion, with the size, appearance and organization of mitochondrial membranes varying between species, tissues and physiological conditions (Sauvanet et al., 2010). Although there is considerable convincing evidence that mitochondrial dynamics and bioenergetics are linked, the precise relationship between the two is still not known (Duvezin-Caubet et al., 2006; Sauvanet et al., 2010; Silva Ramos et al., 2016). It is therefore tempting to assume that such tight connections regulate not only mitochondrial function and energy metabolism, but also the life cycle and pathogenic potential of trypanosomes. In order to identify possible metabolic variations induced by *TbMfnL* overexpression, we screened 119 molecules that could be used by parasites as carbon and energy sources. Only 3 molecules appeared to be more used/consumed in cells with altered mitochondria, i.e. glucose, proline and ethanolamine. Glucose and proline are the two main carbon sources that trypanosomes use in the mammalian host and the insect vector, respectively. This suggests a greater energy demand, required either to change the mitochondrial structure and/or to increase the mitochondrial membrane biogenesis. However, the lack of increase in some mitochondrial protein markers does not support the latter.

The third molecule, ethanolamine, is probably not a carbon source *per se*, but reflects a change in phospholipid metabolism and more specifically in phosphatidylethanolamine (PE), which together with phosphatidylcholine (PC), are the main constituents of eukaryotic cell membranes. PE tends to form a non-bilayer forming phospholipids that is preferentially distributed in the inner leaflet of mitochondrial membranes and plays an essential role in mitochondrial functions (Ardail et al., 1990; Gonzalez and Gottlieb, 2007) by maintaining the mitochondrial morphology (Kuroda et al., 2011; Osman et al., 2009; Tamura et al., 2009). Indeed, PE is a fusogenic phospholipid that confers negative curvature to the mitochondrial membrane (van den Brink-van der Laan et al., 2004) and has been proposed to play important roles in membrane fusion involving the mitofusin *Mfn* (Joshi et al., 2012). In PCF *T. brucei*, PE and PC are synthesized exclusively through the Kennedy pathway (Signorell et al., 2008). Mutations in lipid composition result in alterations in mitochondrial morphology and inhibition of respiration (Guler et al., 2008) (Fridberg et al., 2008). Remarkably, RNAi-mediated down-regulation of ethanolamine phosphate cytidyltransferase expression, the second enzyme in the Kennedy pathway, has been shown to disrupt mitochondrial morphology and ultrastructure in *T. brucei*.

The most immediate effect was a change in mitochondrial morphology and disruption of the inner mitochondrial membrane topology (Signorell et al., 2009). Since PE is essential for mitochondrial morphology, the increased ethanolamine utilization/consumption in *TbMfnL*-overexpressing parasites likely reflects increased membrane lipid biogenesis to support the alterations in mitochondrial structure. SBF-SEM analysis and 3D reconstruction of parasites expressing *TbMfnL* showed a significant increase of mitochondrial membrane biogenesis with an almost doubling of the mitochondrial volume. This increased membrane biogenesis is particularly evident in the vicinity of the kDNA, which is completely enveloped by a hyper-reticulated globular mitochondrial structure. More work is needed to determine whether this part of the mitochondrion is a preferential place for membrane biogenesis. It is noteworthy that the volume of the nucleus also doubled, which may explain the significant increase of the cell volume and thus the cellular surface. It is therefore likely that the increase in membrane biogenesis is not limited to the mitochondrial membranes, but also affects the other cell membranes. However, this increase in volume does not affect the parasite's growth rate, implying that the increase in volume is disconnected from mechanisms regulating cell division. More work is now required to understand how *TbMfnL* induces these structural and metabolic changes, as well as its mode of action.

MATERIALS AND METHODS

Trypanosomes and cell cultures

The PCF of *T. brucei* EATRO1125.T7T (TetR-HYGT7RNAPOL-NEO, where TetR stands for tetracycline resistance, HYG for hygromycin, POL for polymerase T7, and NEO for neomycin) was cultured at 27°C with 5% CO₂ in SDM79 medium containing 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum, 5 µg/ml hemin, 25 µg/ml hygromycin, and 10 µg/mL neomycin. The bloodstream form of *T. brucei* 427 90-13 (TetR-HYG T7RNAPOL-NEO) was cultured at 37°C with 5% CO₂ in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 0.2 mM β-mercaptoethanol, 36 mM NaHCO₃, 1 mM hypoxanthine, 0.16 mM thymidine, 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM bathocuproine, 1.5 mM L-cysteine (Hirumi and Hirumi, 1989), 5 µg/ml hygromycin and 2,5 µg/mL neomycin. Overexpression cell lines were induced with tetracycline (10 µg/mL for BSF and 1 µg/mL for PCF). Growth was monitored by daily cell counting with the cytometer Guava® Muse® and Guava® *easyCyte*™.

Endogenous tagging and overexpression of TbMfnL

For endogenous gene tagging, primers were designed as described in (Dean et al., 2015) and PCR was performed using pPOTv7 vector as template.

The pPOT used here was pPOTv7 for C-terminus 10xHA tagging (blasticidin resistance). For overexpression, MfnL gene (Tb927.07.2410) was inserted in both pLew100 (phleomycine resistance) (Wirtz et al., 1999) and pHD1336 (blasticidin resistance) (Biebinger et al., 1997) expression vectors. Fragments were amplified and cloned into *Hind*III and *Xba*I restrictions sites of the pLew100 and into *Hind*III and *Bam*HI restrictions sites of the pHD1336 expression vectors. In addition, a 3xTy1 tag was added at the C-terminus of the protein in the pLew100-*Tb*MfnL, using the *Xba*I and *Bam*HI restrictions sites. The truncated version of *Tb*MfnL without the first 41 amino acids (*Tb*MfnL Δ MTS) and without the two trans-membranes domain (*Tb*MfnL Δ TM) were amplified and cloned in the pLew100 with a 3xTy1 tag as previously described. Catalytic mutant K141 was replaced by an alanine, using PCR approach (Ling and Robinson, 1997) and PCR product cloned in the pLew100 with a 3xTy1 tag. EATRO1125.T7T PCF was transfected using Amaxa Nucleofactor®II, program X-001 and selected in SDM79 containing 25 μ g/ml hygromycin 10 μ g/mL neomycin and 5 μ g/mL phleomycin. 427 90-13 BSF was transfected using the same conditions and selected in IMDM containing 5 μ g/ml hygromycin 2,5 μ g/mL neomycin and 5 μ g/mL blasticidin. Primers used for the constructions are presented in supplemental **Table S1**.

Inhibition of TbMfnL gene expression

Inhibition of MfnL expression by RNAi was achieved by expression of stem-loop "sense/antisense" RNA molecules targeting a 400-bp fragment of the MfnL gene introduced into the pLew100 tetracycline-inducible expression vector. A PCR-amplified 450-bp fragment, containing the antisense MfnL sequence was inserted between *Xho*I and *Bam*HI restriction sites of the pLew100 plasmid. Then, the separate 400-bp PCR-amplified fragment containing the sense MfnL sequence was inserted upstream of the antisense sequence, using *Hind*III and *Xho*I restriction sites. The resulting plasmid, pLew100-MfnL-SAS, contains a sense and antisense version of the MfnL fragment separated by a 50-bp fragment. The EATRO1125 PCF was transfected with the pLew100-MfnL-SAS and cells were selected in SDM79 medium containing 25 μ g/ml hygromycin 10 μ g/mL neomycin and 5 μ g/mL phleomycin. Expression of the RNAi was induced by tetracycline (10 μ g/mL). Primers used for the constructions are presented in supplemental **Table S1**.

Inactivation of TbMfnL by CRISPR-Cas9

Inactivation of *Tb*MfnL was achieved by CRISPR Cas9 technology according Soares Medeiros et al. (Soares Medeiros et al., 2017) but using *Sp*Cas9 instead of *Sa*Cas9 (more detailed description of optimized and adapted protocols will be published separately).

Briefly, inactivation of the *TbMfnL* was achieved by inserting the resistant marker puromycin (Pac) flanked by 50 bp homologous to the 5' and 3' *TbMfnL* sequences from the Cas9 cutting site. The EATRO1125.T7T or AnTat 1.1 PCF and the 427 90.13 BSF (1×10^6 cells) were respectively transfected, using Amaxa nucleofectorII, with 1 μ g of purified cassette encoding the puromycin resistance marker, 50 μ g Cas9 protein from IDT and pre-annealing TracrRNA (0.4 μ mol) and gRNA (0.4 μ mol). Cells were transfected using program X-001 and selected with puromycin (SDM79, 1 μ g/mL, or IMDM 0.1 μ g/mL). Cells were cloned by using a cell sorter (TBM Core facility), and selection of double knock out *TbMfnL* gene (Δ/Δ MFN) clones was done by DNA extraction, with NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel) and PCR amplification, see supplemental **Table S1**. Guide RNA (gRNA) were designed using EuPaGDT, from <http://tritypdb.org>. Two gRNA were retained MFN_102 "ACTGTTGCGCAGAAGTCAGT" and MFN_721 "TCAGTTGAGGGTCAGCTCAG" and synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT). Primers used for the selection are presented in supplemental **Table S1**.

Mitochondria staining on living cells

Rhodamine-123 (30 μ g/mL) was added on cell culture (5×10^6 - 2×10^7 cells per mL) for 15 min at room temperature, then cells were washed twice with PBS and spread on slides. Images were acquired with MetaMorph software on Axioplan 2 microscope and processed with ImageJ.

Immunofluorescence

Cells were washed twice with PBS, then fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 10 min at room temperature and 0.1mM Glycine was added 10 min to stop the reaction. The cells were spread on slides and permeabilized with 0.05% triton X-100. After incubation in PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA) 20 min, cells were incubated for 1 hour with primary antibodies diluted in PBS-BSA 4%, washed 4 times with PBS and incubated for 45 min with secondary antibodies diluted in PBS-BSA 4% followed by three washes. Then, kinetoplasts and nuclei were labelled with DAPI (10 μ g/mL) for 5 min. Slides were washed 3 times with PBS and mounted with SlowFade Gold (Molecular probes). Images were acquired with MetaMorph software on Zeiss Imager Z1 or Axioplan 2 microscope and processed with ImageJ.

Ultrastructure Expansion Microscopy (UEXM)

The protocol of UExM realized exactly as described by Casas et al. 2022 ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bvwqn7dw](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bvwqn7dw)).

An expansion factor was determined using the ratio between the size of the coverslip (12mm) and the size of the gels after the first expansion. Images were acquired on a confocal Leica SP5-MP (Bordeaux Imaging Center) using a 63X oil objective and processed with ImageJ.

Immunoelectron microscopy

Harvested cells were placed on the surface of formvar-coated copper grids (400 mesh). Each loop was quickly submersed in liquid propane (-180°C) and transferred into a precooled solution of 0.1% uranyl acetate in dry acetone for 3 days at -82°C . Samples were rinsed with acetone at -20°C , and embedded progressively at -20°C in LR Gold resin (EMS, USA). Resin polymerization was carried out at -20°C for 7 days under UV illumination. Ultrathin LR Gold sections were collected on nickel grids coated with formvar. Sections were first incubated for 15 min with NH_4Cl 500mM in Tris-buffered saline (TBS) pH7.8, blocked 2x10 min with 2% BSA in TBS pH 7.8. The grids were incubated 1 hour at room temperature with anti Ty1 antibody diluted to 1:200 in TBS containing 2% BSA rinsed with TBS containing 2% BSA and with TBS containing 1% BSA. The samples were then incubated for 1 hour at room temperature with anti-mouse IgG diluted to 1:20 conjugated to 10 nm gold particles (BioCell). The sections were rinsed with TBS containing 1% BSA, and fix with 1% glutaraldehyde in TBS. After rinsing with TBS, grids were contrasted through a 5 min incubation with 2% uranyl acetate in water, followed by 1 min incubation with 1% lead citrate. Observations were performed on a HITACHI 7650 electron microscope operated at 80 KV with a Gatan-11 MPx camera (PIE Bordeaux Imaging Center).

SBF-SEM

Cells were prepared as described by Blancard and Salin 2017 except for freeze-substitution medium (0.1% potassium permanganate for 24 h followed by 0.1% tannic acid for 24 h, and 2% osmium tetroxide with 1% uranyl acetate for 3 days).

Resin-embedded samples were trimmed, mounted onto stubs and placed into a Zeiss GeminiSEM300 with a fitted Gatan 3view system (Gatan, Abingdon, UK). Serial images of the block face were recorded at an accelerating voltage of 1.2 kV. All images were taken with the following scanning settings: Pixel size 10 nm, pixel time 5 μs , slice thickness 50 nm (Z-slice), image size 5000x5000. Between 700 and 900 images were collected for each run. Images were recorded using Digital Micrograph (Gatan). Images were combined to form a single stack.

Data processing and statistical analysis: Segmentation was conducted using AMIRA (versions 5.2.0 Thermofisher Scientific).

Manual segmentation of cells and organelles were conducted using the brush tool and was based on ultrastructural characteristics specific to each organelle. Each organelle was segmented using the organelle membrane as the outer edge. Surface models were produced for each segmented organelle. Volumes of organelles were automatically generated from the surface renderings of segmented data.

Western-blot

Total protein extracts (5×10^6 cells) or supernatants obtained after digitonin treatment (10 μ L), were separated by SDS-PAGE (10%) and immunoblotted on TransBlot Turbo Midi-size PVDF Membranes (Bio-Rad). Immunodetection was performed using the primary antibodies, diluted in PBS-Tween-Milk (0.2% Tween20, 5% skimmed milk powder), summarized in supplemental **Table S2**. Revelation was performed using a second antibody coupled to the HRP and the Clarity Western enhanced-chemiluminescence (ECL) substrate as describes by the manufacturer (Bio-Rad). Images were acquired and analyzed with the ImageQuant Las 4000 luminescent image analyzer.

Biolog

Biolog Phenotype MicroArrays™ provide an easy-to-use technology for scanning and measuring the energy metabolism pathways present in a wide range of *in vitro* cultured cell types. The metabolic pathway activities are assayed with a simple colorimetric reagent that measures redox energy produced when a cell oxidizes a chemical (Tetrazolium reduction). Standard protocol described by the manufacturer (Biolog) has been used with the following modifications: cells were resuspended in Biolog IF-M1 buffer at 1×10^7 cells per mL and 50 μ L of this cell suspension were pre-incubated in each well of the PM-M1 or PM-M2 plates for 1 hours at 27°C with 5% CO₂. Then, 10 μ L of Biolog Dye Mix (Mix MB) was added to all plate wells and load into the Omnilog® for kinetic reading for 18 hours at 27°C or endpoint measurement at 590 nm with a microplate reader after 18 hours.

Quantification of Mitochondrial junctions - ImageJ plugin

To quantify number of mitochondrial junctions, an ImageJ plugin was developed with the help of the Bordeaux Imaging Center (BIC). The script is presented in supplemental Materials and Methods data **MMS1**.

Statistical analysis

Experiments were performed at least in triplicates. Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad) software.

The results are presented as mean \pm S.D. Where indicated the results were subjected to two-sided student's t-test to determine statistical differences against the indicated group (Confidence interval 95% - P-value style: 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***) ; <0.0001 (****)).

Online supplemental material

Figure S1 shows alignment between mitochondrial dynamin-related proteins.

Figure S2 shows growth curves of parental, over-expressing and mutant cells.

Figure S3 shows the inhibition of *TbMfnL* expression by RNAi.

Figure S4 shows the results of western-blot analysis for cellular contents.

Figure S5 shows similar localization of GFP::TM and ^{oe}*TbMfnL*ΔMTS.

Figure S6 shows results of the ImageJ plugin on rhodamine-stained cells.

Table S1 shows all the primers used in this study.

Table S2 shows all the antibodies used in this study.

Supplemental Materials and Methods: MMS1 described the ImageJ plugin.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank André Schneider (University of Bern) for providing us with the anti-Atom40 antibody, Keith Gull (University of Manchester) for providing us the anti-Ty1 and anti-PFR antibodies and Derrick Robinson, Mélanie Bonhivers, Elina Casas and Nicolas Landrein (University of Bordeaux) for the pPOTv7 expression vector and extremely valuable help in the expansion microscopy experiment. Cell sorter analysis were performed at the TBMCORE facility (FACSility) on BD FACSAria™ III Sorter and we thank Atika Zouine for data acquisition and interpretation. We also thanks Bordeaux Imaging Center (BIC) for helping us to design the ImageJ macro and microscopy acquisitions. Frédéric Bringaud group was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Bordeaux.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.A. Morel conceptualized the study, performed experiments, contributed to analysis and writing. C. Asencio performed experiments and contributed to analysis. C. Blancard and B Salin performed all the EM and SBF-SEM experiments and contributed to their analysis, E. Gontier has completed all SBF-SEM acquisitions. S. Duvezin-Caubet, M. Rojo, F. Bringaud and E. Tetaud conceptualized the study, contributed to analysis and wrote the manuscript, with also an input from all the authors.

REFERENCES

- Amodeo, S., A. Kalichava, A. Fradera-Sola, E. Bertiaux-Lequoy, P. Guichard, F. Butter, and T. Ochsenreiter. 2021. Characterization of the novel mitochondrial genome segregation factor TAP110 in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.* 134.
- Ardail, D., J.P. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerme, and P. Louisot. 1990. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem.* 265:18797-18802.
- Bertholet, A.M., T. Delerue, A.M. Millet, M.F. Moulis, C. David, M. Daloyau, L. Arnaune-Pelloquin, N. Davezac, V. Mils, M.C. Miquel, M. Rojo, and P. Belenguer. 2016. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiol Dis.* 90:3-19.
- Biebinger, S., L.E. Wirtz, P. Lorenz, and C. Clayton. 1997. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 85:99-112.
- Bleazard, W., J.M. McCaffery, E.J. King, S. Bale, A. Mozdy, Q. Tieu, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nature cell biology.* 1:298-304.
- Bohringer, S., and H. Hecker. 1975. Quantitative ultrastructural investigations of the life cycle of *Trypanosoma brucei*: a morphometric analysis. *J Protozool.* 22:463-467.
- Borgese, N., and E. Fasana. 2011. Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1808:937-946.
- Chan, D.C. 2012. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annual review of genetics.* 46:265-287.
- Chanez, A.L., A.B. Hehl, M. Engstler, and A. Schneider. 2006. Ablation of the single dynamin of *T. brucei* blocks mitochondrial fission and endocytosis and leads to a precise cytokinesis arrest. *J Cell Sci.* 119:2968-2974.
- Costello, J.L., I.G. Castro, F. Camoes, T.A. Schrader, D. McNeill, J. Yang, E.A. Giannopoulou, S. Gomes, V. Pogenberg, N.A. Bonekamp, D. Ribeiro, M. Wilmanns, G. Jedd, M. Islinger, and M. Schrader. 2017. Predicting the targeting of tail-anchored proteins to subcellular compartments in mammalian cells. *J Cell Sci.* 130:1675-1687.
- Dean, S., J. Sunter, R.J. Wheeler, I. Hodkinson, E. Gluenz, and K. Gull. 2015. A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *Open Biol.* 5:140197.
- DiMaio, J., G. Ruthel, J.J. Cannon, M.F. Malfara, and M.L. Povelones. 2018. The single mitochondrion of the kinetoplastid parasite *Crithidia fasciculata* is a dynamic network. *PLoS ONE.* 13:e0202711.
- Duvezin-Caubet, S., R. Jagasia, J. Wagener, S. Hofmann, A. Trifunovic, A. Hansson, A. Chomyn, M.F. Bauer, G. Attardi, N.G. Larsson, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2006. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem.* 281:37972-37979.
- Esseiva, A.C., A.L. Chanez, N. Bochud-Allemann, J.C. Martinou, A. Hemphill, and A. Schneider. 2004. Temporal dissection of Bax-induced events leading to fission of the single mitochondrion in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Rep.* 5:268-273.
- Fridberg, A., C.L. Olson, E.S. Nakayasu, K.M. Tyler, I.C. Almeida, and D.M. Engman. 2008. Sphingolipid synthesis is necessary for kinetoplast segregation and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.* 121:522-535.

- Gambarotto, D., V. Hamel, and P. Guichard. 2021. Ultrastructure expansion microscopy (U-ExM). *Methods in cell biology*. 161:57-81.
- Gibson, W., M. Crow, and J. Kearns. 1997. Kinetoplast DNA minicircles are inherited from both parents in genetic crosses of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Res.* 83:483-488.
- Gonzalvez, F., and E. Gottlieb. 2007. Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis*. 12:877-885.
- 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.* 67:1125-1142.
- Hales, K.G., and M.T. Fuller. 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*. 90:121-129.
- Harsman, A., and A. Schneider. 2017. Mitochondrial protein import in trypanosomes: Expect the unexpected. *Traffic*. 18:96-109.
- Hermann, G.J., J.W. Thatcher, J.P. Mills, K.G. Hales, M.T. Fuller, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1998. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol.* 143:359-373.
- Herzog, S., M.R. Schumann, and A. Fleissner. 2015. Cell fusion in *Neurospora crassa*. *Current opinion in microbiology*. 28:53-59.
- Hirumi, H., and K. Hirumi. 1989. Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J Parasitol.* 75:985-989.
- Hughes, L., S. Borrett, K. Towers, T. Starborg, and S. Vaughan. 2017. Patterns of organelle ontogeny through a cell cycle revealed by whole-cell reconstructions using 3D electron microscopy. *J Cell Sci.* 130:637-647.
- Jakob, M., A. Hoffmann, S. Amodeo, C. Peitsch, B. Zuber, and T. Ochseneiter. 2016. Mitochondrial growth during the cell cycle of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Sci Rep.* 6:36565.
- Joshi, A.S., M.N. Thompson, N. Fei, M. Huttemann, and M.L. Greenberg. 2012. Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 287:17589-17597.
- Kaurov, I., M. Vancova, B. Schimanski, L.R. Cadena, J. Heller, T. Bily, D. Potesil, C. Eichenberger, H. Bruce, S. Oeljeklaus, B. Warscheid, Z. Zdrahal, A. Schneider, J. Lukes, and H. Hashimi. 2018. The Diverged Trypanosome MICOS Complex as a Hub for Mitochondrial Cristae Shaping and Protein Import. *Curr Biol.* 28:3393-3407 e3395.
- Kuroda, T., M. Tani, A. Moriguchi, S. Tokunaga, T. Higuchi, S. Kitada, and O. Kuge. 2011. FMP30 is required for the maintenance of a normal cardiolipin level and mitochondrial morphology in the absence of mitochondrial phosphatidylethanolamine synthesis. *Mol Microbiol.* 80:248-265.
- Legros, F., A. Lombes, P. Frachon, and M. Rojo. 2002. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell.* 13:4343-4354.
- Ling, M.M., and B.H. Robinson. 1997. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal Biochem.* 254:157-178.
- Malka, F., O. Guillery, C. Cifuentes-Diaz, E. Guillou, P. Belenguer, A. Lombes, and M. Rojo. 2005. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 6:853-859.

- Matthews, K.R. 2005. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.* 118:283-290.
- Michels, P.A., F. Bringaud, M. Herman, and V. Hannaert. 2006. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta.* 1763:1463-1477.
- 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.* 90:114-129.
- Morgan, G.W., D. Goulding, and M.C. Field. 2004. The single dynamin-like protein of *Trypanosoma brucei* regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis. *J Biol Chem.* 279:10692-10701.
- Niemann, M., S. Wiese, J. Mani, A. Chanfon, C. Jackson, C. Meisinger, B. Warscheid, and A. Schneider. 2013. Mitochondrial outer membrane proteome of *Trypanosoma brucei* reveals novel factors required to maintain mitochondrial morphology. *Mol Cell Proteomics.* 12:515-528.
- Nunnari, J., W.F. Marshall, A. Straight, A. Murray, J.W. Sedat, and P. Walter. 1997. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell.* 8:1233-1242.
- Osman, C., M. Haag, C. Potting, J. Rodenfels, P.V. Dip, F.T. Wieland, B. Brugger, B. Westermann, and T. Langer. 2009. The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *J Cell Biol.* 184:583-596.
- Otera, H., N. Ishihara, and K. Mihara. 2013. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta.* 1833:1256-1268.
- Otera, H., S. Ohsakaya, Z. Nagaura, N. Ishihara, and K. Mihara. 2005. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J.* 24:1375-1386.
- Povelones, M.L., C. Tiengwe, E. Gluenz, K. Gull, P.T. Englund, and R.E. Jensen. 2013. Mitochondrial shape and function in trypanosomes requires the outer membrane protein, TbLOK1. *Mol Microbiol.* 87:713-729.
- Priest, J.W., and S.L. Hajduk. 1994. Developmental regulation of *Trypanosoma brucei* cytochrome c reductase during bloodstream to procyclic differentiation. *Mol Biochem Parasitol.* 65:291-304.
- 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.* 137:1357-1392.
- Santel, A., S. Frank, B. Gaume, M. Herrler, R.J. Youle, and M.T. Fuller. 2003. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci.* 116:2763-2774.
- Sauvanet, C., S. Duvezin-Caubet, J.P. di Rago, and M. Rojo. 2010. Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin Cell Dev Biol.* 21:558-565.
- Sesaki, H., Y. Adachi, Y. Kageyama, K. Itoh, and M. Iijima. 2014. In vivo functions of Drp1: lessons learned from yeast genetics and mouse knockouts. *Biochim Biophys Acta.* 1842:1179-1185.

- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol.* 147:699-706.
- Signorell, A., E. Gluenz, J. Rettig, A. Schneider, M.K. Shaw, K. Gull, and P. Butikofer. 2009. Perturbation of phosphatidylethanolamine synthesis affects mitochondrial morphology and cell-cycle progression in procyclic-form *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* 72:1068-1079.
- Signorell, A., M. Rauch, J. Jelk, M.A. Ferguson, and P. Butikofer. 2008. Phosphatidylethanolamine in *Trypanosoma brucei* is organized in two separate pools and is synthesized exclusively by the Kennedy pathway. *J Biol Chem.* 283:23636-23644.
- Silva Ramos, E., N.G. Larsson, and A. Mourier. 2016. Bioenergetic roles of mitochondrial fusion. *Biochim Biophys Acta.* 1857:1277-1283.
- Soares Medeiros, L.C., L. South, D. Peng, J.M. Bustamante, W. Wang, M. Bunkofske, N. Perumal, F. Sanchez-Valdez, and R.L. Tarleton. 2017. Rapid, Selection-Free, High-Efficiency Genome Editing in Protozoan Parasites Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins. *MBio.* 8.
- Song, Z., M. Ghochani, J.M. McCaffery, T.G. Frey, and D.C. Chan. 2009. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell.* 20:3525-3532.
- Tamura, Y., T. Endo, M. Iijima, and H. Sesaki. 2009. Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria. *J Cell Biol.* 185:1029-1045.
- 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:e36619.
- van den Brink-van der Laan, E., J.A. Killian, and B. de Kruijff. 2004. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta.* 1666:275-288.
- van Hellemond, J.J., F.R. Opperdoes, and A.G. Tielens. 2005. The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans.* 33:967-971.
- Vanwalleghem, G., F. Fontaine, L. Lecordier, P. Tebabi, K. Klewe, D.P. Nolan, Y. Yamaryo- Botte, C. Botte, A. Kremer, G.S. Burkard, J. Rassow, I. Roditi, D. Perez-Morga, and E. Pays. 2015. Coupling of lysosomal and mitochondrial membrane permeabilization in trypanolysis by APOL1. *Nature communications.* 6:8078.
- Westermann, B. 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:872-884.
- 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.* 99:89-101.

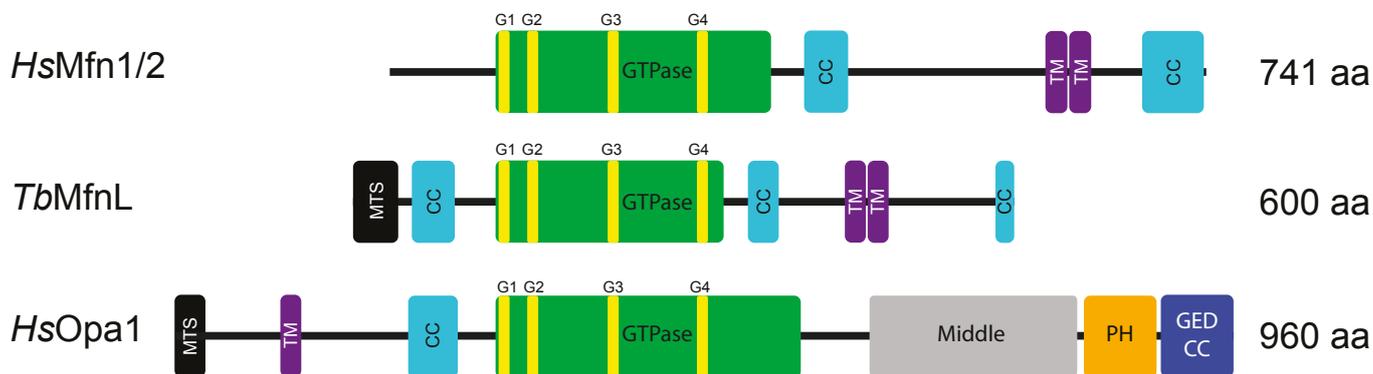


Figure 1 - Structure comparison between mitochondrial dynamin-related proteins (DRPs): Human mitofusin 1 or 2 (*HsMfn1/2*), *T. brucei* *TbMfnL*, and human *Opa1* (*HsOpa1*). MTS, predicted mitochondrial targeting sequence; CC, coiled-coil region; green box, GTPase domain with the four GTP-binding motifs in yellow; TM, transmembrane span; Middle, dynamin middle domain; PH, pleckstrin homology domain; GED, GTPase effector domain. Structure predictions were performed using PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Jones, 1999). More details and sequences alignment are available in Figure S1.

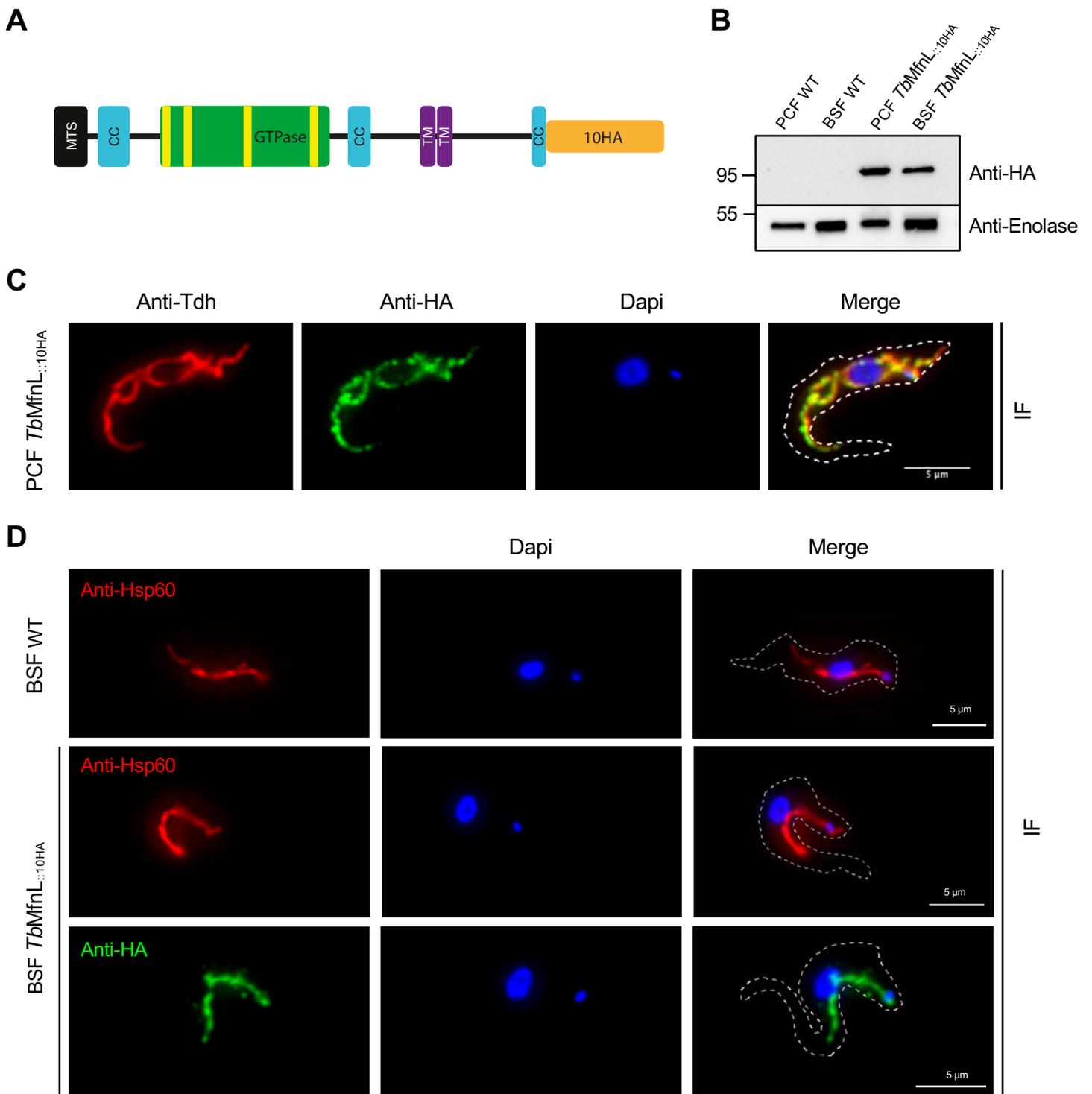


Figure 2 - Subcellular localization of *TbMfnL*. (A) Schematic representation of *TbMfnL* endogenously tagged its at C-terminus extremity with 10xHA. Only one of the two alleles is tagged. (B) Western blotting of whole-cell extracts (5×10^6 cells) of *T. brucei* PCF or BSF wild-type cells and PCF or BSF expressing *TbMfnL*::10HA cells revealed with an anti-HA antibody. It should be note that Enolase is about 3 to 4 time more expressed in BSF than PCF according to Hannaert *et al.* 2003. (C) Subcellular localization of *TbMfnL*::10HA in PCF. Colocalization of *TbMfnL*::10HA (anti-HA antibody) with matrix mitochondrial threonine dehydrogenase (Anti-Tdh antibody) analyzed by standard immunofluorescence. (D) Subcellular localization of *TbMfnL*::10HA in BSF. Matrix mitochondrial Heat shock protein 60 (Anti-Hsp60 antibody) was used to labelled the mitochondrial compartment in *TbMfnL*::10HA and wild-type cells.

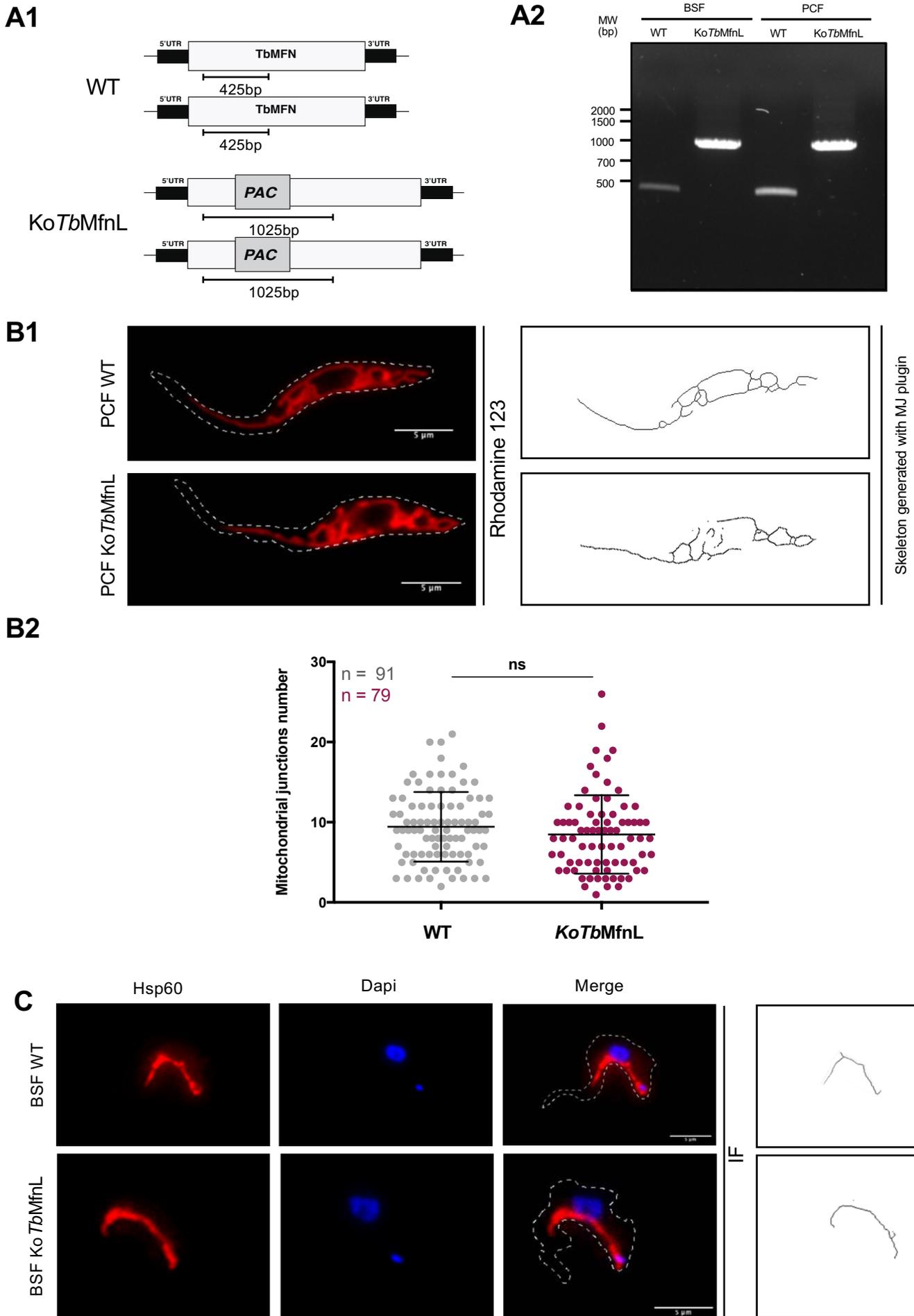


Figure 3 - Inactivation of the *TbMfnL* gene. (A1) Schematic representation of *TbMfnL* inactivation by insertion of the puromycin resistant marker (PAC). **(A2)** PCR confirmation of *TbMfnL* gene inactivation on both alleles in BSF and PCF. **(B1)** The mitochondrial shape of living WT and *KoTbMfnL* PCF cells (right panel) was designed by an ImageJ macro (MJ, Mitochondrial Junctions) from rhodamine 123 staining (left panel). **(B2)** Corresponding mitochondrial junctions quantification. **(C)** Antibody directed against Hsp60 was used to label and visualized mitochondrial shape in BSF cells. Top panel : BSF WT cell; bottom panel : BSF *KoTbMfnL* cell. Statistic : t test - Confidence interval 95% - P-value style : 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***) ; <0.0001 (****).

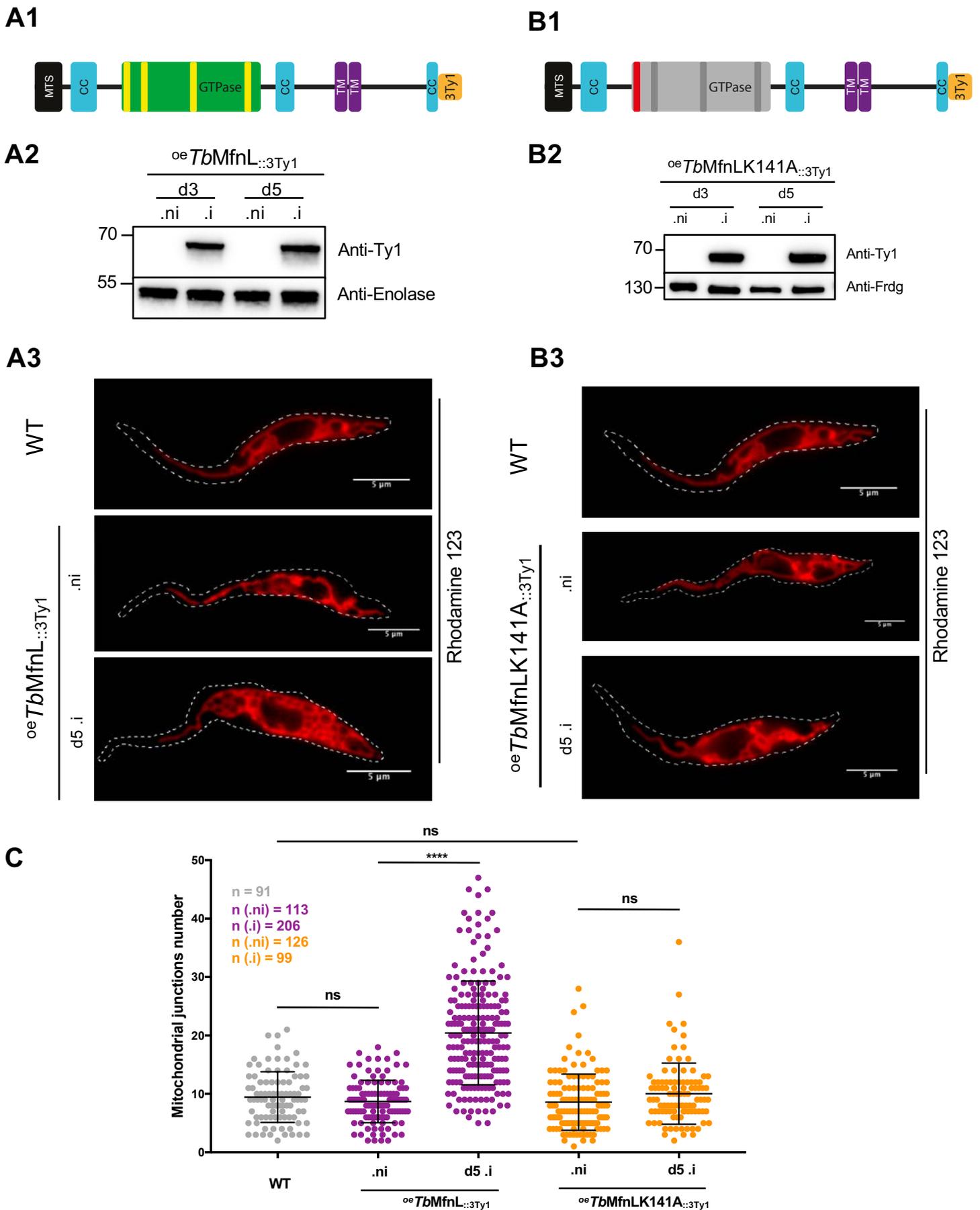


Figure 4 - Overexpression of *TbMfnL* and GTPase mutant. (A1) Schematic representation of overexpressing *TbMfnL* protein tagged with 3Ty1 peptide at C-terminus of the protein (oe*TbMfnL*::3Ty1). **(A2)** Western blotting of whole-cell extracts of *T. brucei* PCF overexpressing *TbMfnL*::3Ty1 cells. Not induced (ni) and induced (i) cells after 3 to 5 days (d3 and d5) were revealed with an anti-Ty1 antibody. Antibody directed against Enolase protein (Eno) was used as loading control. **(A3)** Mitochondrial structure analysis using rhodamine 123 staining on living cells; mitochondrial structure of PCF WT and PCF oe*TbMfnL*::3Ty1 cells before (ni) and 5 days after (i) tetracycline induction. **(B1)** Schematic representation of overexpressing *TbMfnL*K141A mutant protein tagged with 3Ty1 peptide at the C-terminus of the protein (oe*TbMfnL*K141A::3Ty1). **(B2)** Western blotting of whole-cell extracts of *T. brucei* PCF overexpressing *TbMfnL*K141A::3Ty1 cells; (ni) not induced and (i) induced cells for 3 or 5 days (d3 and d5). Antibody directed against glycosomal Fumarate reductase protein (Frdg) was used as loading control. **(B3)** Mitochondrial structure analysis using rhodamine 123 staining on living cells; mitochondrial structure of PCF WT and PCF oe*TbMfnL*K141A::3Ty1 cells before (ni) and 5 days after (i) tetracycline induction. **(C)** Quantification of mitochondrial junctions number using Rhodamine 123 microscopy images. Mitochondrial junctions number: WT, 9.4 ± 4.3 ; .ni oe*TbMfnL*::3Ty1 8.7 ± 3.6 ; .i oe*TbMfnL*::3Ty1 20.4 ± 8.9 ; .ni oe*TbMfnL*K141A::3Ty1 8.6 ± 4.8 and .i oe*TbMfnL*K141A::3Ty1 10 ± 5.2 . Statistic : t test - Confidence interval 95% - P-value style : 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***); <0.0001 (****).

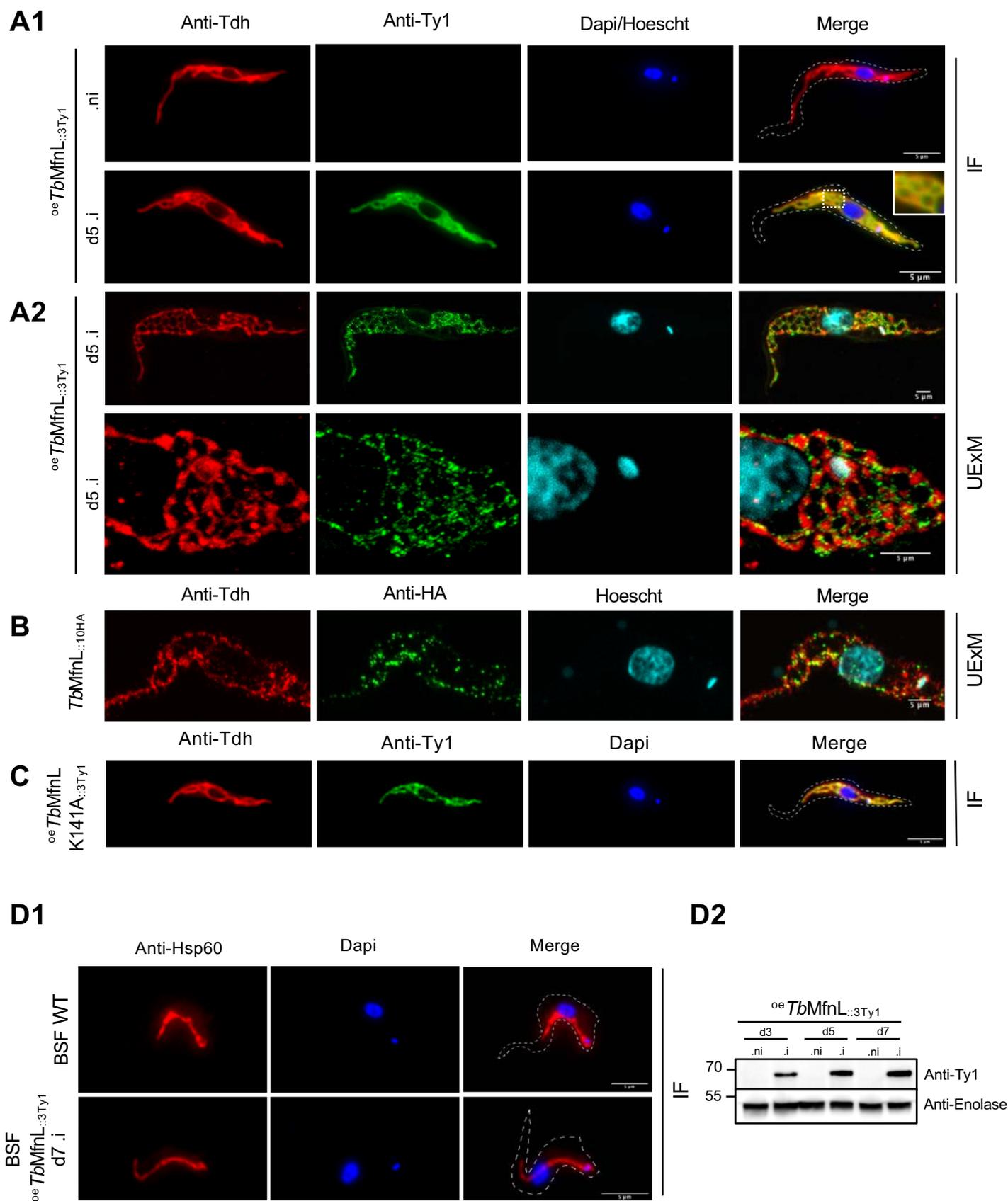


Figure 5 - Overexpression of *TbMfnL* and GTPase mutant. (A) Subcellular localization of *oeTbMfnL::3Ty1* in PCF by immunofluorescence and Ultra Expansion Microscopy (UEXM); Colocalization of *oeTbMfnL::3Ty1* (anti-Ty1 antibody) with matrix mitochondrial Threonine dehydrogenase (Anti-Tdh antibody) was analyzed by standard immunofluorescence (A1) and by UExM with an expansion factor of ~4.4 (A2), after 5 days induction (d5.i). (B) Subcellular localization of *TbMfnL::10HA* in PCF analyzed by UExM. (C) Subcellular localization of *oeTbMfnL K141A::3Ty1* in PCF analyzed by standard immunofluorescence. (D1) Western blotting of whole-cell extracts of *T. brucei* BSF overexpressing *TbMfnL::3Ty1* cells. Not induced (ni) and induced (i) cells after 3 to 7 days (d3, d5 and d7) were revealed with an anti-Ty1 antibody. Antibody directed against Enolase protein (Eno) was used as loading control. (D2) Subcellular localization of *oeTbMfnL::3Ty1* in BSF by immunofluorescence. Antibody directed against Hsp60 was used to label and visualized mitochondrial shape in wild type and *TbMfnL::3Ty1* overexpressing cells.

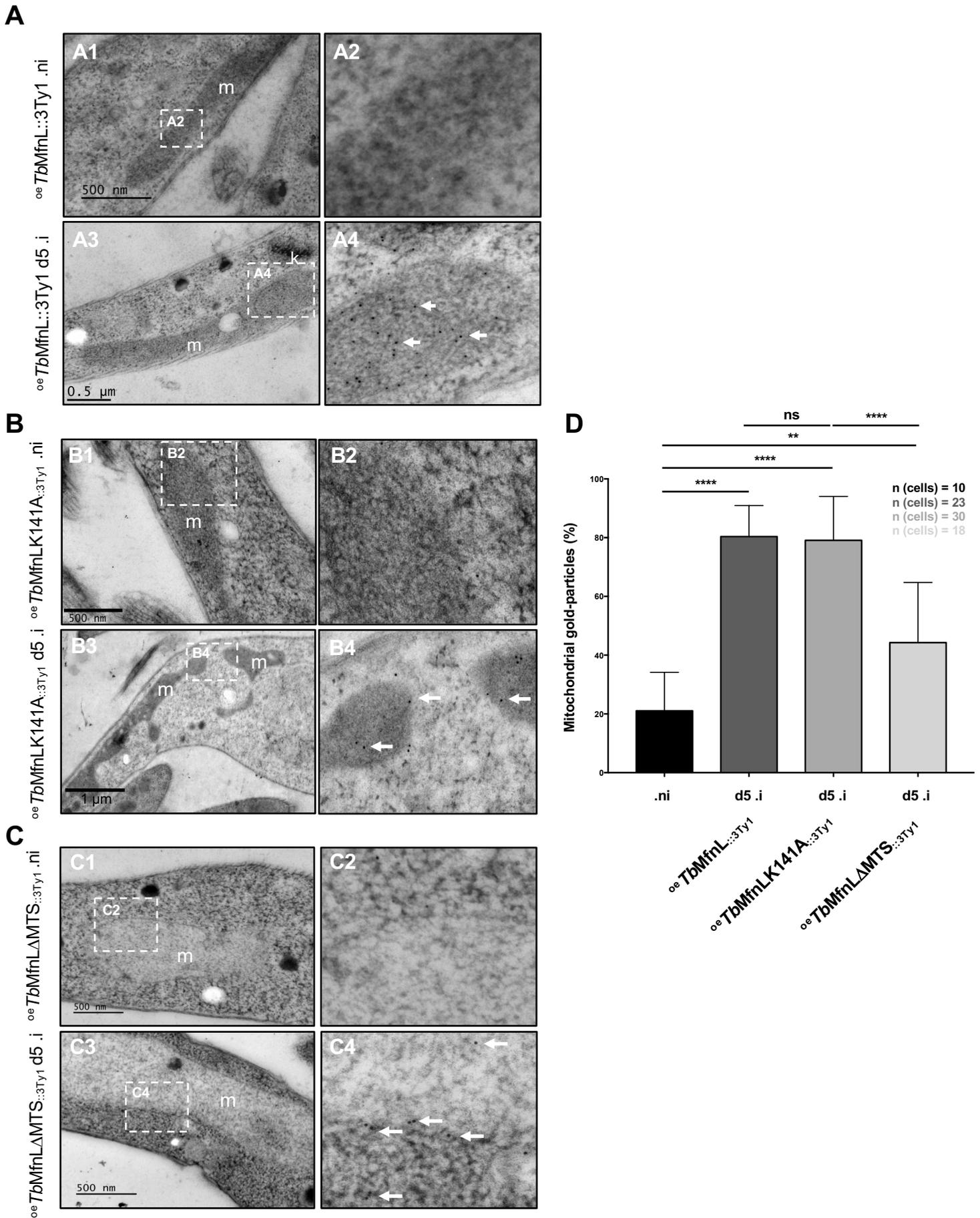


Figure 6 - Ultrastructural localization of *oeTbMfnL::3Ty1* by electron microscopy. Ultrastructural localization of *oeTbMfnL::3Ty1* (A), *oeTbMfnLK141A::3Ty1* (B) and *oeTbMfnLAMTS::3Ty1* (C) by electron microscopy in PCF. The cells were labelled with an anti-Ty1 antibody and an anti-mouse IgG-gold particle conjugate; black dots represent gold particles; Non induced cells (A1, B1 and C1) and 5 days induced cells (A3, B3 and C3); A2/A4, B2/B4, C2/C4, are magnification of A1/B1/C1 and A3/B3/C3 respectively. (D) Quantification of mitochondrial gold particles; for non-induced and induced *oeTbMfnL::3Ty1* cells, 221 and 3076 gold particles were counted respectively; for non-induced and induced *oeTbMfnLK141A::3Ty1* cells, 263 and 1123 gold particles were counted respectively and for non-induced and induced *oeTbMfnLAMTS::3Ty1* cells, 297 and 2297 gold particles were counted respectively. A mean of the non-induced cells from the three strains is represented on the graph. Statistic : t test - Confidence interval 95% - P-value style : 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***); <0.0001 (****).

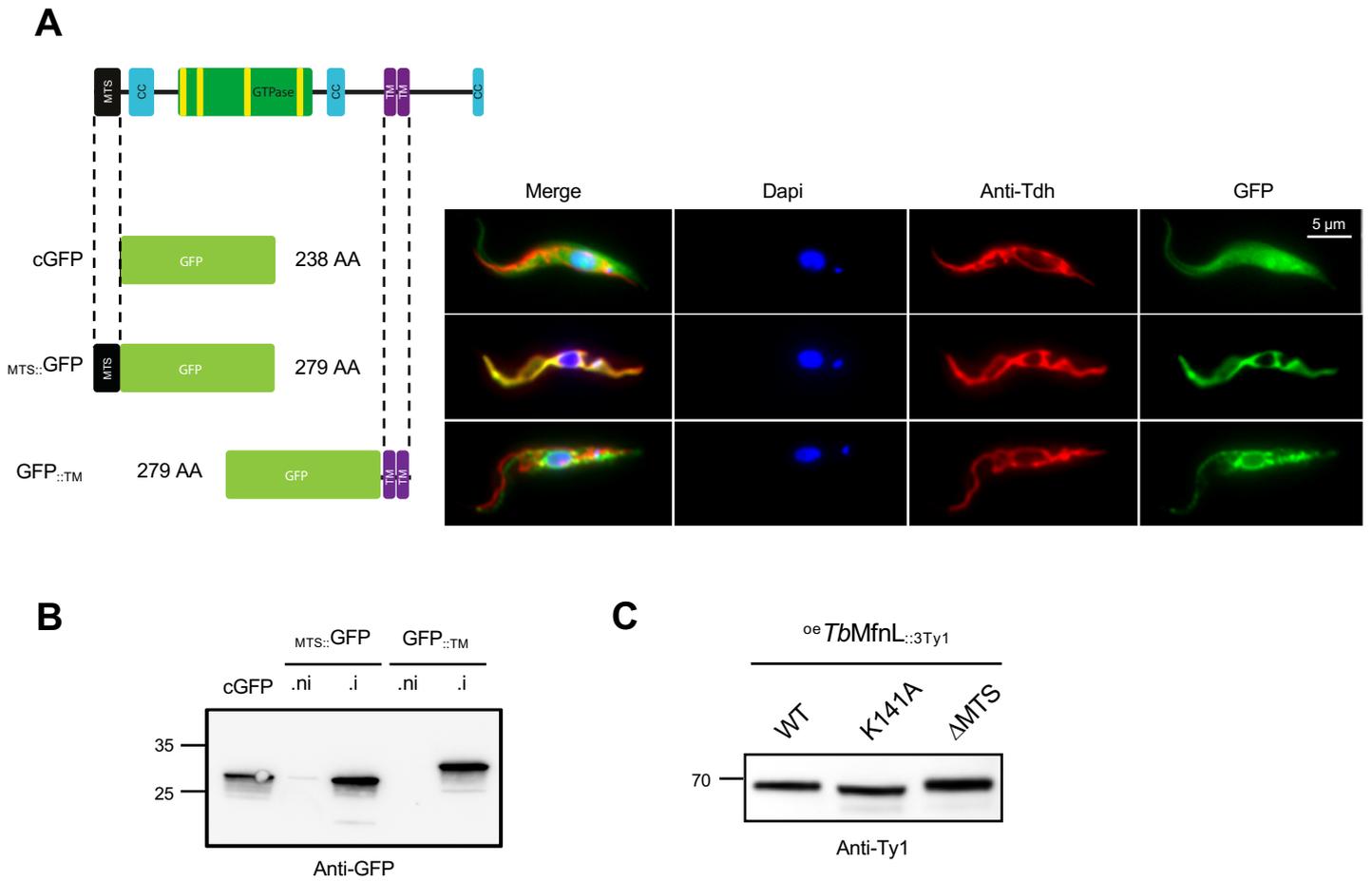


Figure 7 - Role of *TbMfnL* domains. (A) Localization of the GFP according to the different tags fused. Colocalization by standard immunofluorescence of GFP with matrix mitochondrial Threonine dehydrogenase (Anti-Tdh antibody) after 5 days induction. MTS, mitochondrial targeting signal; TM, transmembrane domains. **(B)** Western-blot analysis of GFP expression. cGFP, constitutive and cytosolic GFP. Not induced (ni) and induced (i) cells after 5 days. **(C)** *TbMfnL* size analysis by western-blot using anti-Ty1 antibody.

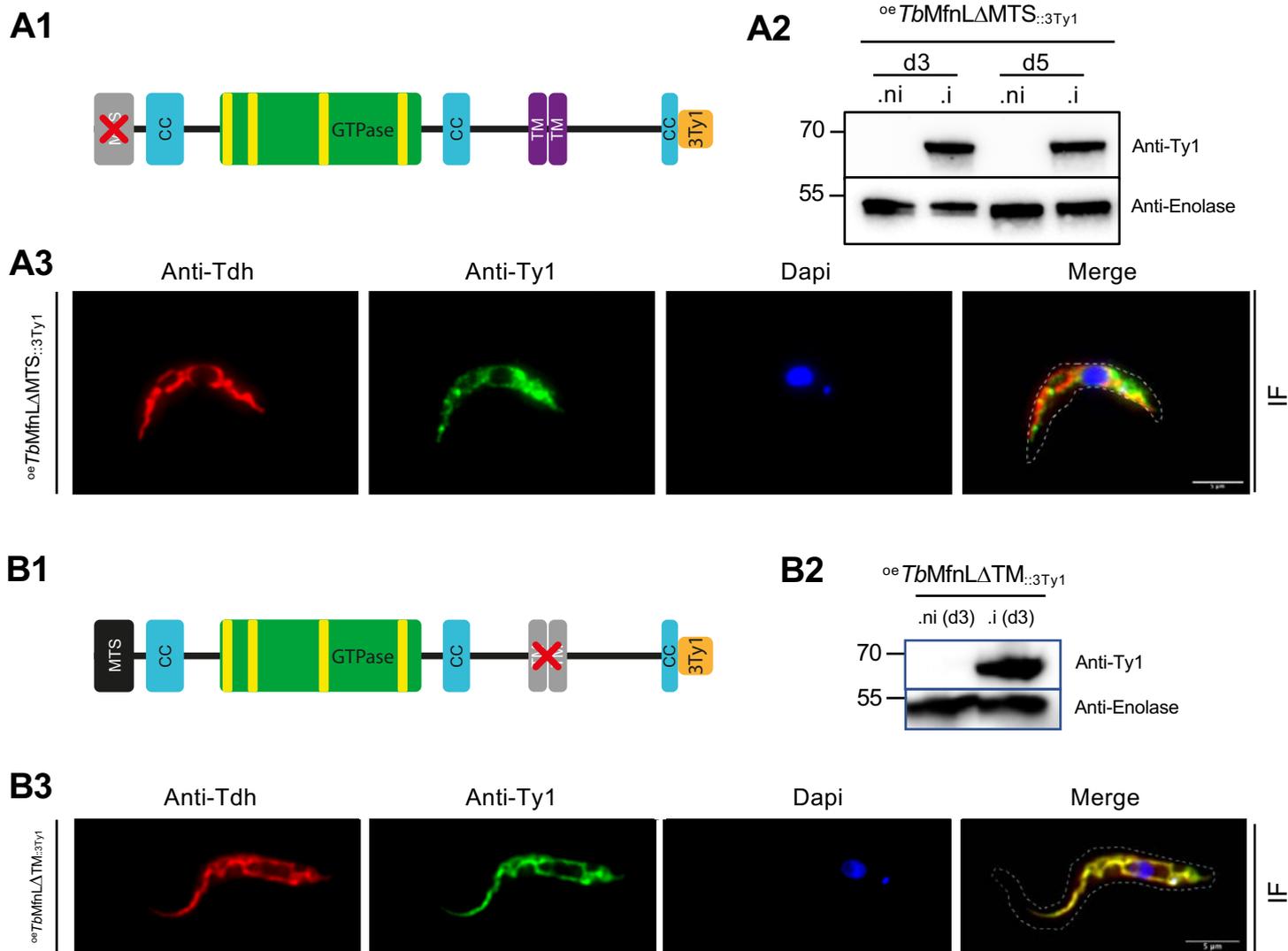
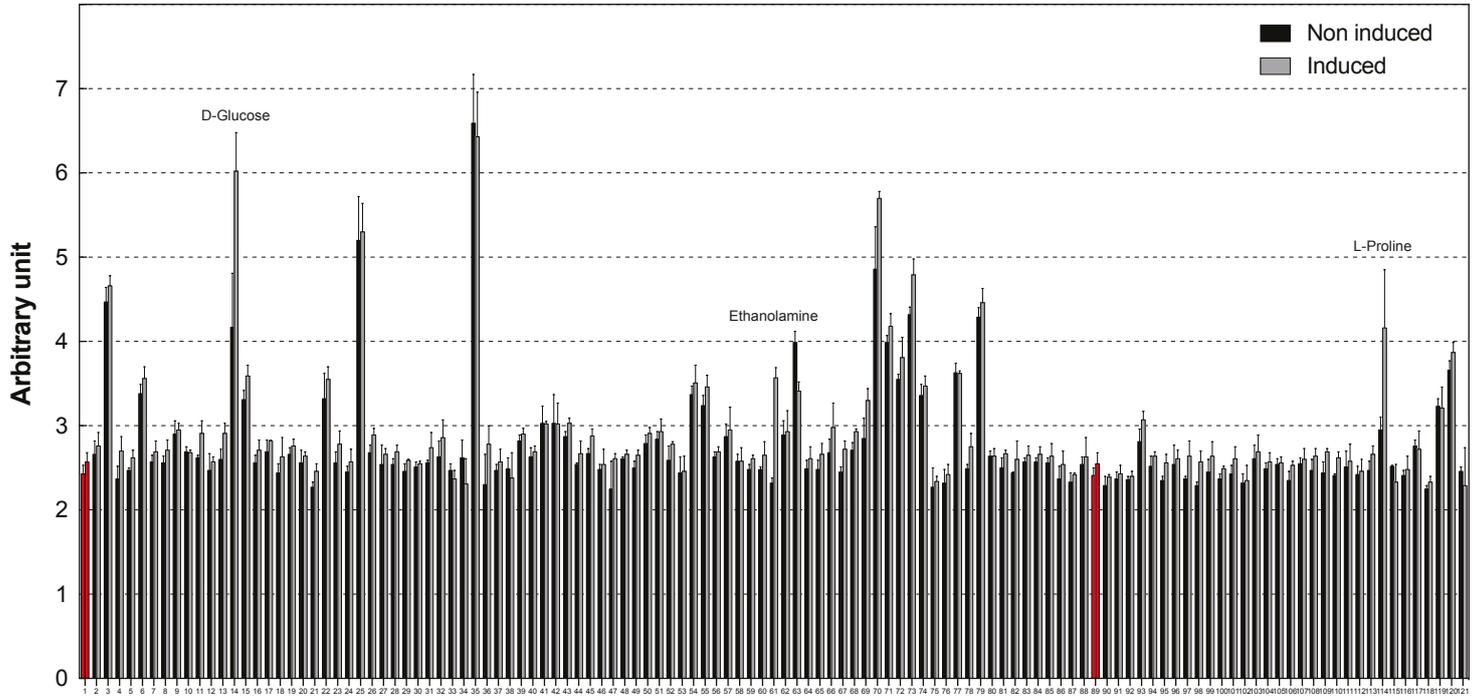


Figure 8 – Mitochondrial targeting sequence of *TbMfnL*. (A1) Schematic representation of N-terminus truncated *TbMfnL* protein (first 41 amino acids) tagged with 3Ty1 peptide at the C-terminus of the protein (*oeTbMfnLΔMTS::3Ty1*). (A2) Western blotting of whole-cell extracts of *T. brucei* PCF overexpressing *TbMfnLΔMTS::3Ty1* cells; (ni) not induced and (i) induced cells for 3 or 5 days (d3 and d5). (A3) Subcellular localization of *oeTbMfnLΔMTS::3Ty1* in PCF after 5 days induction. Colocalization of *oeTbMfnLΔMTS::3Ty1* (anti-Ty1 antibody) with matrix mitochondrial Threonine dehydrogenase (Anti-Tdh antibody) analyzed by standard immunofluorescence. (B1) Schematic representation of truncated transmembrane domains of *TbMfnL* protein (45 amino acids) tagged with 3Ty1 peptide at the C-terminus of the protein (*oeTbMfnLΔTM::3Ty1*). (B2) Western blotting of whole-cell extracts of *T. brucei* PCF overexpressing *TbMfnLΔTM::3Ty1* cells; (ni) not induced and (i) induced cells for 3 days. (B3) Subcellular localization of *TbMfnLΔTM::3Ty1* in PCF after 5 days induction, analyzed by standard immunofluorescence.

A



Carbon, energy and nitrogen sources

B

Nbr	Substrat	Significant	P value	Nbr	Substrat	Significant	P value	Nbr	Substrat	Significant	P value
1	Negative control	ns	>0,9999	41	Melibionnic acid	ns	>0,9999	81	b-Hydroxybutyric acid	ns	>0,9999
2	a-Cyclodextrin	ns	>0,9999	42	D-Melibiose	ns	>0,9999	82	g-Hydroxybutyric acid	ns	>0,9999
3	Dextrin	ns	>0,9999	43	D-Galactose	ns	>0,9999	83	Butyric acid	ns	>0,9999
4	Glycogen	ns	>0,9999	44	a-Methyl-D-Galactoside	ns	>0,9999	84	2,3-Butanediol	ns	>0,9999
5	Maltitol	ns	>0,9999	45	Methyl b-D-Galactoside	ns	>0,9999	85	3-Hydroxy-2-butanone	ns	>0,9999
6	Maltotriose	ns	>0,9999	46	N-Acetylneuraminic acid	ns	>0,9999	86	Propionic acid	ns	>0,9999
7	D-Maltose	ns	>0,9999	47	Pectin	ns	>0,9999	87	Acetic acid	ns	>0,9999
8	Trehalose	ns	>0,9999	48	Sedoheptulosan	ns	>0,9999	88	Hexanoic acid	ns	>0,9999
9	D-Cellobiose	ns	>0,9999	49	Thymidine	ns	>0,9999	89	Negative control	ns	>0,9999
10	Gentiobiose	ns	>0,9999	50	Uridine	ns	>0,9999	90	Tween 20	ns	>0,9999
11	D-Glucose-6-Phosphate	ns	>0,9999	51	Adenosine	ns	>0,9999	91	Tween 40	ns	>0,9999
12	a-D-Glucose-1-Phosphate	ns	>0,9999	52	Inosine	ns	>0,9999	92	Tween 80	ns	>0,9999
13	L-Glucose	ns	>0,9999	53	Adonitol	ns	>0,9999	93	Gelatin	ns	>0,9999
14	a-D-Glucose	****	<0,0001	54	L-Arabinose	ns	>0,9999	94	L-Alaninamide	ns	>0,9999
15	3-O-Methylglucose	ns	>0,9999	55	D-Arabinose	ns	>0,9999	95	L-Alanine	ns	>0,9999
16	a-Methyl-D-Glucoside	ns	>0,9999	56	b-Methyl-D-Xylopyranoside	ns	>0,9999	96	D-Alanine	ns	>0,9999
17	b-Methyl-D-Glucoside	ns	>0,9999	57	Xylitol	ns	>0,9999	97	L-Arginine	ns	>0,9999
18	Salicin	ns	>0,9999	58	myo-Inositol	ns	>0,9999	98	L-Asparagine	ns	>0,9999
19	D-Sorbitol	ns	>0,9999	59	i-Erythritol	ns	>0,9999	99	L-Aspartic acid	ns	>0,9999
20	N-Acetyl-D-Glucosamine	ns	>0,9999	60	Propylene Glycol	ns	>0,9999	100	D-Aspartic acid	ns	>0,9999
21	D-Glucosaminic acid	ns	>0,9999	61	Ethanolamine	***	0,0005	101	L-Glutamic acid	ns	>0,9999
22	D-Glucuronic acid	ns	>0,9999	62	D,L-a-Glycerol Phosphate	ns	>0,9999	102	D-Glutamic acid	ns	>0,9999
23	Chondroitin Sulfate C	ns	>0,9999	63	Glycerol	ns	0,96	103	L-Glutamine	ns	>0,9999
24	Mannan	ns	>0,9999	64	Citric acid	ns	>0,9999	104	Glycine hydrochloride	ns	>0,9999
25	D-Mannose	ns	>0,9999	65	Tricarballic acid	ns	>0,9999	105	L-Histidine	ns	>0,9999
26	a-Methyl-D-Mannoside	ns	>0,9999	66	D,L-Lactic acid	ns	>0,9999	106	L-Homoserine	ns	>0,9999
27	D-Mannitol	ns	>0,9999	67	D-Lactic acid Methyl Ester	ns	>0,9999	107	trans-4-Hydroxy-L-Proline	ns	>0,9999
28	N-Acetyl-D-Mannosamine	ns	>0,9999	68	Methyl pyruvate	ns	>0,9999	108	L-Isoleucine	ns	>0,9999
29	D-Melezitose	ns	>0,9999	69	Pyruvic acid	ns	>0,9999	109	L-Leucine	ns	>0,9999
30	Sucrose	ns	>0,9999	70	a-Ketoglutaric acid	ns	0,1615	110	L-Lysine	ns	>0,9999
31	L-Rhamnose	ns	>0,9999	71	Succinamic acid	ns	>0,9999	111	L-Methionine	ns	>0,9999
32	L-Fucose	ns	>0,9999	72	Succinic acid	ns	>0,9999	112	L-Ornithine	ns	>0,9999
33	D-Fucose	ns	>0,9999	73	Mono-Methylsuccinate	ns	0,9999	113	L-Phenylalanine	ns	>0,9999
34	D-Fructose-6-Phosphate	ns	>0,9999	74	L-Malic acid	ns	>0,9999	114	L-Proline	***	0,0009
35	D-Fructose	ns	>0,9999	75	D-Malic acid	ns	>0,9999	115	L-Serine	ns	>0,9999
36	Stachyose	ns	0,9997	76	m-Tartaric acid	ns	>0,9999	116	D-Serine	ns	>0,9999
37	D-Raffinose	ns	>0,9999	77	Lithium acetoacetate	ns	>0,9999	117	L-Threonine	ns	>0,9999
38	D-Lactitol	ns	>0,9999	78	g-Amino-N-Butyric acid	ns	>0,9999	118	D-Threonine	ns	>0,9999
39	Lactulose	ns	>0,9999	79	a-KetoButyric acid	ns	>0,9999	119	L-Tryptophan	ns	>0,9999
40	a-D-Lactose	ns	>0,9999	80	a-Hydroxybutyric acid	ns	>0,9999	120	L-Tyrosine	ns	>0,9999
								121	L-Valine	ns	>0,9999

Figure 9 - Carbon, energy and nitrogen sources used in cells over-expressing ^{oe}TbMfnL::3Ty1. (A) The metabolic pathway activities are assayed with a colorimetric reagent that measures redox energy produced when a cell oxidizes a substrate (Biolog Phenotype MicroArrays™). Non induced (black) and induced (grey) cells were incubated for 18 hours at 27°C with various substrates and redox production was measured by an endpoint absorbance at 590 nm. (B) List of the different substrates used. In orange, substrates with significant variations between non-induced and induced cells. Negative control (1 and 89) are labelled in red. Statistic : Two way ANOVA - Confidence interval 95% - P-value style : 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***); <0.0001 (****), n=3.

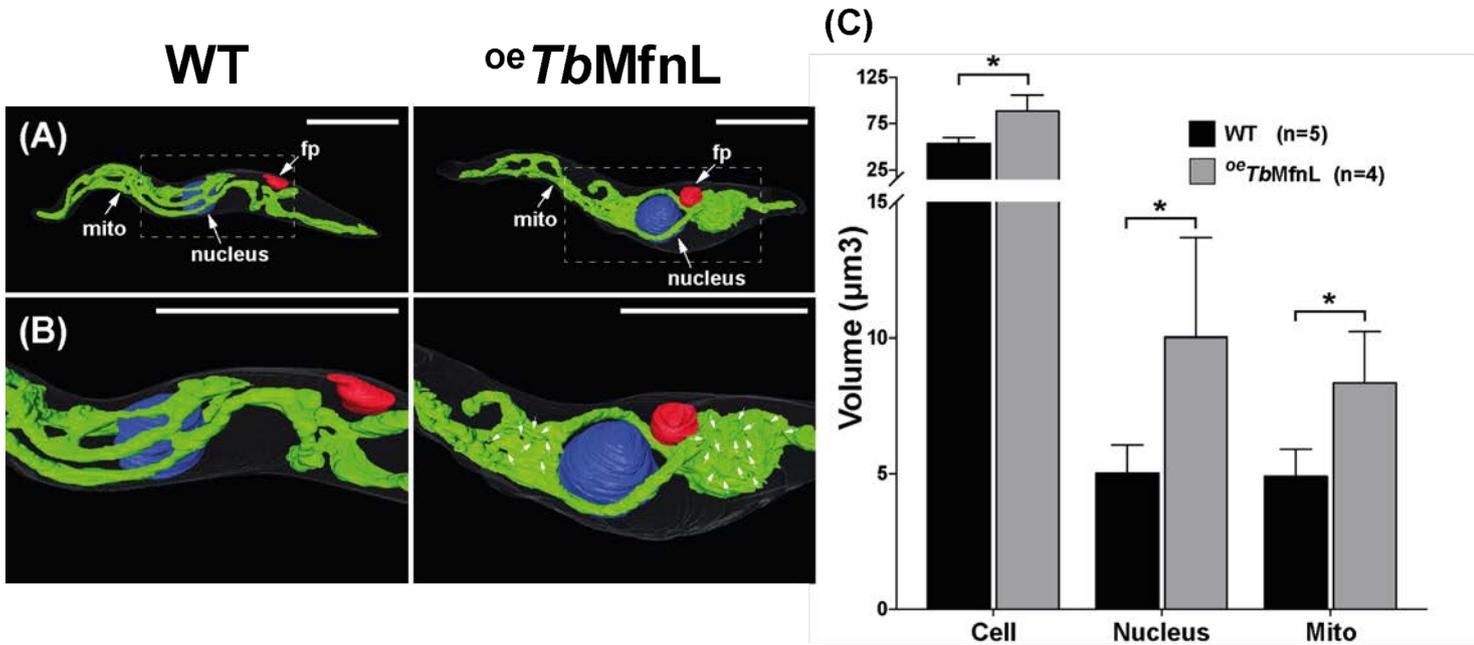


Figure 10 - Surface rendering of segmented PCF and determination of cell, nucleus and mitochondrion volumes. (A) Surface rendering of a segmented PCF showing the cell body (transparency), nucleus (blue), mitochondrion (green), and flagellar pocket (red). **(B)** Magnified view of the region boxed in A. Arrows indicate small gaps in the mitochondrial network. The scale bar represents 5 μm . **(C)** Changes in the mean volumes of the cell, nucleus and mitochondria. The n values are indicated on the right side of the legend. Volume in μm^3 , cell: WT 53.4±6.6, oeTbMfnL 88.6±17.5; nucleus: WT 5±1, oeTbMfnL 10±3.6 and mitochondrion: WT 4.9±1, oeTbMfnL 8.3±1.9. Statistic : t test - Confidence interval 95% - P-value style : 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***) ; <0.0001 (****).

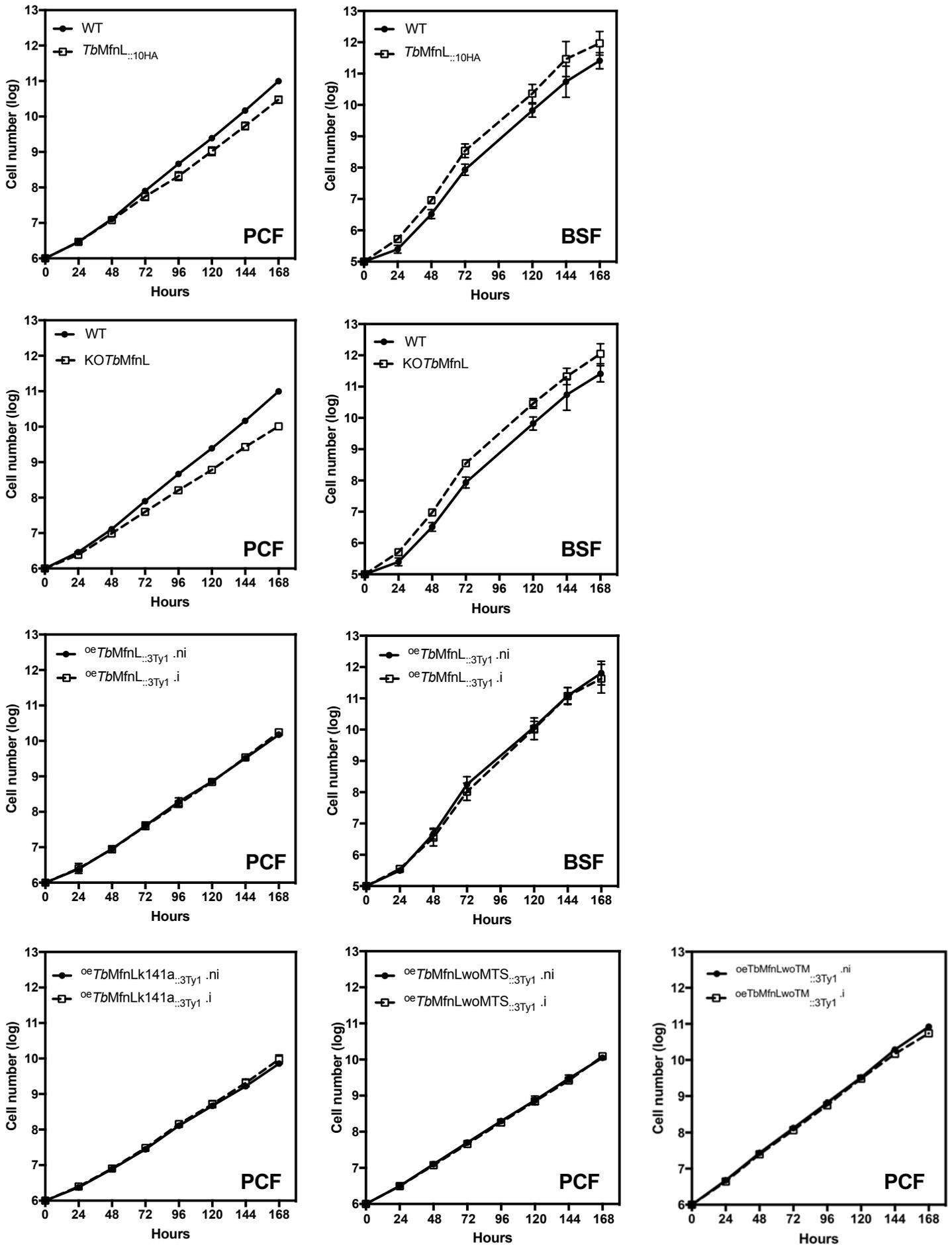


Figure S2 – Growth curves of parental, over-expressing and mutant cells. Cells were maintained in the exponential growth phase and cumulative cell numbers reflect normalization for dilution during cultivation. (.ni) non-induced and (.i) induced cells. PCF, procyclic forms ; BSF, bloodstream forms.

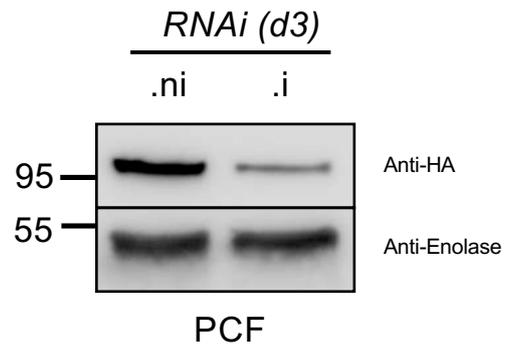


Figure S3 – Inhibition of *TbMfnL* expression. Time course inhibition of *TbMfnL* expression in PCF by RNA interference. Western-blot analysis of total extract (5×10^6 cells) from no-induced (.ni) and induced (.i) for 3 days.

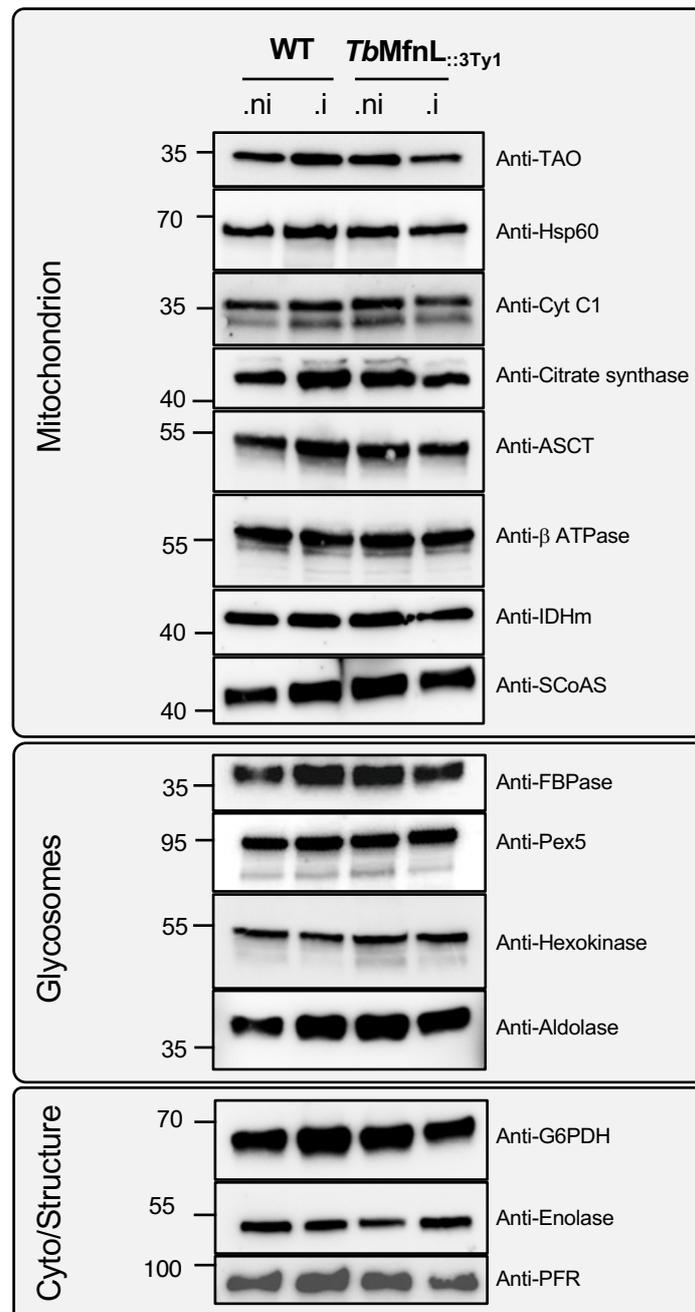


Figure S4 – Modification of cellular contents. Western blot analyses with the indicated immune sera of the WT and over-expressing *TbMfnL* cells upon tetracycline induction. TAO, alternative oxydase; Hsp60, mitochondrial heat shock protein; Cyt C1, cytochrome C1; ASCT, Acetate:succinate CoA-transferase; β-ATPase, subunit β of the mitochondrial ATP synthase; IDHm, mitochondrial isocitrate dehydrogenase; SCoAS, Succinyl-CoA synthetase; FBPase, fructose 1-6-biphosphatase; Pex5, peroxisome receptor; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PFR, paraflagellar rod.

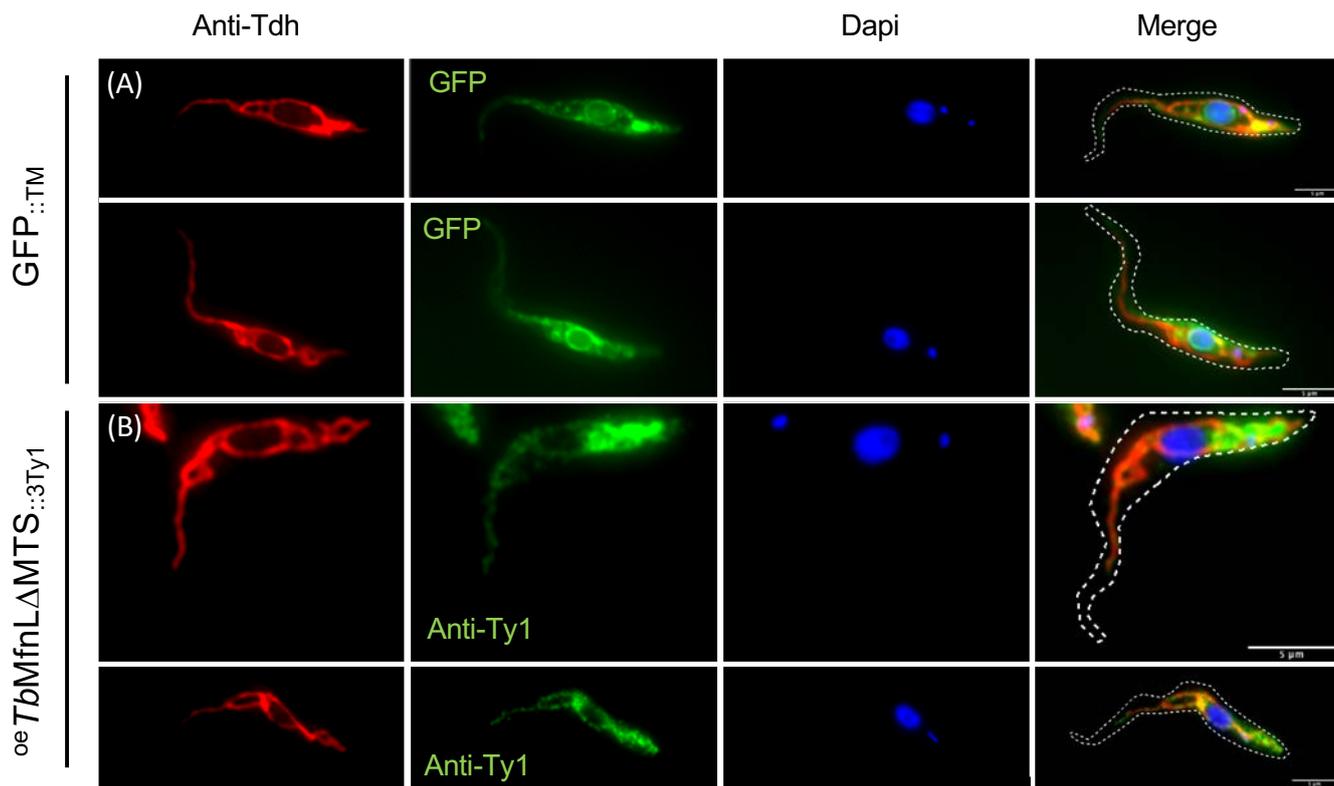


Figure S5 - Similar localization of GFP_{::TM} and oe*TbMfnLΔMTS*_{::3Ty1}. (A) Subcellular localization of GFP_{::TM} (anti-GFP antibody) and (B) oe*TbMfnLΔMTS*_{::3Ty1} (anti-Ty1 antibody) in PCF after 5 days induction. Colocalization with matrix mitochondrial Threonine dehydrogenase (Anti-Tdh antibody) analyzed by standard immunofluorescence. Two different images are shown for GFP_{::TM} and oe*TbMfnLΔMTS*_{::3Ty1}. The scale bar corresponds to 5 μm.

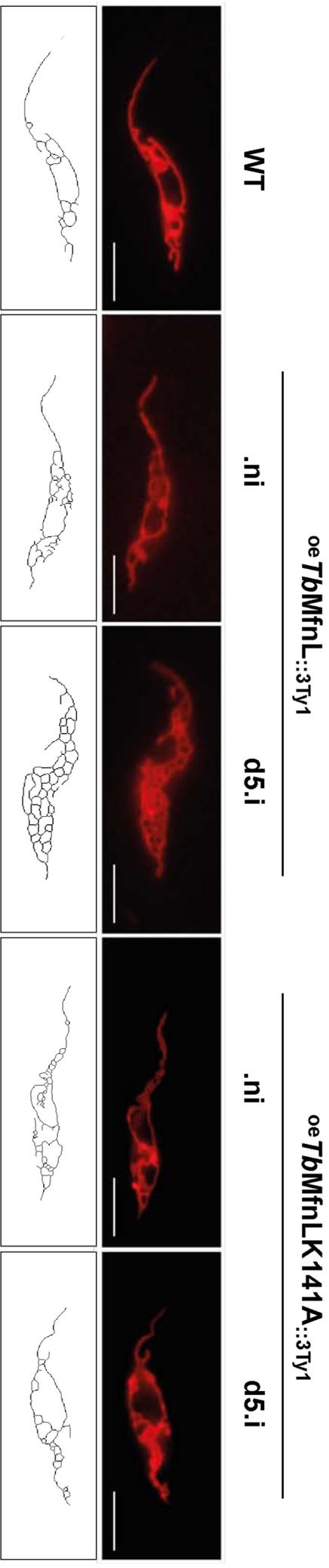


Figure S6 - Mitochondrial shape of PCF WT, *oeTbMfnL::3Ty1* and *oeTbMfnL K141A::3Ty1* cells. The top panel depicts live cells stained with rhodamine 123. Bottom panel was obtained using the ImageJ macro (MJ, Mitochondrial Junctions). The scale bar corresponds to 5 μm.

Supplemental

MMS1: Mitochondrial junctions (MJ) plugin for IMAGEJ

```
run("Duplicate...", "title=ORI duplicate channels=2");
run("Duplicate...", "title=Estfond");
run("Gaussian Blur...", "sigma=10");
imageCalculator("Divide create 32-bit", "ORI", "Estfond");
selectWindow("Result of ORI");
rename("OriCorr");
selectWindow("Estfond");
setAutoThreshold("Li dark");
run("Create Selection");
selectWindow("OriCorr");
run("Restore Selection");
run("Enlarge...", "enlarge=10 pixel");
setAutoThreshold("Li dark");
run("Analyze Particles...", "size=15-500 show=Masks");
rename("Mask");
run("Options...", "iterations=1 count=4 pad do=Open");
run("Duplicate...", "title=Skeleton");
setOption("BlackBackground", false);
run("Skeletonize");
run("Duplicate...", "title=Ends");
run("Options...", "iterations=1 count=7 pad do=Erode");
imageCalculator("Subtract create", "Skeleton", "Ends");
selectWindow("Result of Skeleton");
rename("Endpoints");
selectWindow("Skeleton");
run("Duplicate...", "title=Jonctions");
run("Options...", "iterations=1 count=6 pad do=Erode");
run("Analyze Particles...", "size=0-5000 summarize");
imageCalculator("Add create", "Endpoints", "Jonctions");
selectWindow("Result of Endpoints");
rename("Combo");
imageCalculator("Subtract create", "Skeleton", "Combo");
selectWindow("Result of Skeleton");
rename("Segments");
selectWindow("Combo");
close();
selectWindow("ORI");
setOption("ScaleConversions", true);
run("8-bit");
run("Merge Channels...", "c1=Jonctions c2=Endpoints c3=Segments c4=ORI create ignore"); close("\\Others");
```


Table S1

Name	Sequence	Used for
ET198	TTCGTGTTGCCAACTACAAGGTGAAAAATTTCTGCGAGCTGGTGAACGGCAACCCTGGGTAATGAGGTGAGGGTCAAAGGTTCTGGTAGTGGTTCC	Endotag
ET199	CATGCTCGGCAACCTAAGCATGATAGTCCGCGGTAAGAGCAAAAGAACCAGCGCCCAAGTAAATTTGCTTCCAACATTTCCAATTTGAGAGACCTGTGC	
ET160	CATAACGTTACCCACCACATCATCACTGAAGCGACTGTTGCGCAGAAGTCATGACCCGAGTACAAGCCCAAGGTTG	CRISPR/Cas9
ET161	TGTAGTAGTCGCAAAACACATGCGGTTAGTGAACAGTTGGCACCACTTCAGGCACCGGGCTTGGGGTTCATG	
ET211	ATTGACACTCCTATTCATTTGAATGATCGGACATCAGTTGAGGGTCAGCTATGACCCGAGTACAAGCCCAAGGTTG	
ET242	CACACCGTGAAGCAAAACACGTGTCACGGCGAACAGATCATACCCCTGTGACGGCACCGGGCTTGGGGTTCATG	
ET92	GCGGCCGAGGGTGGGTACGGCCCGG	
ET93	TCACCGTCAACCGCCGACGTCGAGG	
ET189	GATCAAGTCTCCACATCATCACTGAAGCGACTGT	RNAi
ET190	GATCCTCGAGGTTGGAGATACGCCGATCGCTGC	
ET191	GATCAAGTCTTCGAGCCTCGGTTATGTCGCTTCAACCAC	
ET192	GATCGGATCCCCACATCATCACTGAAGCGACTGT	
ET94	GATCCATATGGGATCCAAGCTTATGAGGCGAGTTAGGAAGTGCAG	7bMfnL
ET95	GATCGGTACCGCGCCGCTTAGATTATTTGACCCCTCACCTCATTACC	
ET96	GATCGGTACCTTAGATTTGACCCCTCACCTCATTACCCAG	
ET149	GAACCACAGCGCGGGAGCGTCTACGATGATTAATC	K141a
ET150	GATTAATCATCTGAGACGCTCCCGCGCTGTGGTTC	
ET197	GATCGCGCCGCAAGCTTCATATGGGTGCCAAGTCTGCTGACTAACC	ΔMTS
ET292	CCGGAAGATGAAGGTTAAGTCATTGGTTGACTTTG	ΔTM
ET293	CAAAGTCAACCAATGACTTAACCTTCATCTCCGG	

Table S2

Name	Species	Dilution	Source/Ref
Anti-Ty1	Mouse	WB 1:800	iMET lab
		IF 1:500	
		UEXm 1:250	
Anti-HA	Mouse	WB 1:1000	Biolegend
		IF 1:1000	
		UEXm 1:500	
Anti-Tdh	Rabbit	WB 1:500	iMET lab
		IF 1:200	
		UEXm 1:100	
Anti-Enolase	Rabbit	WB 1:100000	Gift from P. Michels, Edinburgh, UK
Anti-ATP synthase β subunit	Rabbit	WB 1:2000	Gift from A. Zikova, Czech Republic
Anti-Frdg	Rabbit	WB 1:50	iMET lab
Anti-Hsp60	Mouse	IF 1:500	iMET lab
Anti-TAO	Mouse	WB 1:100	Gift from M. Chaudhuri, USA
Anti-Cytochrome C1	Rabbit	WB 1:500	Gift from S.L. Hadjuk, USA
Anti-Citrate synthase	Rabbit	WB 1:2000	Gift from M. Boshart, Munich, Germany
Anti-ASCT	Rabbit	WB 1:500	iMET lab
Anti-IDHm	Rabbit	WB 1:500	Gift from M. Boshart, Munich, Germany
Anti-SCoAS	Rabbit	WB 1:1000	Gift from A. Zikova, Czech Republic
Anti-FBPase	Rabbit	WB 1:250	Gift from P. Michels, Edinburgh, UK
Anti-Pex5	Rabbit	WB 1:1000	Gift from P. Michels, Edinburgh, UK
Anti-Hexokinase	Rabbit	WB 1:5000	Gift from P. Michels, Edinburgh, UK
Anti-Aldolase	Rabbit	WB 1:10000	Gift from P. Michels, Edinburgh, UK
Anti-G6PDH	Rabbit	WB 1:1000	Gift from P. Michels, Edinburgh, UK
Anti-PFR	Mouse	WB 1:10000	Gift from K. Gull, Manchester UK
Anti-GFP	Rabbit	WB 1:1000	Abcam
Anti-ATOM	Rabbit	WB 1:10000	Gift from A. Schneider, Bern, Switzerland
		IF 1:1000	
		UEXm 1:500	
Anti-Mouse HRP	Goat	WB 1:5000	Bio-Rad
Anti-Rabbit HRP	Goat	WB 1:10000	Bio-Rad
Anti-Mouse Alexa Fluor 594	Donkey	IF 1:400	ThermoFisher
		UEXm 1:250	
Anti-mouse Alexa Fluor 488	Donkey	IF 1:400	ThermoFisher
		UEXm 1:250	
Anti-Rabbit Alexa Fluor 594	Donkey	IF 1:400	ThermoFisher
		UEXm 1:250	
Anti-Rabbit Alexa Fluor 488	Donkey	IF 1:400	ThermoFisher
		UEXm 1:250	

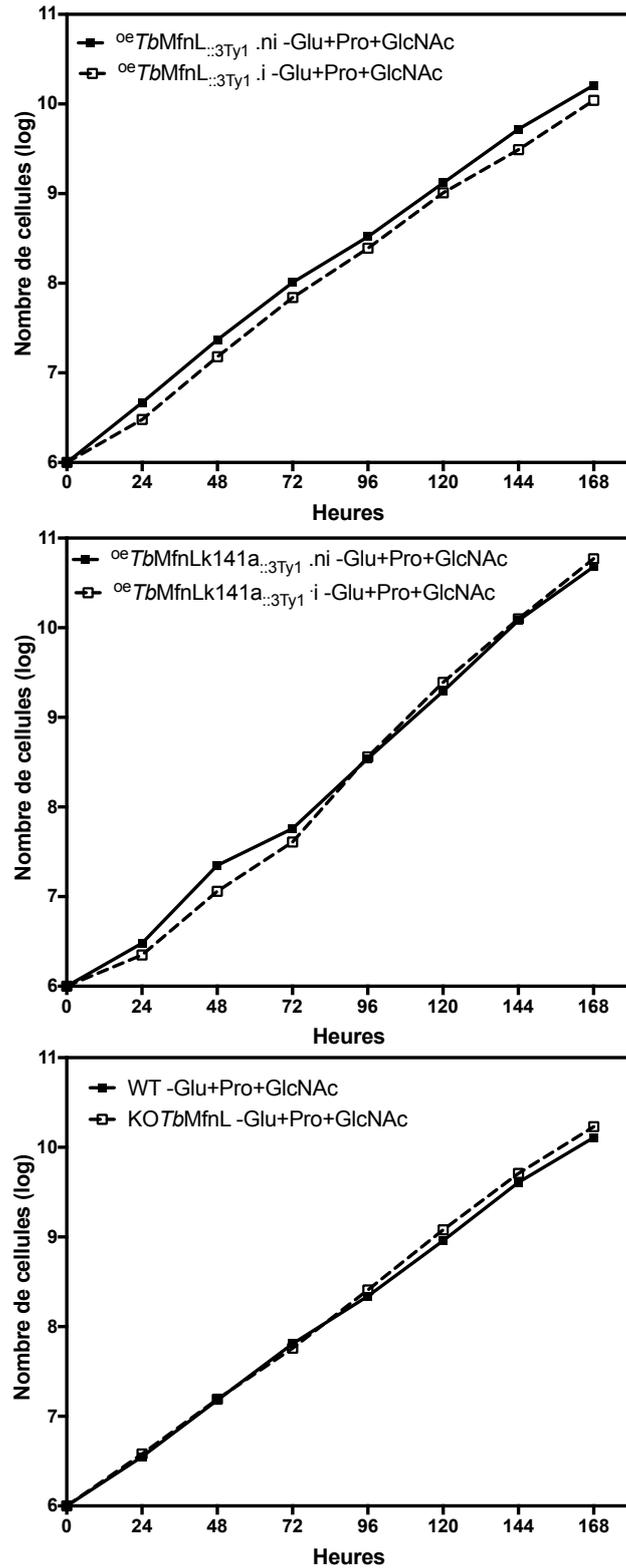


Figure 35 : Courbes de croissance en milieu dépourvu en glucose

Les cellules procycliques sauvages (WT), *KOTbmfnL*, *oeTbMfnL::3Ty1* et *oeTbMfnLk141a::3Ty1* non induites (.ni) et induites (.i) ont été cultivées dans un milieu riche en proline, sans glucose et en présence d'un inhibiteur du transport du glucose le N-acétylglucosamine (-Glu +Pro + GlcNAc) pendant 7 jours.

3.1.2. Analyse du métabolisme de ^{oe}*TbMfnL::3Ty1*

Nous avons montré que la modification de structure de la mitochondrie et plus globalement du parasite induit une modification du métabolisme avec une augmentation de l'utilisation/consommation du glucose, de la proline ainsi que de l'éthanolamine dans les parasites surexprimant *TbMfnL*. Ces observations nous ont conduit à étudier un peu plus en détail le métabolisme des parasites surexprimant *TbMfnL*. Pour cela nous avons cultivé ces parasites dans différentes conditions de culture et analysé d'une part la croissance cellulaire et d'autre part les flux métaboliques par RMN.

3.1.2.1. Croissance cellulaire

Contrairement à notre précédente étude où les parasites étaient cultivés en milieu riche en glucose (10 mM) et qu'aucune différence de croissance n'avait pu être observée dans les cellules sur-exprimant la protéine *TbMfnL*, nous avons choisi ici de cultiver, les formes procycliques dans un milieu dépourvu en glucose mais riche en proline. Ce milieu (SDM80+proline) présente l'avantage d'être plus proche des conditions de croissance du parasite retrouvées chez l'insecte vecteur. Ce milieu contient 5 mM proline, du sérum nécessaire à la croissance du parasite, et environ 0,5 mM glucose provenant du sérum. Afin que le parasite n'utilise pas ce glucose, nous ajoutons un inhibiteur du transporteur de glucose, le N-acétylglucosamine (Allmann et al. 2013).

Nous avons réalisé des courbes de croissance sur des souches de procycliques sauvages (WT), *KOTbMfnL*, ^{oe}*TbMfnL::3Ty1* et ^{oe}*TbMfnLk141a::3Ty1* non induites et induites sur 7 jours. ^{oe}*TbMfnL::3Ty1* et ^{oe}*TbMfnLk141a::3Ty1* après induction à la tétracycline et la souche *KOTbMfnL* ne présentent pas de phénotype de croissance par rapport à la souche sauvage (**Fig. 35**). Quelles que soient les conditions de culture utilisées, riche en glucose ou en proline, ces différents parasites ne présentent pas de défauts de croissance, suggérant que les altérations de la structure mitochondriale observée dans les cellules sur-exprimant *TbMfnL* n'impactent pas fortement la croissance du parasite. Il faut cependant noter qu'une modification du métabolisme chez le parasite pourrait ne pas impacter la croissance.

Afin de pouvoir étudier plus en détail si le métabolisme est perturbé chez ces parasites, nous avons entrepris une étude des flux métaboliques par RMN du proton.

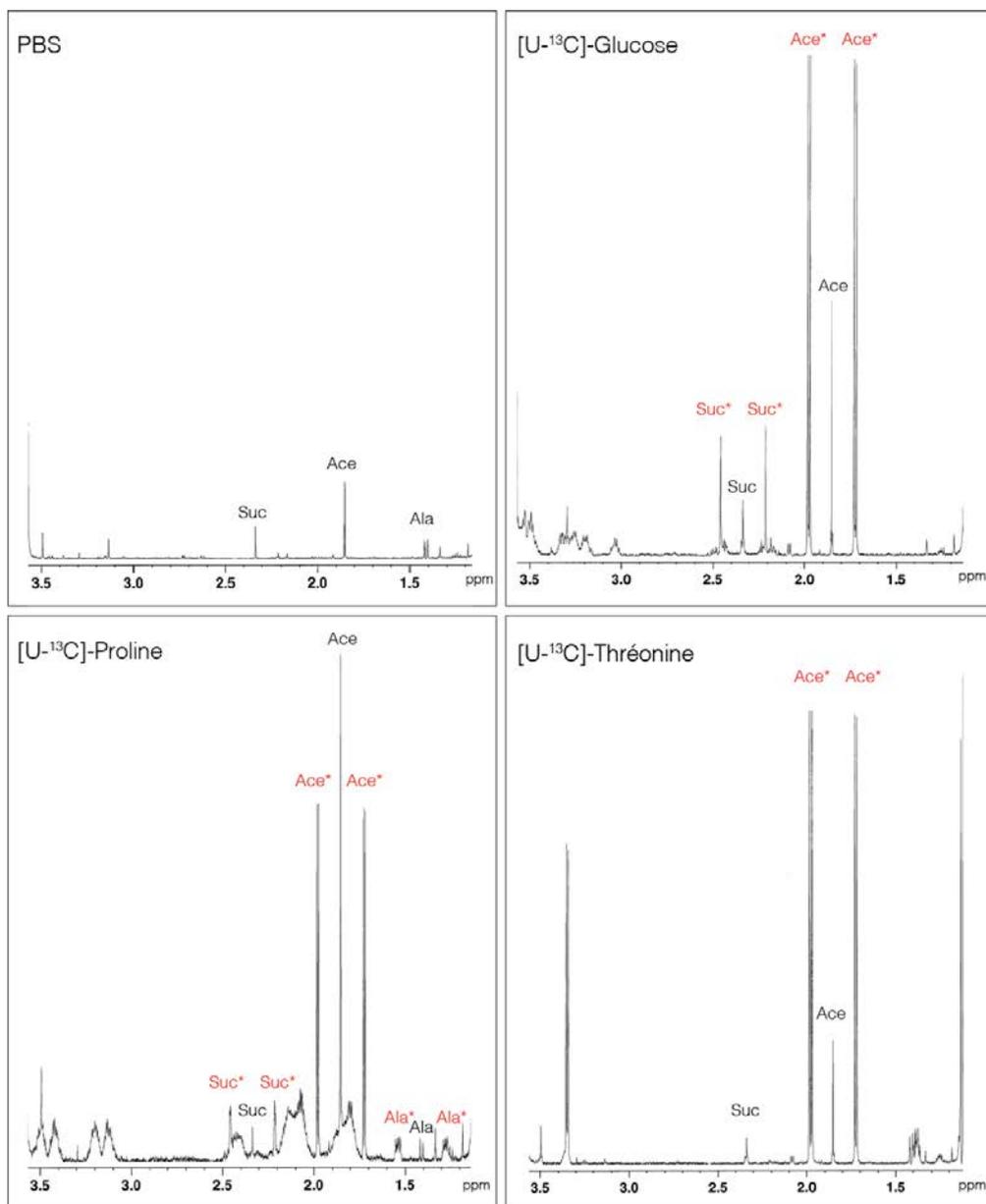


Figure 36 : Exemples des spectres obtenus par RMN du proton ($^1\text{H-NMR}$) des produits excrétés finaux provenant du métabolisme de la proline, du glucose et de la thréonine

Les spectres obtenus correspondent aux produits finaux excrétés par des parasites sauvages. Les cellules ont été cultivées dans un milieu riche en glucose puis elles ont été incubées pendant 6 heures en PBS sans source de carbone ou avec 1mM de $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -glucose ou 1mM de $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -proline ou 1mM de $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -thréonine. En rouge* sont indiqués les métabolites enrichis en ^{13}C . Ace, acétate ; Suc, succinate ; Ala, alanine ; ppm, partie par million.

3.1.2.2. Analyse des flux métaboliques par RMN

Une manière d'étudier les flux métaboliques chez les trypanosomes est de regarder ce qu'ils excrètent dans le milieu. L'analyse des produits finaux excrétés par RMN du proton est une technique bien maîtrisée dans le laboratoire. Par cette approche nous pouvons avoir une image relativement fiable des voies principales du métabolisme et surtout une quantification des produits excrétés (Mazet et al. 2013; Millerioux et al. 2018; Villafray et al. 2021). Grâce à l'utilisation de sources de carbones enrichies en carbone ^{13}C , nous pouvons suivre l'incorporation du ^{13}C dans les produits finaux excrétés. Pour cette étude, et en fonction des résultats obtenus par l'approche Biolog, nous avons choisi d'utiliser du [U- ^{13}C]-Glucose, de la [U- ^{13}C]-Proline et de la [U- ^{13}C]-Thréonine qui est impliquée dans la production d'acétate, source des acides-gras chez ces parasites. N'ayant pas de [U- ^{13}C]-Ethanolamine, nous n'avons pas pu la tester.

Nous avons étudié le métabolisme chez des procycliques sauvages (WT), *KO TbMfnL* et *oe TbMfnL::3TY1* non induits et induits sur 5 jours en culture dans un milieu SDM80 contenant 10% de sérum, du glucose (10 mM) et de la proline (5 mM) et un milieu SDM80 contenant 10% de sérum et uniquement de la proline (5 mM) et du N-acétylglucosamine. Les cellules sont incubées pendant 6 heures dans du PBS NaHCO_3 en présence de 1 mM d'une source de carbone enrichie en carbone ^{13}C ([U- ^{13}C]-Glucose, [U- ^{13}C]-Proline ou [U- ^{13}C]-Thréonine), puis les cellules sont séparées du milieu d'incubation par centrifugation. Les milieux d'incubation contenant les produits finaux excrétés sont analysés par RMN du proton au RMSB par notre collaborateur Marc Biran. L'ensemble des résultats est obtenu sous forme de spectre (**Fig. 36**), les produits ^{12}C et ^{13}C identifiés sont par la suite quantifiés.

Le succinate, l'acétate et l'alanine sont les trois produits excrétés retrouvés en majorité. L'ensemble des résultats suivants n'ont été réalisés qu'une seule fois et nécessiteront d'être reproduits pour conclure définitivement, mais nous pouvons quand même interpréter cette première expérience.

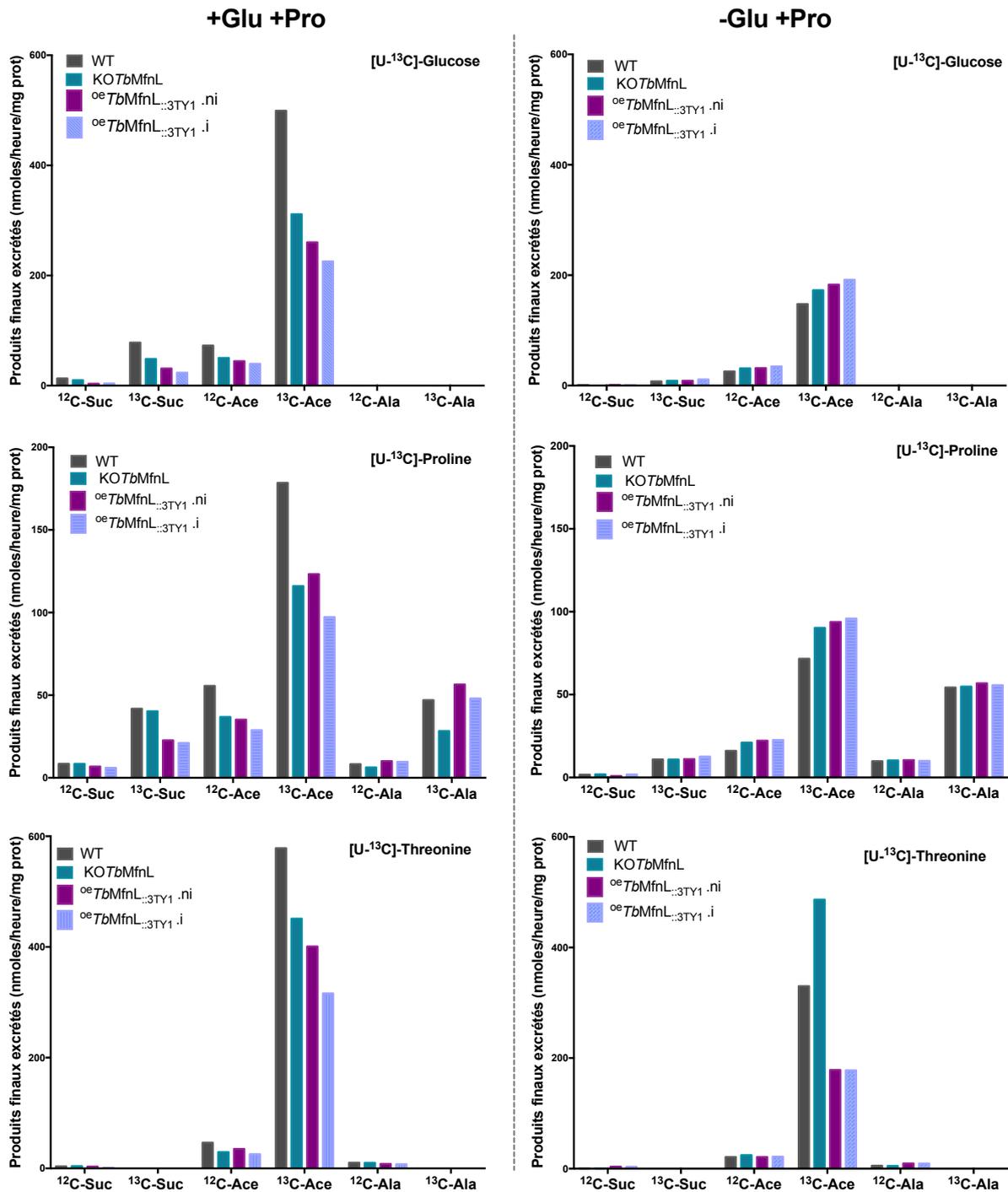


Figure 37 : Analyse par RMN du proton (¹H-NMR) des produits excrétés finaux provenant du métabolisme de la proline, du glucose et de la thréonine

Les cellules sauvages (WT), KO *TbMfnL* et *oe TbMfnL::3TY1* non induites (.ni) et induites pendant 5 jours (.i) ont été cultivées dans un milieu riche en glucose et proline (+glu +pro) ou un milieu dépourvu de glucose, riche en proline et contenant un inhibiteur du transport du glucose ; du N-acétylglucosamine (-glu +pro + GlcNAc). Les cellules (2.10⁷) sont incubées pendant 6 heures avec 1mM de [U-¹³C]-proline ou 1mM de [U-¹³C]-glucose ou 1mM de [U-¹³C]-thréonine puis les produits finaux sont analysés par RMN du proton. Les quantités des différents produits sont exprimées en nmoles/heure/mg de protéines. Pour chaque métabolite, est représentée la quantification des produits ¹²C et ¹³C. Suc, succinate ; ace, acétate ; ala, alanine.

Dans les deux conditions de cultures testées, en présence ou absence de glucose et présence de proline ; le glucose est majoritairement converti en acétate et en succinate, la proline est convertie en acétate, en succinate et en alanine et la thréonine est convertie uniquement en acétate (**Fig. 37**).

- Dans le milieu riche en glucose : il y a une plus grande quantité d'acétate excrétée pour les trois sources de carbone par la souche sauvage en comparaison avec les autres.
- Dans le milieu dépourvu en glucose : l'incorporation de glucose ^{13}C est liée à l'absence de N-acétylglucosamine durant les 6 heures d'incubation. Étonnamment, il y a une quantité plus importante d'acétate provenant de la thréonine dans le KO*TbMfnL* en comparaison avec les autres souches. Pourquoi le Ko*TbMfnL* excrète-t-il d'avantage d'acétate provenant de la thréonine dans des conditions sans glucose ? De plus amples expériences seront nécessaires pour répondre à cette question.
- En comparaison des deux milieux : nous pouvons observer une faible diminution de l'acétate ^{13}C lors de l'utilisation de [U- ^{13}C]-Thréonine et de [U- ^{13}C]-Proline dans le milieu dépourvu de glucose en comparaison avec celui riche en glucose.

Dans les différentes conditions de culture testées, la surexpression de *TbMfnL* n'induit pas d'effet majeur sur les produits excrétés finaux. Il semble donc y avoir une augmentation de l'utilisation/consommation du glucose et de la proline sans augmentation de l'excrétion de leurs produits finaux. Des expériences de métabolomique, permettant une analyse complète des métabolites présents à l'intérieur du parasite seraient un atout supplémentaire dans l'analyse du flux métabolique de ces lignées cellulaires.

3.1.3. Localisation de $^{oe}TbMfnL::3Ty1$ dans les membranes mitochondriales

TbMfnL est localisée dans les membranes de la mitochondrie. La présence d'un MTS en N-terminal de la protéine *TbMfnL* qui est fonctionnel et clivé suggère fortement que la protéine est transportée au moins jusqu'à la membrane interne de la mitochondrie. En plus du MTS, nous avons pu montrer que cette protéine possède deux domaines transmembranaires en C-terminal qui sont nécessaires à sa fonction et également requis pour une correcte localisation mitochondriale de la protéine. Ces domaines permettraient un ancrage dans les membranes après passage de la protéine au travers des translocases.

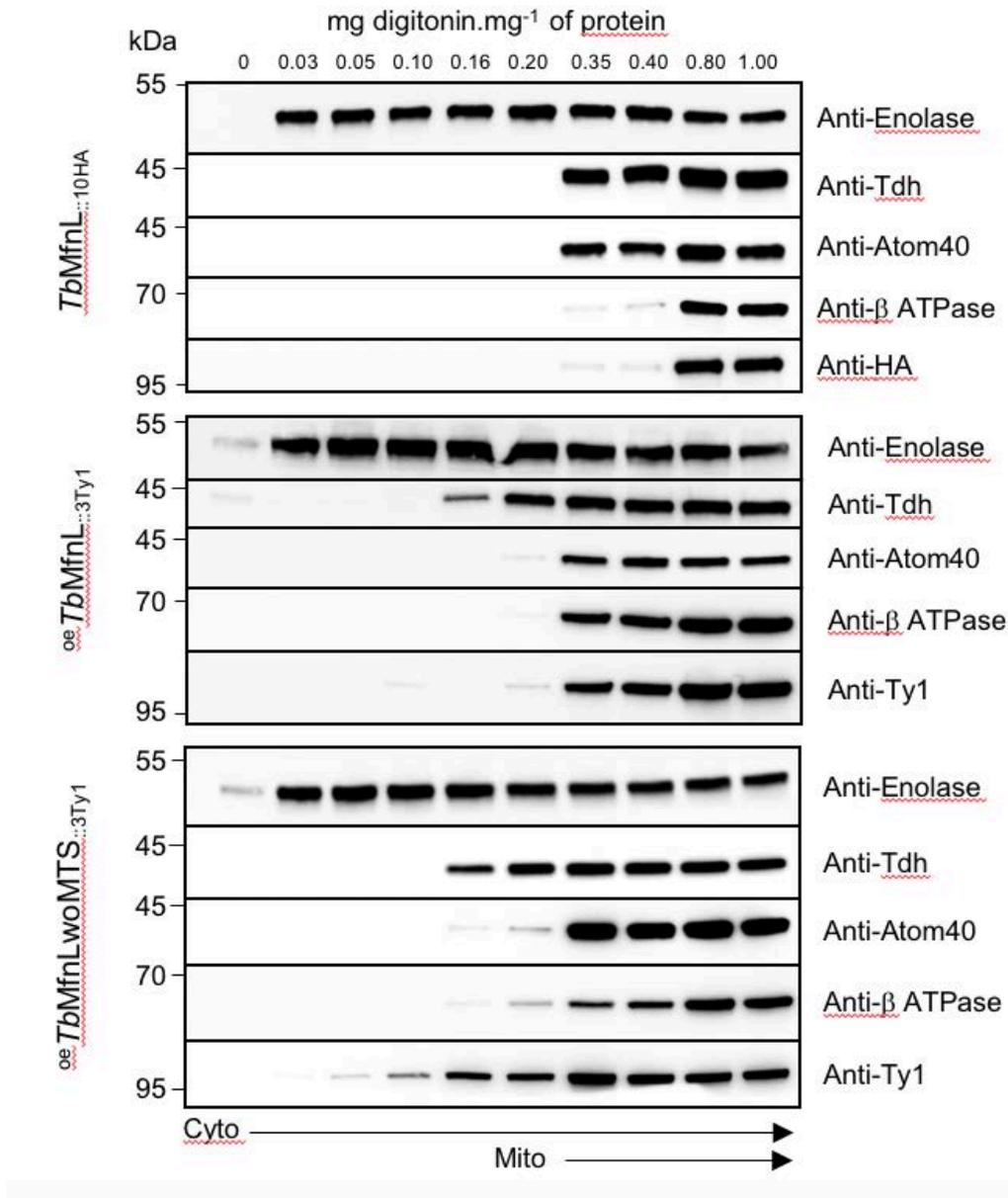


Figure 38 : Localisation subcellulaire de *oeTbMfnL::3Ty1*, *oeTbMfnLΔMTS::3Ty1* et *TbMfnL::10HA* par perméabilisation à la digitonine

oeTbMfnL::3Ty1 et *oeTbMfnLΔMTS::3Ty1* ont été induits à la tétracycline pendant 3 jours. $3 \cdot 10^8$ cellules (correspondant à 1 mg de protéines) ont été incubées avec des concentrations croissantes de digitonine de 0 à 1 mg de digitonine / mg de protéines. Les surnageants obtenus après perméabilisation à la digitonine sont migrés sur gel SDS-PAGE. Les localisations subcellulaires de trois lignées cellulaires *oeTbMfnL::3Ty1*, *oeTbMfnLΔMTS::3Ty1* et *TbMfnL::10HA* ont été effectuées par western blot avec différents anticorps dirigés contre des marqueurs des compartiments mitochondriaux : la sous-unité β de l'ATP synthase, TDH, ATOM40 et l'énolase ainsi que Ty1 ou HA. L'ATP synthase est un marqueur de la membrane interne, TDH de la matrice, ATOM40 de la membrane externe et l'énolase du cytosol. Cyto, cytosol ; mito, mitochondrie.

Ces domaines pourraient également permettre l'ancrage dans la membrane externe de la mitochondrie de la même manière que pour *HsMfn*. Il est donc envisageable que *TbMfnL* présente une double localisation, une partie se localisant dans la membrane externe et l'autre dans la membrane interne. La présence de ces particularités nous amène à nous poser la question de sa localisation à l'intérieur des membranes mitochondriales.

Dans le but de préciser la localisation de *TbMfnL*, nous avons effectué des expériences de perméabilisation à la digitonine. Cette méthode nous permet d'extraire les protéines des différents compartiments cellulaires de manière séquentielle par différentes quantités de digitonine. Aux plus faibles concentrations, la digitonine agit en premier sur la membrane plasmique, permettant l'extraction des protéines cytosoliques mais pas les protéines des organelles. A de plus fortes concentrations en digitonine, en plus des protéines cytosoliques, les protéines des membranes des organelles commencent à être extraites. Ainsi, en jouant sur les concentrations en digitonine, nous devrions extraire les protéines des différents compartiments de la mitochondrie (membrane externe, membrane interne et matrice) ce qui devrait nous permettre de préciser la localisation de *TbMfnL*.

Les cellules sont incubées en présence de quantités croissantes de digitonine de 0 à 1 mg de digitonine/ mg de protéine puis centrifugées afin de séparer les fractions solubles des fractions insolubles. Les fractions solubles sont ensuite analysées par western blot. Pour identifier les différents compartiments nous avons utilisé plusieurs marqueurs : l'énolase comme marqueur du cytosol, Tdh comme marqueur de la matrice, Atom comme marqueur de la membrane externe et la sous-unité β de l'ATP synthase comme marqueur de la membrane interne.

L'énolase est retrouvée dans la fraction soluble des plus faibles concentrations en digitonine dès la perméabilisation de la membrane plasmique, puis séquentiellement, nous retrouvons Tdh, suivi d'Atom et enfin l'ATP synthase. Il est à noter que Atom et l'ATP synthase sont retrouvés aux mêmes concentrations en digitonine mais tandis que l'intensité de la bande de Atom est maximale aux concentrations 0,35/0,4 mg de digitonine/mg de protéine, l'intensité de la bande de l'ATP synthase reste plus faible. Il faut des concentrations plus élevées en digitonine pour extraire l'ATP synthase de la membrane interne (**Fig. 38**).

Pour localiser *TbMfnL*, nous avons utilisé trois lignées cellulaires ; *TbMfn::10HA*, ^{oe}*TbMfn::3Ty1* et ^{oe}*TbMfnΔMTS::3Ty1*. *TbMfn::10HA* et ^{oe}*TbMfn::3Ty1* sont retrouvées aux mêmes concentrations en digitonine que les protéines mitochondriales. ^{oe}*TbMfnΔMTS::3Ty1* est par contre retrouvée à des concentrations plus faibles en digitonine, elle est détectée avant les protéines mitochondriales, presque comme l'énolase.

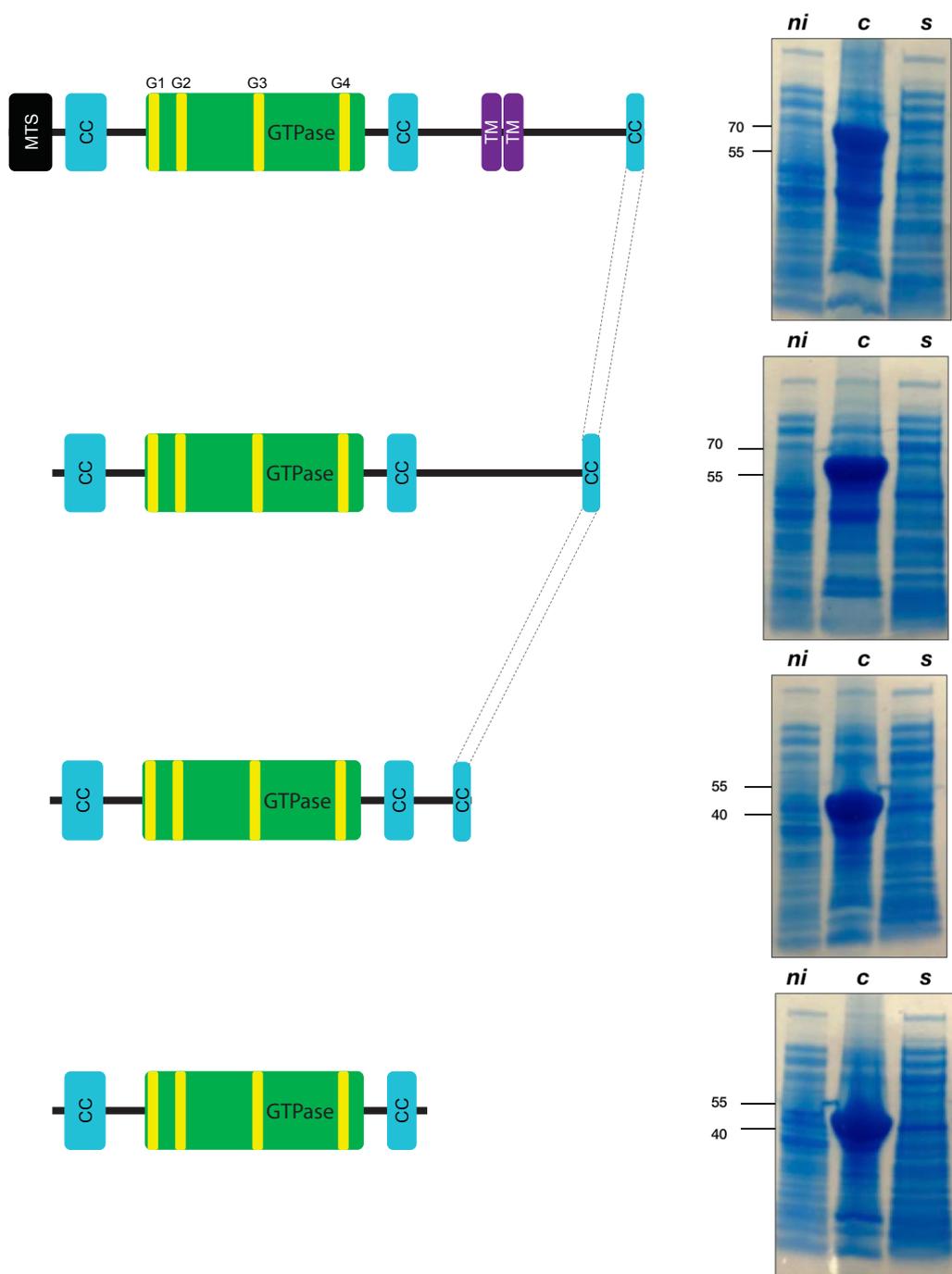


Figure 39 : Expression et production de la protéine *TbMfnL* recombinante

Expression de quatre constructions de la protéine *TbMfnL* dans des bactéries BL21-Star puis analyse de la solubilité par SDS-PAGE. ni, non induit ; c, culot ; s, surnageant.

L'extraction totale de ^{oe}TbMfnΔMTS::3TY1 est cependant observée à la même concentration que pour Atom. TbMfn::10HA et ^{oe}TbMfn::3TY1 présentent le même profil que l'ATP synthase, l'extraction totale ayant lieu à la même concentration en digitonine (**Fig. 38**).

Il semblerait que TbMfnL partage un profil d'extraction à la digitonine avec l'ATP synthase et Atom ce qui suggère une double localisation de la protéine. De plus, la version sans MTS bien que probablement retrouvée en partie dans le cytosol, est complètement extraite aux mêmes concentrations de digitonine qui extraient Atom, ce qui suggère que la protéine pourrait s'ancrer également dans la membrane externe. Cependant, il est important de noter que les propriétés intrinsèques des protéines jouent aussi un rôle important lors de la solubilisation à la digitonine. Par conséquent, les protéines/complexes nécessitant de plus grande concentration en digitonine pour être extraites des membranes pourraient avoir un profil différent que nos marqueurs et donc biaiser notre analyse. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer la localisation dans les deux membranes de TbMfnL.

3.1.4. Capacité de TbMfnL à réaliser à elle-seule la fusion

Afin de déterminer si TbMfnL est capable, comme son homologue humain (*HsMfn*), de fusionner à elle-seule des membranes, deux approches ont été mises en place.

Premièrement, une approche *in vitro* d'expression et purification chez *E. coli* de la protéine pour faire des essais d'activité *in vitro* tels que de la fusion de liposomes. Secondement, une approche *in vivo* des tests de complémentations fonctionnelles dans des cellules de mammifère.

3.1.4.1. Expression et production dans un système bactérien

Afin de compléter notre connaissance de TbMfnL nous avons essayé de produire la protéine dans un système bactérien afin de pouvoir la purifier et effectuer des expériences complémentaires *in vitro*, telles que des fusions de liposomes. Nous nous sommes appuyés sur l'article scientifique de Qi (Qi et al. 2016), qui a exprimé et purifié une version tronquée de *HsMfn1*, pour développer une approche nous permettant l'expression et la production de TbMfnL soluble.

Quatre constructions de la protéine recombinante TbMfnL ont été réalisées (**Fig. 39**) :

- La protéine entière.

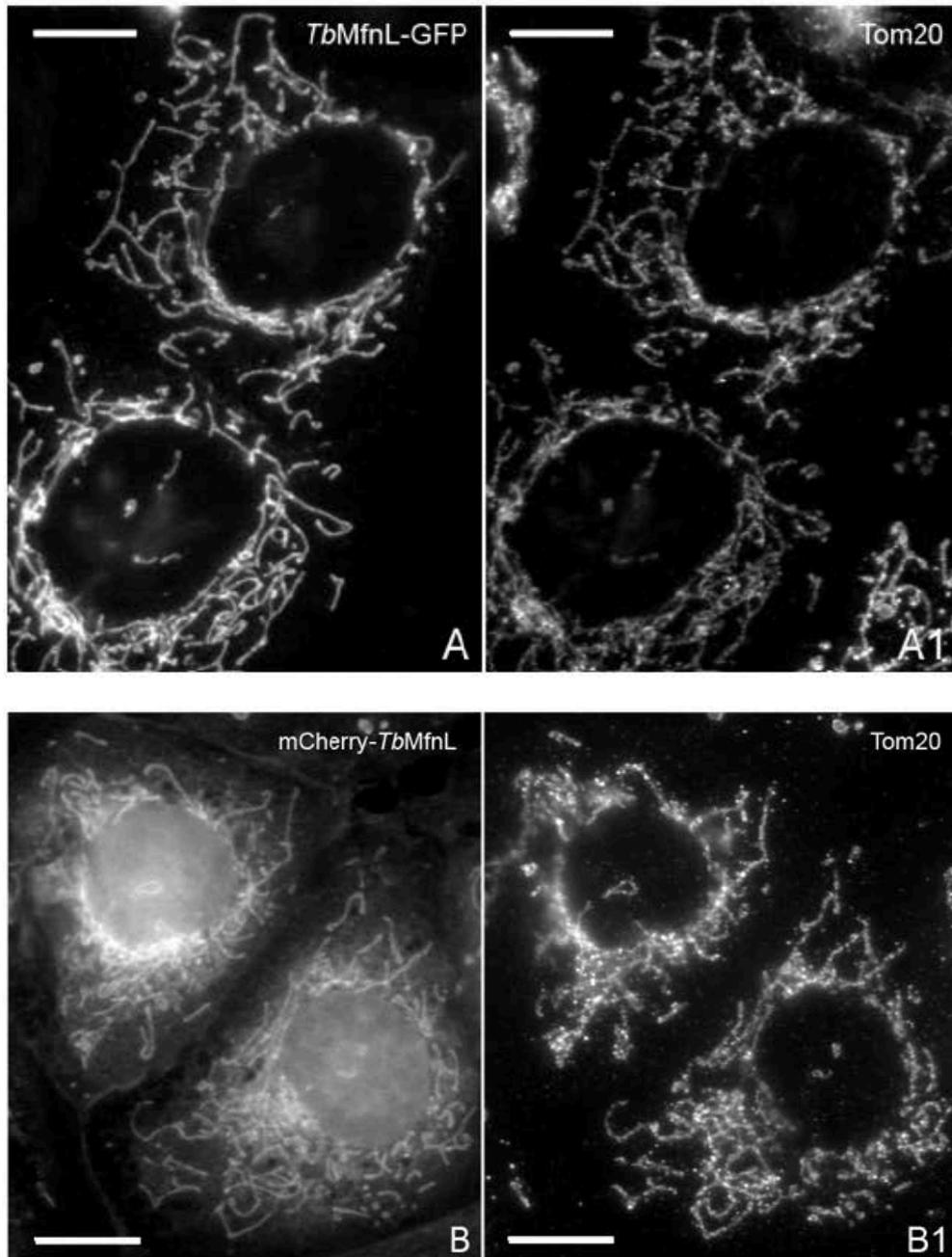


Figure 40 : Expression hétérologue et localisation cellulaire de *TbMfnL* dans des fibroblastes d'embryon de souris (MEF)

Analyse par immunofluorescence de cellules exprimant *TbMfnL::GFP* et *mCherry::TbMfnL*. Les cellules ont également été incubées avec un anticorps dirigé contre Tom20, protéine contrôle de la membrane externe de la mitochondrie. Barre d'échelle : 10 μ m. Expériences réalisées à l'IBGC par Manuel Rojo.

- Une version sans les domaines transmembranaires, qui souvent induisent une agrégation de la protéine, rendant la protéine insoluble.
- Une construction tronquée pour les domaines transmembranaires et la partie C-terminale mais en conservant le « coiled-coil » C-terminal.
- Une dernière construction dépourvue des deux domaines transmembranaires et de la partie C-terminale.

Les quatre constructions ont été clonées indépendamment dans un plasmide d'expression bactérien pST32 entre les sites de restrictions *Nde1* et *Xho1*. Les vecteurs ont été transformés dans des bactéries BL21 Star et les quatre protéines recombinantes ont été exprimées après induction à l'IPTG. Afin de tester leur solubilité, les bactéries ont été lysées puis les fractions solubles (surnageant ; s) et insolubles (culot ; c) ont été analysées par SDS-PAGE. Les quatre constructions produites sont bien exprimées par les bactéries mais ne sont pas solubles dans les conditions testées (**Fig. 39**). L'absence de protéine soluble ne nous a pas permis de tester la fusion *in vitro*. Il serait intéressant dans un premier temps d'utiliser d'autres détergents afin d'essayer de solubiliser la protéine et si besoin dans un second temps de réaliser d'autres constructions qui pourraient permettre une meilleure solubilité de la protéine.

3.1.4.2. Expression hétérologue dans les cellules de mammifère

Les mécanismes de fusion et de fission sont relativement conservés entre les cellules de mammifère et la levure, de nombreuses protéines sont homologues et conservent les mêmes fonctions. Afin d'étudier la capacité de fusion de la protéine *TbMfnL* dans d'autres organismes nous avons exprimé la protéine dans un système hétérologue ; les cellules de mammifère (**Fig. 40**).

TbMfnL a été insérée dans des plasmides d'expression de cellules de mammifère pQCXIB-GFP et pQCXIB-mCherry entre les sites de restrictions *Not1/Xho1* et *Xho1/ BamH1* respectivement afin de produire une version étiquetée en C-terminal avec une étiquette GFP et en N-terminal avec une étiquette mCherry. Des cellules de fibroblastes d'embryon de souris (MEF) ont été transfectées par notre collaborateur Manuel Rojo à l'IBGC.

La localisation de la protéine a été effectuée par immunofluorescence avec Tom20 comme marqueur de la membrane externe mitochondriale.

Les images de fluorescence montrent que dans les cellules de mammifère exprimant *TbMfnL::GFP*, celle-ci se trouve localisée dans la mitochondrie alors que dans les cellules exprimant *mCherry::TbMfnL*, celle-ci présente une double localisation, mitochondriale et diffuse dans le cytoplasme (**Fig. 40 A, B**). L'étiquette placée en N-terminal altère la localisation de la protéine probablement en altérant la reconnaissance du MTS, confirmant à nouveau l'importance du MTS en N-terminal de la protéine pour sa localisation et que les domaines transmembranaires semblent être compétents pour un adressage mitochondrial partiel, potentiellement dans la membrane externe. Enfin, dans les cellules de mammifère, malgré la bonne localisation de *TbMfnL::GFP* dans la mitochondrie, nous n'observons pas d'altérations de la structure mitochondriale (**Fig. 40 A**). Ainsi, il semble que malgré une similarité structurelle entre *HsMfn* et *TbMfnL*, cette dernière n'est pas fonctionnelle dans les cellules de mammifère. Cette différence pourrait aussi être due à une faible expression de la protéine ou à l'absence d'un/des partenaire(s) essentiel(s) à la fonction de *TbMfnL* dans les cellules de mammifère.

3.1.5. Conservation dans les autres Kinétoplastidés

L'absence de complémentation fonctionnelle dans les cellules de mammifère suggère aussi que les mécanismes permettant la fusion pourraient être spécifiques aux kinétoplastidés. En effet, les autres Kinétoplastidés, tels que *T. cruzi*, les leishmanies ou *Crithidia*, partagent de nombreuses similitudes avec *T. brucei*, notamment leur mitochondrie unique, l'ADN kinétoplastique et possiblement une machinerie de fusion mitochondriale conservée incluant une mitofusine atypique similaire à *TbMfnL*.

Dans un premier temps, une analyse *in silico* a été effectuée dans les génomes de *T. cruzi*, *L. mexicana* et *C. fasciculata* et a permis de montrer qu'ils possèdent tous un homologue à *TbMfnL*. L'alignement des séquences montre une forte conservation de l'ensemble de la protéine à l'exception de la partie N-terminale qui contient la séquence MTS (**Fig 41**). Cette conservation de séquence suggère fortement une conservation de la fonction.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié plus précisément la protéine MfnL chez *Leishmania mexicana*. La protéine de *L. mexicana*, nommée *LmxMfnL* a été inactivée par Crispr-Cas9. L'analyse de la fluorescence de la rhodamine123, qui révèle la mitochondrie, n'a montré aucune altération de la mitochondrie (**Fig. 42**). Tout comme pour le trypanosome africain l'inactivation de cette potentielle mitofusine ne semble pas avoir d'impact sur la structure mitochondriale.

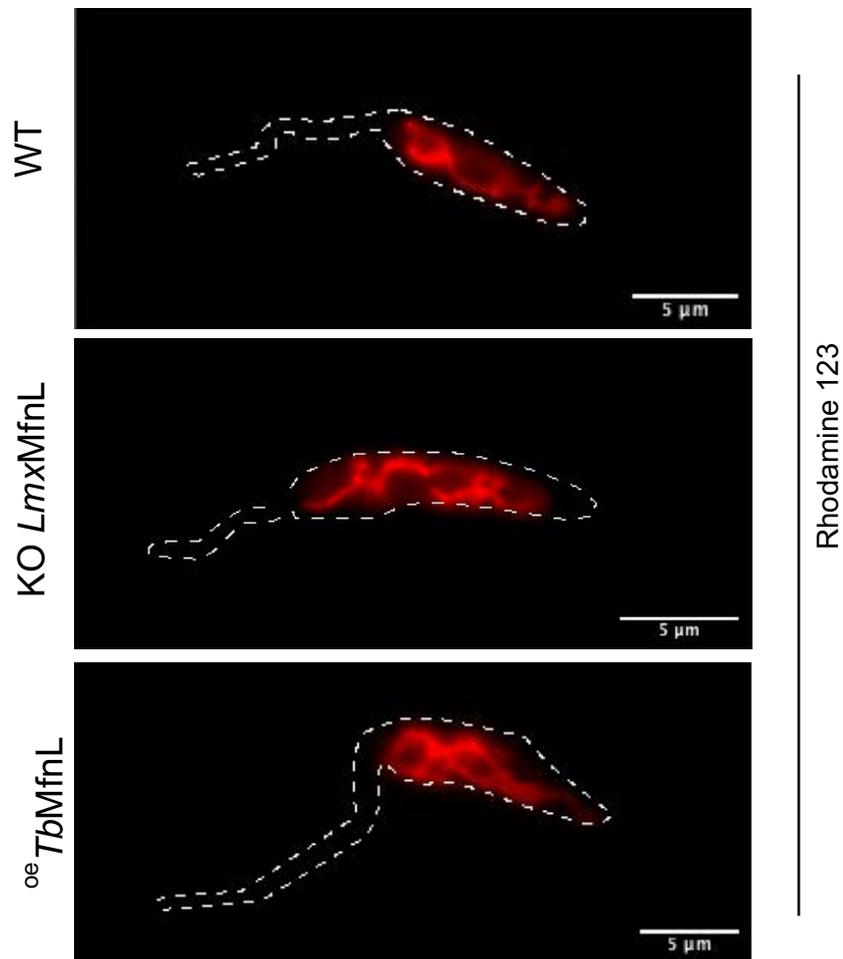


Figure 42 : Structure mitochondriale des souches *oe TbMfnL* et *KOLmxMfnL* chez *Leishmania mexicana*

Analyse de la structure de la mitochondrie par la fluorescence de la rhodamine 123 sur les cellules vivantes *oe TbMfnL* et *KOLmxMfnL* en comparaison avec une cellule sauvage.

Comme chez *T. brucei*, la fission mitochondriale est probablement très faible, ce qui explique l'absence de modifications de la morphologie mitochondriale lors de l'inactivation de cette protéine.

Enfin, afin de déterminer si *TbMfnL* est également compétente pour induire la fusion mitochondriale dans les leishmanies, nous avons surexprimé *TbMfnL* dans *L. mexicana*. *TbMfnL* a été insérée dans un vecteur d'expression des leishmanies (pNUS) entre les sites de restrictions *Nde1/Kpn1* et le vecteur a ensuite été transfecté dans les parasites. Comme précédemment, la structure de la mitochondrie a été analysée en utilisant la rhodamine123 sur cellule vivante. Contrairement à *T. brucei*, chez *L. mexicana* la surexpression de *TbMfnL* n'entraîne pas d'hyperfusion, suggérant à nouveau une importante spécificité dans le mécanisme d'action de cette mitofusine (**Fig. 42**). Cependant, nous n'avons pas pu ici confirmer la surexpression de *TbMfnL*, car dépourvue d'étiquette en C-terminal. Il serait intéressant de répéter cette expérience, mais cette fois-ci avec une version étiquetée de la protéine afin de valider la surexpression.

L'ensemble de ces résultats, aussi bien chez les cellules de mammifère que chez les kinetoplastidés, suggère fortement que la protéine *TbMfnL* a besoin, pour fonctionner, de partenaires, possiblement très spécifiques, et éventuellement retrouvés dans un complexe. Nous nous sommes donc intéressés à rechercher de potentiels partenaires de *TbMfnL* chez *T. brucei*.

3.2. Un complexe de branchement

L'ensemble de nos données sur *TbMfnL* nous amène à penser que les mécanismes de fusion sont différents de ce qui sont connus chez la levure ou les cellules de mammifère. En effet, l'adressage particulier de *TbMfnL* aux membranes mitochondriales suggère une divergence par rapport à *Mfn/Mgm1*. De plus, l'absence de phénotype observé lors de la surexpression de *TbMfnL* dans les leishmanies, suggère également que *TbMfnL* nécessite un ou des partenaire(s) spécifique(s) du trypanosome africain.

Dans un premier temps, nous avons recherché, par une approche de gel natif, si *TbMfnL* est présent dans un complexe protéique et dans un second temps, par une approche de BiOLD, quels sont ses potentiels partenaires.

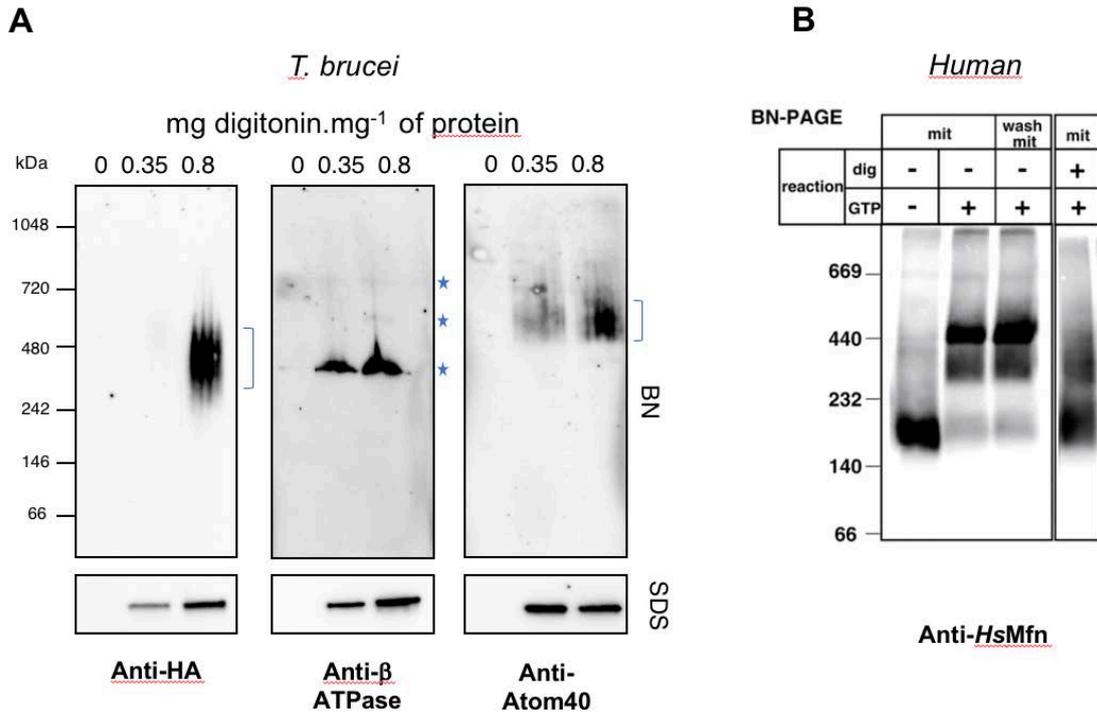


Figure 43 : Organisation de *TbMfnL* en complexe

(A) $3 \cdot 10^8$ cellules de *TbMfnL::10HA* (correspondant à 1 mg de protéines) ont été incubées avec de la digitonine (0 ; 0,35 et 0,8 mg de digitonine / mg de protéines). Les surnageants obtenus après perméabilisation à la digitonine sont migrés en condition non dénaturante ou native (BN-PAGE) et en condition dénaturante (SDS-PAGE). Les protéines et complexes sont révélés par western blot avec différents anticorps dirigés contre HA, la β sous-unité de l'ATP synthase et ATOM40. Les étoiles bleues indiquent le F1 libre, les ATP synthases monomérique et dimérique.

(B) Gel natif de *HsMfn1* réalisé par (Ishihara 2004), en condition avec ou sans digitonine (dig) et avec ou sans GTP sur mitochondries isolées (mit) ou mitochondries isolées et lavées avec des sels (wash mit).

3.2.1. Organisation de *TbMfnL* en condition native

Nous nous sommes intéressés à l'organisation que prend *TbMfnL* en condition native. Pour ce faire, nous avons réalisé un gel natif avec les extraits totaux de *TbMfnL::10HA* perméabilisés à la digitonine avec trois concentrations (0 ; 0,35 et 0,8 mg de digitonine/mg de protéines). Les fractions solubles ont été résolues sur gel natif (BN-PAGE) puis transférées sur membrane et révélées avec un anticorps anti-HA, un anticorps anti-ATP synthase (sous-unité β) et un anticorps anti-Atom40. L'expression des protéines a également été contrôlée par western blot en condition dénaturante (SDS-PAGE) (**Fig. 43 A**). En gel natif, Atom et l'ATP synthase forment des complexes de hauts poids moléculaires et dans le cas de l'ATP synthase c'est essentiellement le F1 libre qui est révélé. *TbMfnL::10HA* forme également des complexes de haut poids moléculaire d'environ 450-500 kDa, complexes qui sont extraits principalement à 0,8 mg de digitonine/mg de protéines (**Fig. 43 A**).

La composition de ce complexe reste cependant inconnue, mais tout comme HsMfn qui s'oligomérisent en homodimère ou hétérodimère entre Mfn1 et Mfn2 (**Fig. 43 B**), *TbMfnL* pourrait former des complexes composés d'homodimère/tétramère. *TbMfnL* pourrait également former des complexes avec d'autres protéines.

3.2.2. Recherche de partenaires

Nous avons recherché les partenaires potentiels de *TbMfnL* en utilisant le système BioID, c'est-à-dire un marquage par la biotine des protéines partenaires lorsqu'elles sont à proximité de la protéine *TbMfnL*. Une biotine ligase (BirA) est fusionnée à la protéine d'intérêt ce qui conduira à biotinyler les protéines à proximité en présence de biotine. L'identification des protéines biotinylées est permise par une technique de capture par affinité à la biotine suivie d'une analyse par spectrométrie de masse.

Dans les formes procycliques nous avons transfecté un vecteur contenant une version de *TbMfnL* avec une étiquette BirA en C-terminal, suivie d'une étiquette 3Ty1. Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'ajout de l'étiquette BirA n'affecte pas la fonction de *TbMfnL*. Les cellules ^{oe}*TbMfnL::BirA-3Ty1* ont été induites pendant 3 jours puis analysées par fluorescence après un marquage à la rhodamine123 afin d'étudier la morphologie de la mitochondrie.

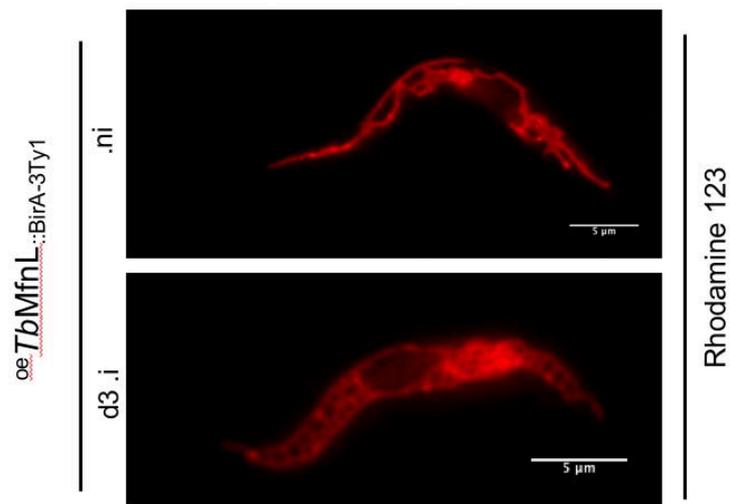


Figure 44 : Structure mitochondriale de la souche *oeTbMfnL::BirA-3Ty1*

Analyse de la structure de la mitochondrie par fluorescence de *oeTbMfnL::BirA-3Ty1* non induit et après 3 jours d'induction à la tétracycline, en utilisant la rhodamine123.

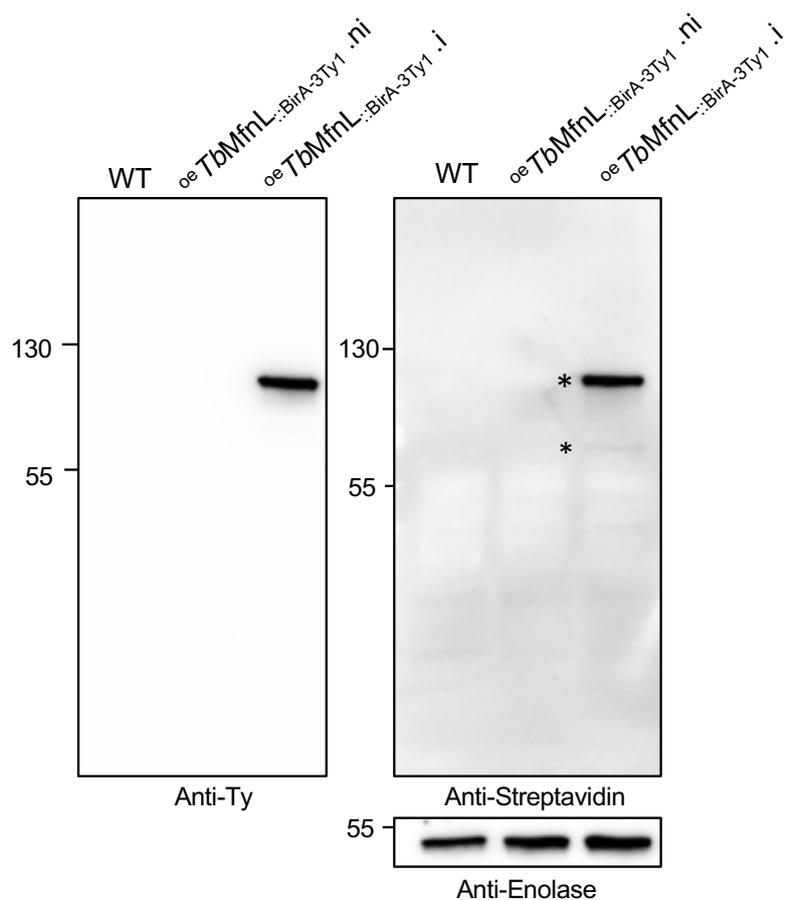


Figure 45 : Western blot *oeTbMfnL::BirA-3Ty1*

Western blot sur extraits totaux des souches PCF sauvage et surexprimant *oeTbMfnL::BirA-3Ty1* non induite et induite pendant 48 heures. Les cellules ont été incubées avec de la biotine (50 µM) pendant 12 heures puis les extraits ont été analysés en western blot avec un anticorps anti-Ty, un anticorps anti-streptavidine et un contrôle de charge anti-énolase.

Les cellules surexprimant ^{oe}*TbMfnL::BirA-3Ty1* présentent une mitochondrie hyperfusionnée avec de nombreuses réticulations comme pour les cellules sur-exprimant la version sauvage de *TbMfnL* (^{oe}*TbMfnL::3Ty1*) indiquant que la version étiquetée avec la biotine ligase BirA (^{oe}*TbMfnL::BirA-3Ty1*) est fonctionnelle (**Fig. 44**).

Nous avons également vérifié par western blot l'expression de la protéine avec un anticorps anti-Ty1. Afin de confirmer que l'étiquette BirA est capable de biotinyler des protéines, les cellules ont été mises en culture avec de la biotine puis un western blot avec un anticorps anti-streptavidine couplé à la peroxydase de raifort a été réalisé. La streptavidine a une très forte affinité pour la biotine permettant la capture/révélation des protéines biotinylées. L'analyse du western blot montre deux protéines biotinylées majoritaires pouvant correspondre à ^{oe}*TbMfnL::BirA-3Ty1* (environ 103 kDa) et à *TbMfnL* endogène (environ 70 kDa) (**Fig. 45**).

Trois lignées cellulaires ont été utilisées : la souche sauvage (WT), une souche exprimant de manière inductible la pyruvate deshydrogénase (^{oe}*PDH::BirA*) et notre souche d'intérêt ^{oe}*TbMfnL::BirA-3Ty1*. Dans cette expérience, la souche sauvage, la souche ^{oe}*PDH::BirA* induite et la souche ^{oe}*TbMfnL::BirA-3Ty1* non induite seront nos différents contrôles. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les cellules ont été mises en culture dans un milieu Creeks, dépourvu en biotine, pendant 48 heures avec ou sans induction à la tétracycline pour les souches ^{oe}*PDH::BirA* et ^{oe}*TbMfnL::BirA-3Ty1* puis 50 µM de biotine ont été ajoutés aux cultures pendant 12 heures. Les cellules ont ensuite été récupérées par centrifugation et lysées avant trois séries de sonications. Des billes aimantées couplées à de la streptavidine ont été utilisées pour séparer les fractions biotinylées des autres. Les échantillons contenant les fractions biotinylées ont été ensuite transmis à la plateforme CGFB protéome de Bordeaux pour une analyse en spectrométrie de masse.

A l'issue de l'expérimentation, 1439 protéines ont été identifiées. De ces 1439 protéines nous avons retiré celles dont l'abondance présentait un ratio inférieur à deux par rapport à *TbMfnL::BirA-3Ty1* induit. Puis ont été retirées, les protéines ne présentant pas une « p-value » significative dans les trois contrôles par rapport à *TbMfnL::BirA-3Ty1*. 21 protéines différentes ont ainsi été identifiées (**Tab. 5**). La première retrouvée avec le plus haut nombre de peptides (61) est *TbMfnL*. Étant la protéine proie avec l'étiquette BirA, il est normal qu'elle soit fortement biotinylée, cela peut aussi suggérer que *TbMfnL* interagit avec elle-même pour former par exemple des oligomères (**Tab. 5**).

Accession	Description	Peptides	Abondance ratio <i>TbMfnL</i> .i vs/			AA
			PDH .i	.ni	WT	
Tb1125.7.2410	Famille des dynamines, putative	61	300,77	190,332	267,455	600
Tb1125.10.770	protéine contenant un domaine RF-1, putative	24	21,191	19,125	19,454	632
Tb1125.1.3950	alanine aminotransférase	20	15,465	12,498	10,167	504
Tb1125.2.5930	protéine hypothétique, conservée	18	13,723	16,971	14,926	523
Tb1125.11.1850	protéine hypothétique, conservée	15	19,888	17,015	21,323	495
Tb1125.7.4620	protéine hypothétique, conservée	14	35,392	35,352	39,703	275
Tb1125.1.740	domaine MORN	13	22,194	19,113	21,224	435
Tb1125.9.14200	méthyltransférase, putative	12	11,085	15,065	17,086	386
Tb1125.8.1240	oxydoréductase de transfert d'électrons flavoprotéine-ubiquinone, putative	9	23,055	16,335	31,842	564
Tb1125.11.14700	protéine hypothétique, conservée	8	22,28	35,175	28,011	547
Tb1125.3.4950	protéine hypothétique, conservée	6	15,287	15,27	16,588	499
Tb1125.7.1080	protéine hypothétique, conservée	4	17,522	19,306	27,281	360
Tb1125.10.4080	protéine hypothétique, conservée	3	22,511	22,657	20,699	1496
Tb1125.11.4850	protéine hypothétique, conservée	3	18,162	18,283	8,288	443
Tb1125.10.11050	protéine ribosomale LSU, mitochondriale, putative	3	21,167	45,497	27,077	314
Tb1125.7.4440	Famille épimérase/déshydratase dépendant du NAD, putative	2	13,367	19,093	13,014	292
Tb1125.4.3070	protéine hypothétique, conservée	2	14,248	16,617	15,552	448
Tb1125.5.3410	protéine mitochondriale ribosomale L9	2	31,292	63,409	293,818	263
Tb1125.7.1430	protéine répétition riche en leucine (LRRP), putative	2	13,262	3,536	8,229	448
Tb1125.4.1890	protéine hypothétique, conservée	2	16,452	16,664	8,548	224
Tb1125.10.14530	19S protéasome non-atpase sous-unité 8	2	22,196	14,807	7,678	381

Tableau 5 : Protéines identifiées par la technique du BiOLD

Protéines sélectionnées sur leur ratio abondance *TbMfnL* induit (.i) en comparaison avec trois contrôles ; PDH .i, *TbMfnL* non induit (.ni) et un sauvage (WT).

Accession	Localisation		Essentiel	Séquence MTS
	Mitoprot	Tryptag		
Tb1125.7.2410	99,91%	Mitochondrie/faible	NON	MRQLGSAVLACRNFNTPLKSLRSITLPTT SSLKRLRRSQLGA
Tb1125.10.770	99,82%	Kinétoplaste intense	PCF	MHRQRRLVRGLLSNSSSQMLGCRPFFG MSGRGGAGGRG
Tb1125.1.3950	38,94%	Cytosol / Kinétoplaste	NON	MKGNQEFFQKGGAHVSKGVHINPRVKK AQYAVRGLVPMRADE
Tb1125.2.5930	33,07%	Mitochondrie	PCF	MRRFTLITRYFPLFHPSA
Tb1125.11.1850	95,66%	Mitochondrie	PCF	MGAARSKPAREAPVRYVAKQLPRV
Tb1125.7.4620	91,19%	Mitochondrie	NON	MRYRLRLDAFAPAGSLPCCRILTQVRNL NMNRSVQTRW
Tb1125.1.740	98,72%	Mitochondrie/ Kinétoplaste	BSF	MFVRRVLRLCVSR
Tb1125.9.14200	95,75%	Mitochondrie	PCF	MFRRFIPCMRSGAAGPLRAVTTARRFQ GTKSGGGSGRE
Tb1125.8.1240	94,28%	?	NON	Non prédit
Tb1125.11.14700	17,48%	Mitochondrie	PCF	MYFKPSLTRYIPVCISPLLHQCRKLNSG DAG
Tb1125.3.4950	77,67%	Mitochondrie/faible	NON	Non prédit
Tb1125.7.1080	99,92%	Mitochondrie/faible	BSF + PCF	MMQRCSTSLRSLCFRLLRTPLLVYSIPP TRDVPSGIAHCPLSCSMRM
Tb1125.10.4080	84,09%	Mitochondrie	BSF + PCF	MRRFAPTVASALSGPPTGCLFAVTGNAV RRY
Tb1125.11.4850	50,82%	Mitochondrie	NON	MLRPRSVLLCSSLQRV
Tb1125.10.11050	49,37%	Mitochondrie	NON	MKMGASAGLIRRG
Tb1125.7.4440	99,68%	Mitochondrie	NON	MKSGKLLIFGGTGFVGSVVVRKALQRG WRVICATRG
Tb1125.4.3070	77,93%	Mitochondrie	BSF + PCF	MLRHTCRRLLLNVSGESPSFRA
Tb1125.5.3410	51,40%	Mitochondrie	NON	Non prédit
Tb1125.7.1430	41,23%	Flagelle	NON	Non prédit
Tb1125.4.1890	2,19%	Noyau/ Cytosol /Flagelle	NON	Non prédit
Tb1125.10.14530	0,37%	Cytosol/ Noyau	NON	Non prédit

Tableau 6 : Protéines identifiées par la technique du BioID, leurs potentielles localisation, essentialité et MTS

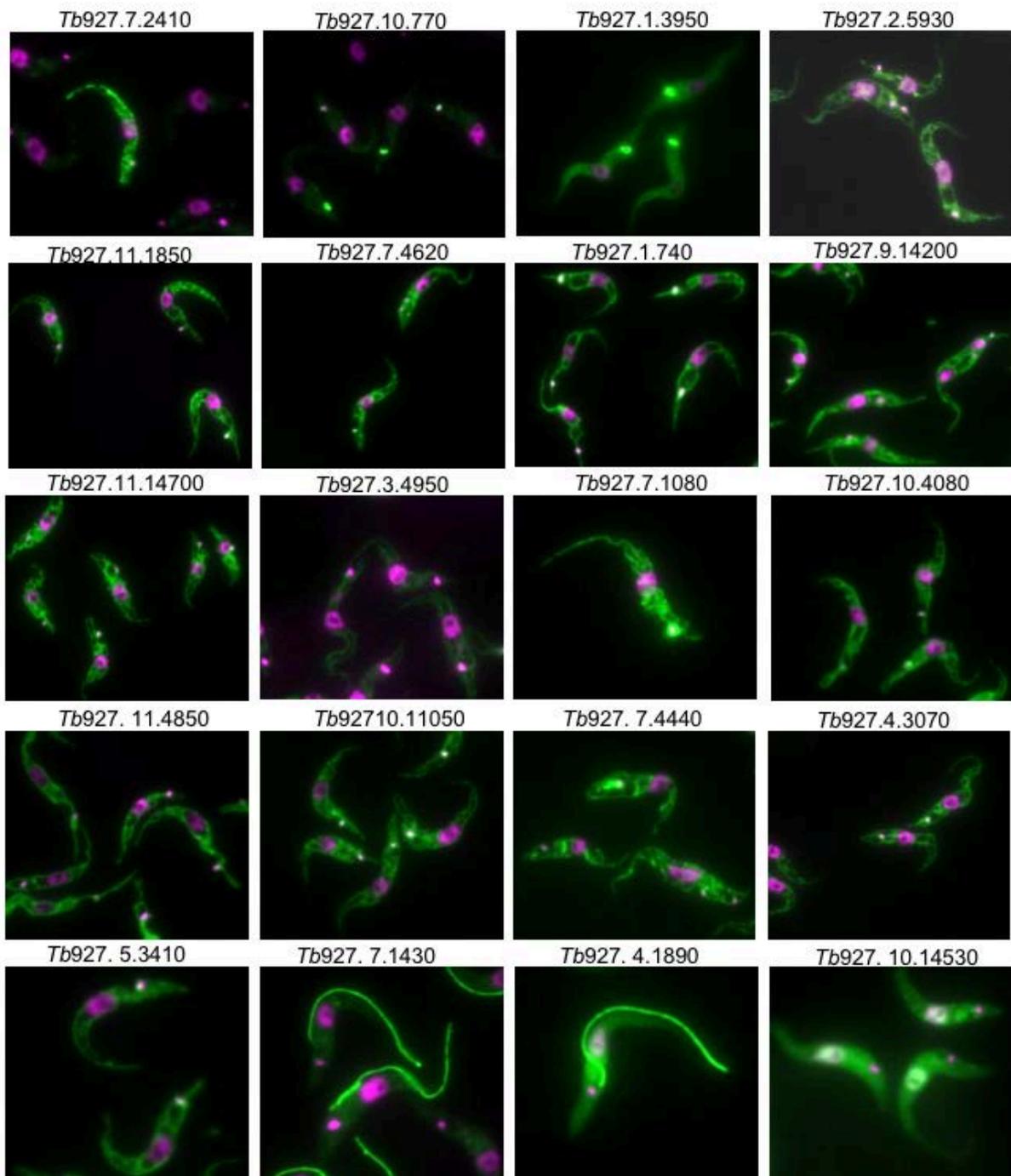


Figure 46 : Localisation des 20 protéines candidates étiquetées avec une GFP en C-terminal par Tryptag
 En vert, localisation de la protéine ; en violet, noyau et kinétoplaste.

La possible localisation cellulaire des 20 protéines restantes a pu être déterminée grâce au site TrypTag et par une analyse de prédiction d'adressage à la mitochondrie des protéines en utilisant le logiciel Mitoprot (**Tab. 6** et **Fig. 46**). TrypTag est une banque de données (Dean, Sunter, et Wheeler 2017) contenant la localisation de chaque protéine codée par le génome de *T. brucei*. Les protéines ont été étiquetées avec une GFP en N-terminal et/ou C-terminal. Mitoprot permet la prédiction d'une région en N-terminal conduisant à un adressage à la mitochondrie (Claros et Vincens 1996). Les résultats sont exprimés en % de probabilité d'une localisation mitochondriale et une potentielle séquence d'adressage à la mitochondrie est proposée (**Tab. 6**).

Parmi les 20 protéines identifiées :

- 15 protéines sont localisées dans la mitochondrie ou au niveau du kinétoplaste, une possède une double localisation kinétoplaste et cytosol, 3 sont localisées au niveau du flagelle, du noyau ou du cytosol et une dernière pour laquelle nous n'avons pas d'information sur sa localisation (**Tab. 6** et **Fig. 46**).
- 14 protéines possèdent une potentielle séquence d'adressage à la mitochondrie et pour 3 protéines identifiées comme mitochondriale par TrypTag la séquence d'adressage n'a pas pu être prédite (**Tab. 6** et **Fig. 46**).

Cette analyse permet de réduire encore un peu le nombre de possibles partenaires en éliminant les 3 protéines non mitochondriales. Parmi les 17 restantes, nous avons aussi éliminé les deux protéines ribosomiques, protéines souvent contaminantes car en grande quantité dans la mitochondrie, l'alanine amino transférase (Tb1125.1.3950) qui est systématiquement retrouvée dans ce type d'analyse quelles que soient les conditions, et les deux oxydoréductases (Tb1125.7.4440 et Tb1125.8.1240) qui sont possiblement impliquées dans le métabolisme de la biotine. Cette analyse aboutissant à 12 candidats possibles.

L'analyse des 12 candidats a continué par l'analyse du rôle essentiel ou non des gènes codant ces protéines. Pour cela, nous avons utilisé le crible ARN interférence (Alsford et al. 2011). Parmi les 12 candidats, 3 sont non essentiels ; 5 semblent importants pour la forme procyclique (PCF), 1 pour la forme sanguine (BSF) et 3 pour les deux formes du parasite (**Tab 6**). Nous avons de plus analysé ces 12 candidats par le logiciel PsiPred dans le but d'identifier une possible fonction par comparaison de leur structure.

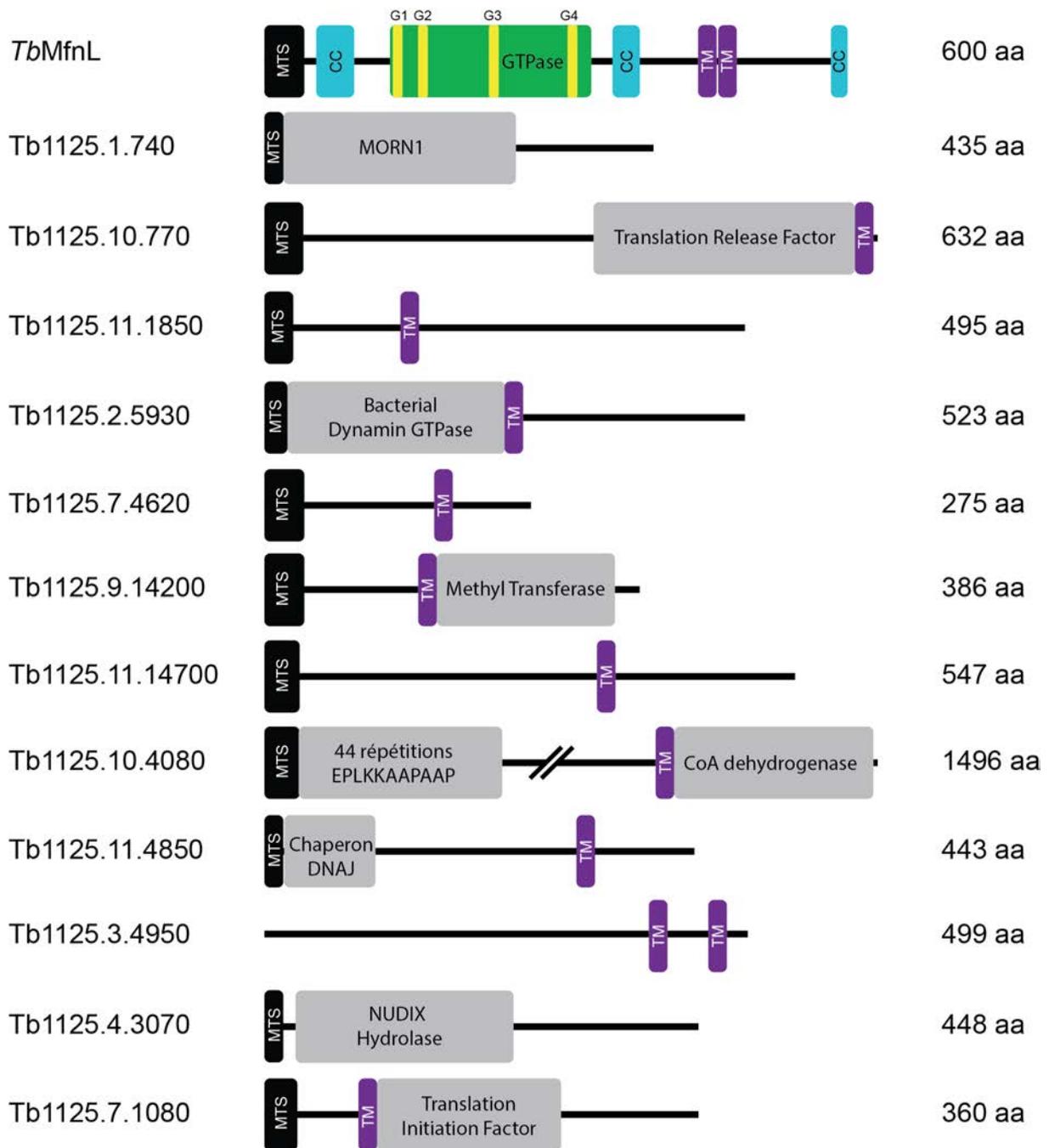


Figure 47 : Comparaison des domaines potentiels des partenaires candidats de *TbMfnL*

MTS, séquence d'adressage à la mitochondrie ; CC, « coiled-coil » ; domaine GTPase avec les quatre motifs G (1-4) ; TM, domaine transmembranaire ; aa, acide-aminé. Prédictions des structures effectuées par le logiciel PSIPRED.

PsiPred est un logiciel de prédiction de structure protéique avec une prédiction des domaines et des fonctions avec différents niveaux de certitudes. Les 12 candidats sont décrits comme des protéines hypothétiques mais parmi ces 12 quelques-uns possèdent des domaines identifiés (**Fig. 47**).

La recherche de partenaires potentiels de *TbMfnL* nous a conduit à l'obtention de 12 protéines dont les outils bioinformatiques nous ont permis de commencer une analyse de leur localisation ainsi que de leur fonction. Des études approfondies de ces différents candidats seront nécessaires afin de définir s'ils participent à la structuration de la mitochondrie et s'ils appartiennent tous à un même complexe.

4. Discussion et perspectives

4.1. *TbMfnL* une protéine atypique

4.1.1. Où se trouve *TbMfnL* ?

Nos analyses ont montré l'importance de la localisation et de l'orientation de *TbMfnL* dans les membranes mitochondriales pour son fonctionnement. Bien que notre étude n'ait pas permis de déterminer avec certitude la localisation et l'orientation de *TbMfnL* à l'intérieur des membranes mitochondriales, nous avons cependant montré que plusieurs domaines sont importants pour sa localisation.

L'absence de la séquence MTS (*TbMfnL* Δ MTS) de *TbMfnL* impacte à la fois la localisation et la fonction de la protéine, ce qui témoigne de l'importance de ce domaine. Il semble évident que la présence du MTS, fonctionnel, en N-terminal de la protéine conduit au moins *TbMfnL*, à l'intérieur de l'espace intermembranaire. Il reste à déterminer si le MTS est uniquement présent pour amener la protéine à la mitochondrie ou s'il participe à son orientation dans les membranes mitochondriales. En remplaçant le MTS de *TbMfnL* par un autre MTS nous pourrions répondre également à cette question. En l'absence des domaines transmembranaires (*TbMfnL* Δ TM), la protéine reste localisée dans la mitochondrie mais sa fonction est supprimée suggérant qu'elle n'est plus localisée correctement. Les domaines transmembranaires jouent vraisemblablement un rôle central dans l'orientation et l'ancrage de *TbMfnL* dans les membranes.

De plus, les résultats obtenus par la perméabilisation des compartiments cellulaires à la digitonine, suggèrent que la protéine pourrait être localisée dans les deux membranes. Nous pouvons faire l'hypothèse que comme pour les autres mitofusines, qu'une partie de *TbMfnL* est ancrée par les domaines transmembranaires dans la membrane externe conduisant les parties N-terminale et C-terminale de la protéine face au cytosol. Cette hypothèse est supportée par l'expression de $mCherry::TbMfnL$ dans les cellules de mammifère qui reste partiellement localisée dans la mitochondrie. Enfin, une autre partie de *TbMfnL* pourrait passer au travers de la membrane externe puis de la membrane interne via un transport lié au MTS et pourrait être ancrée dans les membranes lors du passage des domaines transmembranaires. *TbMfnL* serait donc localisée dans les deux membranes mitochondriales et permettrait la fusion des deux membranes. Consolidant cette hypothèse, malgré une analyse *in silico* rigoureuse, aucun orthologue à Opa1/Mgm1 (essentielle à la fusion de la membrane interne chez les cellules de mammifère ou la levure) n'a été retrouvé dans le génome de *T. brucei*.

L'étude approfondie de la localisation de *TbMfnL* dans les membranes ainsi que de son orientation pourra nous aider à déterminer si en effet *TbMfnL* est responsable de la fusion des deux membranes. Par exemple, une analyse de la sensibilité à la protéinase K de la protéine *TbMfnL* dans différents compartiments de mitochondries isolées devrait nous permettre de clarifier sa localisation.

4.1.2. Un complexe de branchement

Dans la recherche des partenaires de *TbMfnL*, 12 candidats ont été identifiés, possédant une localisation mitochondriale ou kinétoplastique. Parmi ces 12 protéines, la plupart possède une fonction inconnue et peu de domaines identifiés nous permettent de conclure sur leur potentielle fonction. Néanmoins, un des candidats, la protéine *Tb1125.2.5930* est décrite comme une dynamine bactérienne à domaine GTPase et possédant un potentiel domaine transmembranaire. Cette protéine pourrait être la deuxième dynamine mitochondriale impliquée dans la structuration mitochondriale chez *T. brucei* et potentiellement responsable de la fusion de la membrane interne de la mitochondrie. Nous pouvons également envisager que *TbMfnL* et *Tb1125.2.5930* sont toutes les deux nécessaires à la fusion des deux membranes mitochondriales. Afin de déterminer si ces candidats sont de réels partenaires de *TbMfnL*, nous réaliserons d'autres expériences de BioID avec certains d'entre-eux. Nous allons également tenter d'inactiver les gènes codant ces candidats dans la souche sur-exprimant *TbMfnL*. Ainsi si ces candidats participent bien à un complexe de branchement/fusion, leur inactivation devrait abolir le phénotype d'hyperfusion observé. Enfin, si ces différents candidats s'avèrent impliqués dans un complexe de fusion/branchement de la mitochondrie, nous aurions alors un mécanisme de fusion membranaire différent de ce qui est connu chez les Opisthocontes.

Quant à savoir si ce nouveau complexe est conservé chez les Kinétoplastidés, les expériences préliminaires sur l'étude de *TbMfnL* dans les leishmanies ne nous ont pas permis de mettre en évidence des mécanismes conservés. Cependant, l'ensemble des candidats identifiés par BioID sont également retrouvés chez les leishmanies. Les modes de développement et d'environnement de ces parasites étant assez différents, il est possible que les mécanismes régulant la structure mitochondriale soient différents entre ces deux protozoaires. La surexpression de *TbMfnL* fusionnée à une étiquette ainsi que la surexpression de *LmxMfnL* dans *L. mexicana* nous aideront à clarifier ce point.

4.1.3. L'hyperfusion mitochondriale et le métabolisme

L'étude du métabolisme des parasites ^{oe}*TbMfnL* possédant une mitochondrie hyperfusionnée a permis de mettre en évidence plusieurs modifications du métabolisme. Grâce à l'utilisation du système Biolog et l'analyse de 119 molécules nous avons observé l'augmentation de l'utilisation/consommation des deux sources majoritaires de carbone qu'utilise le parasite : le glucose et la proline. L'augmentation de ces deux sources de carbone semble témoigner d'une plus grande demande énergétique de ces parasites en comparaison avec un parasite sauvage. Cependant, l'analyse par RMN des produits excrétés, bien que préliminaire, ne montre aucune différence entre le sauvage et les cellules surexprimant *TbMfnL*. L'augmentation de l'utilisation/consommation du glucose et de la proline ne semble pas être accompagnée d'une augmentation de l'excrétion des produits finaux du métabolisme. Cela suggère que, soit ces produits sont utilisés par le parasite à d'autres fins, soit le métabolisme est modifié. Il sera nécessaire de reproduire les résultats de RMN afin de confirmer ces observations.

Nous avons également observé une augmentation de l'utilisation/consommation d'une troisième molécule : l'éthanolamine, qui est un précurseur du phosphatidyléthanolamine (PE). Le PE est un phospholipide monocouche, enrichi dans la membrane interne de la mitochondrie, qui joue un rôle important dans la structure et la fonction mitochondriale, et notamment dans la fusion mitochondriale (Ardail et al. 1990). Le PE et la phosphatidylcholine (PC) sont les phospholipides majoritaires chez le trypanosome, et qui sont uniquement synthétisés par la voie de Kennedy (Signorell et al. 2008). Chez *T. brucei*, l'étude des enzymes de la voie de Kennedy a révélé l'importance de cette voie dans la structuration mitochondriale. En effet, l'inhibition de l'expression de l'éthanolamine phosphate cytidyltransférase par ARN interférence, altère la morphologie de la mitochondrie (Signorell et al. 2009). L'augmentation de la consommation de l'éthanolamine suggère une stimulation du métabolisme lipidique, notamment des phospholipides, pouvant refléter une biogénèse lipidique des membranes en lien avec la modification de la structure mitochondriale. Afin de compléter cette étude, il sera intéressant d'analyser l'utilisation/consommation de la choline pour déterminer si cette biogénèse de phospholipides inclut les deux phospholipides majoritaires ou s'il s'agit uniquement d'une augmentation de PE. L'ensemble de ces modifications métaboliques suggère fortement un lien étroit entre la structure mitochondriale et le métabolisme. Pour compléter et affiner ces observations, nous envisageons d'étudier le métabolisme par une approche non ciblée de protéomique et métabolomique.

Cette approche devrait nous permettre d'avoir une vue générale des voies métaboliques et des modifications des métabolites engendrées par les modifications de la structure mitochondriale.

4.1.4. L'augmentation des volumes cellulaires

La stimulation de la fusion qui induit une hyperfusion mitochondriale se traduit également par une forte augmentation des volumes de la mitochondrie, de la cellule et du noyau. Les mécanismes conduisant à l'augmentation des volumes cellulaires et des organelles par la surexpression de *TbMfnL* ne sont à ce jour pas identifiés. Il est évident qu'il y a un lien étroit entre la structuration de la mitochondrie et son rôle général pour la cellule, puisqu'une altération de ce mécanisme conduit à des modifications ayant des répercussions sur l'ensemble de la cellule. Néanmoins, l'augmentation des volumes n'est pas accompagnée par une modification du cycle cellulaire du parasite puisqu'aucun effet sur la croissance n'a été observé. Afin d'identifier d'éventuelles modifications au niveau protéique, engendrées par les modifications des volumes cellulaires, nous réaliserons une analyse protéomique.

4.2. La dynamique mitochondriale chez *Trypanosoma brucei*

4.2.1. La fission

La dynamique mitochondriale a été largement étudiée dans les organismes modèles tels que la levure ou les cellules de mammifère. Elle est essentielle au bon fonctionnement de la cellule en régulant de nombreux aspects cellulaires. Cependant, le rôle et l'importance de la dynamique mitochondriale sont faiblement connus chez le parasite protozoaire *T. brucei*. Dans le trypanosome africain, bien que la fission soit essentielle lors de la division de la cellule pour le partage de la mitochondrie entre les deux cellules filles, aucune autre preuve de fission n'a été reportée lors du développement du parasite (Morgan et al. 2004) (Chanez et al. 2006) (Hughes et al. 2017). La réduction de l'expression de la protéine *TbMfnL* par ARN interférence conduit à une hyperfusion mitochondriale chez les formes sanguines, suggérant un rôle de cette protéine dans les processus de fission (Vanwalleghem et al. 2015). Cependant, nous n'avons pas pu reproduire ce résultat, et notre étude de la protéine *TbMfnL* montre clairement un rôle de celle-ci dans les processus de fusion.

Il est à noter que l'hyperfusion mitochondriale observée par (Vanwalleghem et al. 2015) a également été observée dans les formes sanguines sauvages, avec une augmentation du volume significative de la mitochondrie préalablement à la division du parasite, probablement permettant le partage de la mitochondrie dans les deux cellules filles (Hughes et al. 2017). Il conviendra de reproduire l'inhibition de l'expression de la protéine *TbMfnL* par ARN interférence dans les formes sanguines ce qui nous permettrait de conclure sur le phénotype de fenestration observé préalablement. Enfin, l'inactivation de l'expression de *TbMfnL* par CRISPR/Cas9 n'entraîne aucun changement structural de la mitochondrie, ce qui est en accord avec les précédentes études, qui suggéraient une très faible voire une absence de fission mitochondriale en dehors de la cytokinèse (Morgan et al. 2004) (Chanez et al. 2006). Il sera néanmoins intéressant de vérifier l'absence de changement et pour cela nous envisageons de quantifier le nombre de jonctions sur des cellules soumises à la technique d'expansion, ce qui devrait permettre une détection plus précise et facile du nombre de jonctions, aussi bien dans les formes procycliques que sanguines.

4.2.2. La fusion

Dans notre étude, nous avons démontré que la fusion mitochondriale a bien lieu dans la forme procyclique du parasite. Par contre dans les formes sanguines, nous n'avons pas pu mettre en évidence ce processus de fusion. La surexpression de *TbMfnL* dans ces formes pourrait ne pas être suffisante pour induire une hyperfusion mitochondriale. Néanmoins, la faible utilisation de la mitochondrie par la forme sanguine pourrait expliquer que la fusion mitochondriale n'a que très rarement lieu. Ainsi l'absence de phénotype lors de la surexpression ou de l'inactivation de l'expression de *TbMfnL* supporterait cette hypothèse. Il ne faut néanmoins pas oublier que d'autres complexes protéiques ou acteurs protéiques pourraient également être impliqués dans la structuration mitochondriale, comme les protéines POMP (Niemann et al. 2013) ou d'autres complexes mitochondriaux tels que MICOS (Kaurov et al. 2018) ou un potentiel complexe ERMES (données du laboratoire). L'altération d'une des voies structurant la mitochondrie pourrait être ainsi compensée par une autre.

Finalement, contrairement aux autres organismes qui pratiquent une dynamique mitochondriale intense (levure, cellules de mammifère), *T. brucei* ne semble déclencher celle-ci qu'à des moments-clés de son cycle cellulaire et/ou de son cycle de vie. Cela pourrait s'expliquer par la présence d'une mitochondrie unique, qui n'aurait pas besoin de mélanger son contenu matriciel, de répartir son ADN mitochondrial ou d'éliminer des mitochondries endommagées.

Nous pouvons supposer que le parasite utilise cette dynamique, notamment au moment du passage de l'hôte au vecteur et du vecteur à l'hôte, mais aussi lors des différentes différenciations du parasite chez l'hôte ou le vecteur. En effet, puisque chaque changement de conditions physiologiques/ environnementales induit un remodelage rapide des fonctions du parasite, celui-ci doit rapidement s'adapter pour assurer sa survie et son développement. Il est évident qu'une des prochaines étapes dans la poursuite de cette étude est l'analyse du cycle complet du parasite afin de déterminer si le cycle du parasite est affecté lorsque la structuration de la mitochondrie est altérée.

5. Bibliographie

- Acosta-Serrano, Alvaro, Erik Vassella, Matthias Liniger, Christina Kunz Renggli, Reto Brun, Isabel Roditi, et Paul T. Englund. 2001. « The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: Programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(4):1513-18.
- Agabian, N. 1990. « Trans Splicing of Nuclear Pre-MRNAs ». *Cell* 61(7):1157-60. doi: 10.1016/0092-8674(90)90674-4.
- Akimoto, Takayuki, Steven C. Pohnert, Ping Li, Mei Zhang, Curtis Gumbs, Paul B. Rosenberg, R. Sanders Williams, et Zhen Yan. 2005. « Exercise Stimulates Pgc-1alpha Transcription in Skeletal Muscle through Activation of the P38 MAPK Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 280(20):19587-93. doi: 10.1074/jbc.M408862200.
- Aksoy, Serap. 2019. « Tsetse Peritrophic Matrix Influences for Trypanosome Transmission ». *Journal of Insect Physiology* 118:103919. doi: 10.1016/j.jinsphys.2019.103919.
- Albisetti, Anna, Célia Florimond, Nicolas Landrein, Keni Vidilaseris, Marie Eggenspieler, Johannes Lesigang, Gang Dong, Derrick Roy Robinson, et Mélanie Bonhivers. 2017. « Interaction between the Flagellar Pocket Collar and the Hook Complex via a Novel Microtubule-Binding Protein in *Trypanosoma Brucei* ». *PLoS Pathogens* 13(11):e1006710. doi: 10.1371/journal.ppat.1006710.
- Allmann, Stefan, Pauline Morand, Charles Ebikeme, Lara Gales, Marc Biran, Jane Hubert, Ana Brennand, Muriel Mazet, Jean-Michel Franconi, Paul A. M. Michels, Jean-Charles Portais, Michael Boshart, et Frédéric Bringaud. 2013. « Cytosolic NADPH Homeostasis in Glucose-Starved Procyclic *Trypanosoma Brucei* Relies on Malic Enzyme and the Pentose Phosphate Pathway Fed by Gluconeogenic Flux ». *The Journal of Biological Chemistry* 288(25):18494-505. doi: 10.1074/jbc.M113.462978.
- Allsopp, R. 1984. « Control of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) using insecticides: a review and future prospects ».
- Alsford, S., B. Wickstead, K. Ersfeld, et K. Gull. 2001. « Diversity and Dynamics of the Minichromosomal Karyotype in *Trypanosoma Brucei* ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 113(1):79-88. doi: 10.1016/s0166-6851(00)00388-1.
- Alsford, Sam, Daniel J. Turner, Samson O. Obado, Alejandro Sanchez-Flores, Lucy Glover, Matthew Berriman, Christiane Hertz-Fowler, et David Horn. 2011. « High-Throughput Phenotyping Using Parallel Sequencing of RNA Interference Targets in the African Trypanosome ». *Genome Research* 21(6):915-24. doi: 10.1101/gr.115089.110.
- Ardail, D., J. P. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerme, et P. Louisot. 1990. « Mitochondrial Contact Sites. Lipid Composition and Dynamics ». *The Journal of Biological Chemistry* 265(31):18797-802.
- Ball, Writoban Basu, John K. Neff, et Vishal M. Gohil. 2018. « The role of non-bilayer phospholipids in mitochondrial structure and function ». *FEBS letters* 592(8):1273-90. doi: 10.1002/1873-3468.12887.
- Balogun, R. A. 1974. « Studies on the Amino Acids of the Tsetse Fly, *Glossina Morsitans*, Maintained on in Vitro and in Vivo Feeding Systems ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 49(2):215-22. doi: 10.1016/0300-9629(74)90110-8.

- Ban, Tadato, Jürgen A. W. Heymann, Zhiyin Song, Jenny E. Hinshaw, et David C. Chan. 2010. « OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation ». *Human Molecular Genetics* 19(11):2113-22. doi: 10.1093/hmg/ddq088.
- Ban, Tadato, Takaya Ishihara, Hiroto Kohno, Shotaro Saita, Ayaka Ichimura, Katsumi Maenaka, Toshihiko Oka, Katsuyoshi Mihara, et Naotada Ishihara. 2017. « Molecular Basis of Selective Mitochondrial Fusion by Heterotypic Action between OPA1 and Cardiolipin ». *Nature Cell Biology* 19(7):856-63. doi: 10.1038/ncb3560.
- Baral, Toya Nath. 2010. « Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010:389153. doi: 10.1155/2010/389153.
- Bayrhuber, Monika, Thomas Meins, Michael Habeck, Stefan Becker, Karin Giller, Saskia Villinger, Clemens Vornrhein, Christian Griesinger, Markus Zweckstetter, et Kornelius Zeth. 2008. « Structure of the Human Voltage-Dependent Anion Channel ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(40):15370-75. doi: 10.1073/pnas.0808115105.
- Benne, R., J. Van den Burg, J. P. Brakenhoff, P. Sloof, J. H. Van Boom, et 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):819-26. doi: 10.1016/0092-8674(86)90063-2.
- Berriman, Matthew, Elodie Ghedin, Christiane Hertz-Fowler, Gaëlle Blandin, Hubert Renault, Daniella C. Bartholomeu, Nicola J. Lennard, Elisabet Caler, Nancy E. Hamlin, Brian Haas, Ulrike Böhme, Linda Hannick, Martin A. Aslett, Joshua Shallom, Lucio Marcello, Lihua Hou, Bill Wickstead, U. Cecilia M. Alsmark, Claire Arrowsmith, Rebecca J. Atkin, Andrew J. Barron, Frederic Bringaud, Karen Brooks, Mark Carrington, Inna Cherevach, Tracey-Jane Chillingworth, Carol Churcher, Louise N. Clark, Craig H. Corton, Ann Cronin, Rob M. Davies, Jonathon Doggett, Appolinaire Djikeng, Tamara Feldblyum, Mark C. Field, Audrey Fraser, Ian Goodhead, Zahra Hance, David Harper, Barbara R. Harris, Heidi Hauser, Jessica Hostetler, Al Ivens, Kay Jagels, David Johnson, Justin Johnson, Kristine Jones, Arnaud X. Kerhornou, Hean Koo, Natasha Larke, Scott Landfear, Christopher Larkin, Vanessa Leech, Alexandra Line, Angela Lord, Annette Macleod, Paul J. Mooney, Sharon Moule, David M. A. Martin, Gareth W. Morgan, Karen Mungall, Halina Norbertczak, Doug Ormond, Grace Pai, Chris S. Peacock, Jeremy Peterson, Michael A. Quail, Ester Rabinowitsch, Marie-Adele Rajandream, Chris Reitter, Steven L. Salzberg, Mandy Sanders, Seth Schobel, Sarah Sharp, Mark Simmonds, Anjana J. Simpson, Luke Tallon, C. Michael R. Turner, Andrew Tait, Adrian R. Tivey, Susan Van Aken, Danielle Walker, David Wanless, Shiliang Wang, Brian White, Owen White, Sally Whitehead, John Woodward, Jennifer Wortman, Mark D. Adams, T. Martin Embley, Keith Gull, Elisabetta Ullu, J. David Barry, Alan H. Fairlamb, Fred Opperdoes, Barclay G. Barrell, John E. Donelson, Neil Hall, Claire M. Fraser, Sara E. Melville, et Najib M. El-Sayed. 2005. « The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma Brucei* ». *Science (New York, N.Y.)* 309(5733):416-22. doi: 10.1126/science.1112642.
- Besteiro, Sébastien, Marc Biran, Nicolas Biteau, Virginie Coustou, Théo Baltz, Paul Canioni, et Frédéric Bringaud. 2002. « Succinate Secreted by *Trypanosoma Brucei* Is Produced by a Novel and Unique Glycosomal Enzyme, NADH-Dependent Fumarate

- Reductase ». *The Journal of Biological Chemistry* 277(41):38001-12. doi: 10.1074/jbc.M201759200.
- Bhatia-Kissova, Ingrid, et Nadine Camougrand. 2021. « Mitophagy in Yeast: Decades of Research ». *Cells* 10(12):3541. doi: 10.3390/cells10123541.
- Biebinger, S., L. E. Wirtz, P. Lorenz, et C. Clayton. 1997. « Vectors for Inducible Expression of Toxic Gene Products in Bloodstream and Procyclic Trypanosoma Brucei ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 85(1):99-112. doi: 10.1016/s0166-6851(96)02815-0.
- Bílý, Tomáš, Shaghayegh Sheikh, Adeline Mallet, Philippe Bastin, David Pérez-Morga, Julius Lukeš, et Hassan Hashimi. s. d. « Ultrastructural Changes of the Mitochondrion During the Life Cycle of Trypanosoma Brucei ». *Journal of Eukaryotic Microbiology* n/a(n/a):e12846. doi: <https://doi.org/10.1111/jeu.12846>.
- Blancard, Corinne, et Bénédicte Salin. 2017. « Plunge Freezing: A Tool for the Ultrastructural and Immunolocalization Studies of Suspension Cells in Transmission Electron Microscopy ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (123). doi: 10.3791/54874.
- Bleazard, W., J. M. McCaffery, E. J. King, S. Bale, A. Mozdy, Q. Tieu, J. Nunnari, et J. M. Shaw. 1999. « The Dynamin-Related GTPase Dnm1 Regulates Mitochondrial Fission in Yeast ». *Nature Cell Biology* 1(5):298-304. doi: 10.1038/13014.
- Boldogh, Istvan R., Dan W. Nowakowski, Hyeong-Cheol Yang, Haesung Chung, Sharon Karmon, Patrina Royes, et Liza A. Pon. 2003. « A Protein Complex Containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p Links Mitochondrial Membranes and DNA to the Cytoskeleton-based Segregation Machinery ». *Molecular Biology of the Cell* 14(11):4618-27. doi: 10.1091/mbc.E03-04-0225.
- Breinich, Manuela S., David J. P. Ferguson, Bernardo J. Foth, Giel G. van Dooren, Maryse Lebrun, Doris V. Quon, Boris Striepen, Peter J. Bradley, Friedrich Frischknecht, Vern B. Carruthers, et Markus Meissner. 2009. « A Dynamin Is Required for the Biogenesis of Secretory Organelles in Toxoplasma Gondii ». *Current Biology: CB* 19(4):277-86. doi: 10.1016/j.cub.2009.01.039.
- de Brito, Olga Martins, et Luca Scorrano. 2008. « Mitofusin 2 Tethers Endoplasmic Reticulum to Mitochondria ». *Nature* 456(7222):605-10. doi: 10.1038/nature07534.
- Brun, R., et null Schönenberger. 1979. « Cultivation and in Vitro Cloning or Procyclic Culture Forms of Trypanosoma Brucei in a Semi-Defined Medium. Short Communication ». *Acta Tropica* 36(3):289-92.
- Cao, Yu-Lu, Shuxia Meng, Yang Chen, Jian-Xiong Feng, Dong-Dong Gu, Bing Yu, Yu-Jie Li, Jin-Yu Yang, Shuang Liao, David C. Chan, et Song Gao. 2017. « MFN1 Structures Reveal Nucleotide-Triggered Dimerization Critical for Mitochondrial Fusion ». *Nature* 542(7641):372-76. doi: 10.1038/nature21077.
- Cardanho-Ramos, Carlos, et Vanessa Alexandra Morais. 2021. « Mitochondrial Biogenesis in Neurons: How and Where ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(23):13059. doi: 10.3390/ijms222313059.

- Cervený, Kara L., Seth L. Studer, Robert E. Jensen, et Hiromi Sesaki. 2007. « Yeast Mitochondrial Division and Distribution Require the Cortical Num1 Protein ». *Developmental Cell* 12(3):363-75. doi: 10.1016/j.devcel.2007.01.017.
- Chan, David C. 2020. « Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease ». *Annual Review of Pathology* 15:235-59. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711.
- Chanez, A. L., A. B. Hehl, M. Engstler, et A. Schneider. 2006. « Ablation of the Single Dynamin of *T. Brucei* Blocks Mitochondrial Fission and Endocytosis and Leads to a Precise Cytokinesis Arrest ». *Journal of Cell Science* 119(14):2968-74. doi: 10.1242/jcs.03023.
- Chang, Chuang-Rung, et Craig Blackstone. 2007. « Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(30):21583-87. doi: 10.1074/jbc.C700083200.
- Charneau, Sébastien, Izabela M. Dourado Bastos, Elisabeth Mouray, Bergmann Morais Ribeiro, Jaime M. Santana, Philippe Grellier, et Isabelle Florent. 2007. « Characterization of PfDYN2, a Dynamin-like Protein of *Plasmodium falciparum* Expressed in Schizonts ». *Microbes and Infection* 9(7):797-805. doi: 10.1016/j.micinf.2007.02.020.
- Chaudhuri, Minu, Robert Daniel Ott, et George C. Hill. 2006. « Trypanosome Alternative Oxidase: From Molecule to Function ». *Trends in Parasitology* 22(10):484-91. doi: 10.1016/j.pt.2006.08.007.
- Checchi, Francesco, João A. N. Filipe, Michael P. Barrett, et Daniel Chandramohan. 2008. « The Natural Progression of Gambiense Sleeping Sickness: What Is the Evidence? ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2(12):e303. doi: 10.1371/journal.pntd.0000303.
- Checchi, Francesco, João A. N. Filipe, Daniel T. Haydon, Daniel Chandramohan, et François Chappuis. 2008. « Estimates of the Duration of the Early and Late Stage of Gambiense Sleeping Sickness ». *BMC Infectious Diseases* 8:16. doi: 10.1186/1471-2334-8-16.
- Chen, Hsiuchen, Scott A. Detmer, Andrew J. Ewald, Erik E. Griffin, Scott E. Fraser, et David C. Chan. 2003. « Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development ». *The Journal of Cell Biology* 160(2):189-200. doi: 10.1083/jcb.200211046.
- Chen, Hsiuchen, Marc Vermulst, Yun E. Wang, Anne Chomyn, Tomas A. Prolla, J. Michael McCaffery, et David C. Chan. 2010. « Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations ». *Cell* 141(2):280-89. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.026.
- Chen, Yun, et Gerald W. Dorn. 2013. « PINK1-Phosphorylated Mitofusin 2 Is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria ». *Science (New York, N.Y.)* 340(6131):471-75. doi: 10.1126/science.1231031.
- Choi, Seok-Yong, Ping Huang, Gary M. Jenkins, David C. Chan, Juergen Schiller, et Michael A. Frohman. 2006. « A Common Lipid Links Mfn-Mediated Mitochondrial Fusion and

- SNARE-Regulated Exocytosis ». *Nature Cell Biology* 8(11):1255-62. doi: 10.1038/ncb1487.
- Cipolat, S., O. M. de Brito, B. Dal Zilio, et L. Scorrano. 2004. « OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(45):15927-32. doi: 10.1073/pnas.0407043101.
- Claros, M. G., et P. Vincens. 1996. « Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and Their Targeting Sequences ». *European Journal of Biochemistry* 241(3):779-86. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00779.x.
- Cogliati, Sara, Christian Frezza, Maria Eugenia Soriano, Tatiana Varanita, Ruben Quintana-Cabrera, Mauro Corrado, Sara Cipolat, Veronica Costa, Alberto Casarin, Ligia C. Gomes, Ester Perales-Clemente, Leonardo Salviati, Patricio Fernandez-Silva, Jose A. Enriquez, et Luca Scorrano. 2013. « Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency ». *Cell* 155(1):160-71. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.032.
- Cohen, Yifat, Yoel Alexander Klug, Lazar Dimitrov, Zohar Erez, Silvia G. Chuartzman, Dalia Elinger, Ido Yofe, Kareem Soliman, Jutta Gärtner, Sven Thoms, Randy Schekman, Yael Elbaz-Alon, Einat Zalckvar, et Maya Schuldiner. 2014. « Peroxisomes Are Juxtaposed to Strategic Sites on Mitochondria ». *Molecular BioSystems* 10(7):1742-48. doi: 10.1039/c4mb00001c.
- Cowman, Alan F., Julie Healer, Danushka Marapana, et Kevin Marsh. 2016. « Malaria: Biology and Disease ». *Cell* 167(3):610-24. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055.
- Cox, Francis E. G. 2004. « History of Sleeping Sickness (African Trypanosomiasis) ». *Infectious Disease Clinics of North America* 18(2):231-45. doi: 10.1016/j.idc.2004.01.004.
- Cross, George A. M., Hee-Sook Kim, et Bill Wickstead. 2014. « Capturing the Variant Surface Glycoprotein Repertoire (the VSGnome) of Trypanosoma Brucei Lister 427 ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 195(1):59-73. doi: 10.1016/j.molbiopara.2014.06.004.
- Cui, Liujuan, et Pingsheng Liu. 2020. « Two Types of Contact Between Lipid Droplets and Mitochondria ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.
- Cuisance, Dominique. 1989. *Le piégeage des tsé-tsé*. Institut d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux.
- Daste, Frédéric, Cécile Sauvanet, Andrej Bavdek, James Baye, Fabienne Pierre, Rémi Le Borgne, Claudine David, Manuel Rojo, Patrick Fuchs, et David Tareste. 2018. « The heptad repeat domain 1 of Mitofusin has membrane destabilization function in mitochondrial fusion ». *EMBO Reports* 19(6):e43637. doi: 10.15252/embr.201643637.
- Daum, G. 1985. « Lipids of Mitochondria ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 822(1):1-42. doi: 10.1016/0304-4157(85)90002-4.
- Dean, Samuel, Jack D. Sunter, et Richard J. Wheeler. 2017. « TrypTag.org: A Trypanosome Genome-wide Protein Localisation Resource ». *Trends in Parasitology* 33(2):80-82. doi: 10.1016/j.pt.2016.10.009.

- Dean, Samuel, Jack Sunter, Richard J. Wheeler, Ian Hodgkinson, Eva Gluenz, et Keith Gull. 2015. « A Toolkit Enabling Efficient, Scalable and Reproducible Gene Tagging in Trypanosomatids ». *Open Biology* 5(1):140197. doi: 10.1098/rsob.140197.
- Delettre, C., G. Lenaers, J. M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquelléc, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan, et C. P. Hamel. 2000. « Nuclear Gene OPA1, Encoding a Mitochondrial Dynamin-Related Protein, Is Mutated in Dominant Optic Atrophy ». *Nature Genetics* 26(2):207-10. doi: 10.1038/79936.
- Delghandi, Marit Pedersen, Mona Johannessen, et Ugo Moens. 2005. « The CAMP Signalling Pathway Activates CREB through PKA, P38 and MSK1 in NIH 3T3 Cells ». *Cellular Signalling* 17(11):1343-51. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.02.003.
- DeVay, Rachel M., Lenin Dominguez-Ramirez, Laura L. Lackner, Suzanne Hoppins, Henning Stahlberg, et Jodi Nunnari. 2009. « Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion ». *The Journal of Cell Biology* 186(6):793-803. doi: 10.1083/jcb.200906098.
- Dickie, Emily A., Federica Giordani, Matthew K. Gould, Pascal Mäser, Christian Burri, Jeremy C. Mottram, Srinivasa P. S. Rao, et Michael P. Barrett. 2020. « New Drugs for Human African Trypanosomiasis: A Twenty First Century Success Story ». *Tropical Medicine and Infectious Disease* 5(1):E29. doi: 10.3390/tropicalmed5010029.
- DiMaio, John, Gordon Ruthel, Joshua J. Cannon, Madeline F. Malfara, et Megan L. Povelones. 2018. « The single mitochondrion of the kinetoplastid parasite *Crithidia fasciculata* is a dynamic network ». *PLoS ONE* 13(12):e0202711. doi: 10.1371/journal.pone.0202711.
- van Dooren, Giel G., Sarah B. Reiff, Cveta Tomova, Markus Meissner, Bruno M. Humbel, et Boris Striepen. 2009. « An novel dynamin-related protein has been recruited for apicoplast fission in *Toxoplasma gondii* ». *Current biology: CB* 19(4):267-76. doi: 10.1016/j.cub.2008.12.048.
- Duncan, Melanie R., Marjorie Fullerton, et Minu Chaudhuri. 2013. « Tim50 in *Trypanosoma brucei* Possesses a Dual Specificity Phosphatase Activity and Is Critical for Mitochondrial Protein Import ». *The Journal of Biological Chemistry* 288(5):3184-97. doi: 10.1074/jbc.M112.436378.
- Duvezin-Caubet, Stéphane, Ravi Jagasia, Johannes Wagener, Sabine Hofmann, Aleksandra Trifunovic, Anna Hansson, Anne Chomyn, Matthias F. Bauer, Giuseppe Attardi, Nils-Göran Larsson, Walter Neupert, et Andreas S. Reichert. 2006. « Proteolytic Processing of OPA1 Links Mitochondrial Dysfunction to Alterations in Mitochondrial Morphology ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(49):37972-79. doi: 10.1074/jbc.M606059200.
- Dyck, Victor Arnold, J. Hendrichs, et A. S. Robinson, éd. 2005. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Eckers, Elisabeth, Marek Cyrklaff, Larry Simpson, et Marcel Deponte. 2012. « Mitochondrial Protein Import Pathways Are Functionally Conserved among Eukaryotes despite

- Compositional Diversity of the Import Machineries ». *Biological Chemistry* 393(6):513-24. doi: 10.1515/hsz-2011-0255.
- Ehse, Sarah, Ines Raschke, Giuseppe Mancuso, Andrea Bernacchia, Stefan Geimer, Daniel Tondera, Jean-Claude Martinou, Benedikt Westermann, Elena I. Rugarli, et Thomas Langer. 2009. « Regulation of OPA1 Processing and Mitochondrial Fusion by M-AAA Protease Isoenzymes and OMA1 ». *The Journal of Cell Biology* 187(7):1023-36. doi: 10.1083/jcb.200906084.
- El Fissi, Najla, Manuel Rojo, Aïcha Aouane, Esra Karatas, Gabriela Poliacikova, Claudine David, Julien Royet, et Thomas Rival. 2018. « Mitofusin Gain and Loss of Function Drive Pathogenesis in *Drosophila* Models of CMT 2A Neuropathy ». *EMBO Reports* 19(8). doi: 10.15252/embr.201745241.
- Elachouri, Ghizlane, Sara Vidoni, Claudia Zanna, Alexandre Pattyn, Hassan Boukhaddaoui, Karen Gaget, Patrick Yu-Wai-Man, Giuseppe Gasparre, Emmanuelle Sarzi, Cécile Delettre, Aurélien Olichon, Dominique Loiseau, Pascal Reynier, Patrick F. Chinnery, Agnès Rotig, Valerio Carelli, Christian P. Hamel, Michela Rugolo, et Guy Lenaers. 2011. « OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution ». *Genome Research* 21(1):12-20. doi: 10.1101/gr.108696.110.
- Elgass, Kirstin, Julian Pakay, Michael T. Ryan, et Catherine S. Palmer. 2013. « Recent Advances into the Understanding of Mitochondrial Fission ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833(1):150-61. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.002.
- Elmore, S. P., T. Qian, S. F. Grissom, et J. J. Lemasters. 2001. « The Mitochondrial Permeability Transition Initiates Autophagy in Rat Hepatocytes ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(12):2286-87. doi: 10.1096/fj.01-0206fje.
- Elsen, P., M. A. Amoudi, et M. Leclercq. 1990. « First Record of *Glossina Fuscipes Fuscipes* Newstead, 1910 and *Glossina Morsitans Morsitans* Newstead, 1910 in Southwestern Saudi Arabia ». *Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale* 70(4):281-87.
- Ersfeld, Klaus. 2011. « Nuclear Architecture, Genome and Chromatin Organisation in *Trypanosoma Brucei* ». *Research in Microbiology* 162(6):626-36. doi: 10.1016/j.resmic.2011.01.014.
- Eura, Yuka, Naotada Ishihara, Sadaki Yokota, et Katsuyoshi Mihara. 2003. « Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion ». *Journal of Biochemistry* 134(3):333-44. doi: 10.1093/jb/mvg150.
- Evans, M. J., et R. C. Scarpulla. 1990. « NRF-1: A Trans-Activator of Nuclear-Encoded Respiratory Genes in Animal Cells ». *Genes & Development* 4(6):1023-34. doi: 10.1101/gad.4.6.1023.
- Fan, Jinjiang, Xinlu Li, Leeyah Issop, Martine Culty, et Vassilios Papadopoulos. 2016. « ACBD2/EC12-Mediated Peroxisome-Mitochondria Interactions in Leydig Cell Steroid Biosynthesis ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 30(7):763-82. doi: 10.1210/me.2016-1008.

- Fenn, Katelyn, et Keith R. Matthews. 2007. « The Cell Biology of Trypanosoma Brucei Differentiation ». *Current Opinion in Microbiology* 10(6):539-46. doi: 10.1016/j.mib.2007.09.014.
- Figueroa-Romero, Claudia, Jorge A. Iñiguez-Lluhí, Julia Stadler, Chuang-Rung Chang, Damien Arnoult, Peter J. Keller, Yu Hong, Craig Blackstone, et Eva L. Feldman. 2009. « SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle ». *The FASEB Journal* 23(11):3917-27. doi: 10.1096/fj.09-136630.
- Flint, S. 1985. « A Comparison of Various Traps for Glossina Spp. (Glossinidae) and Other Diptera ». *Bulletin of Entomological Research* 75(3):529-34. doi: 10.1017/S0007485300014620.
- Franco, Jose R., Giuliano Cecchi, Massimo Paone, Abdoulaye Diarra, Lise Grout, Augustin Kadima Ebeja, Pere P. Simarro, Weining Zhao, et Daniel Argaw. 2022. « The Elimination of Human African Trypanosomiasis: Achievements in Relation to WHO Road Map Targets for 2020 ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 16(1):e0010047. doi: 10.1371/journal.pntd.0010047.
- Friedman, Jonathan R., Laura L. Lackner, Matthew West, Jared R. DiBenedetto, Jodi Nunnari, et Gia K. Voeltz. 2011. « ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division ». *Science (New York, N.Y.)* 334(6054):358-62. doi: 10.1126/science.1207385.
- Gandre-Babbe, Shilpa, et Alexander M. van der Blik. 2008. « The Novel Tail-Anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 19(6):2402-12. doi: 10.1091/mbc.e07-12-1287.
- Ge, Preston, Valina L. Dawson, et Ted M. Dawson. 2020. « PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease ». *Molecular Neurodegeneration* 15(1):20. doi: 10.1186/s13024-020-00367-7.
- Gegg, Matthew E., J. Mark Cooper, Kai-Yin Chau, Manuel Rojo, Anthony H. V. Schapira, et Jan-Willem Taanman. 2010. « Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy ». *Human Molecular Genetics* 19(24):4861-70. doi: 10.1093/hmg/ddq419.
- Geisler, Sven, Kira M. Holmström, Diana Skujat, Fabienne C. Fiesel, Oliver C. Rothfuss, Philipp J. Kahle, et Wolf Dieter Springer. 2010. « PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy Is Dependent on VDAC1 and P62/SQSTM1 ». *Nature Cell Biology* 12(2):119-31. doi: 10.1038/ncb2012.
- Gilkerson, Robert W., Jeanne M. L. Selker, et Roderick A. Capaldi. 2003. « The Cristal Membrane of Mitochondria Is the Principal Site of Oxidative Phosphorylation ». *FEBS Letters* 546(2-3):355-58. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00633-1.
- Glauser, Liliane, Sarah Sonnay, Klodjan Stafa, et Darren J. Moore. 2011. « Parkin Promotes the Ubiquitination and Degradation of the Mitochondrial Fusion Factor Mitofusin 1 ». *Journal of Neurochemistry* 118(4):636-45. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07318.x.
- Green, C. H. 1988. « The effect of colour on trap- and screen-orientated responses in *Glossina palpalis palpalis* ». Consulté 12 juillet 2022 (<https://www.cambridge.org/core/journals/bulletin-of-entomological-research/article/effect-of-colour-on-trap-and-screenorientated-responses-in-glossina>

palpalis-palpalis-robineaudesvoidy-diptera-glossinidae/9BB632F68AF0BA26E9A1002225BD5F76).

- Green, C. H. 1989. « The use of two-coloured screens for catching *Glossina palpalis palpalis* ».
- Green, C. H. 1994. « Bait Methods for Tsetse Fly Control ». *Advances in Parasitology* 34:229-91. doi: 10.1016/s0065-308x(08)60140-2.
- Griffin, Erik E., Johannes Graumann, et David C. Chan. 2005. « The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria ». *The Journal of Cell Biology* 170(2):237-48. doi: 10.1083/jcb.200503148.
- Griparic, Lorena, Takayuki Kanazawa, et Alexander M. van der Bliek. 2007. « Regulation of the Mitochondrial Dynamin-like Protein Opa1 by Proteolytic Cleavage ». *The Journal of Cell Biology* 178(5):757-64. doi: 10.1083/jcb.200704112.
- Hales, K. G., et M. T. Fuller. 1997. « Developmentally Regulated Mitochondrial Fusion Mediated by a Conserved, Novel, Predicted GTPase ». *Cell* 90(1):121-29. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80319-0.
- Hall, James P. J., Huanhuan Wang, et J. David Barry. 2013. « Mosaic VSGs and the Scale of *Trypanosoma Brucei* Antigenic Variation ». *PLoS Pathogens* 9(7):e1003502. doi: 10.1371/journal.ppat.1003502.
- Hammermeister, Miriam, Kerstin Schödel, et Benedikt Westermann. 2010. « Mdm36 Is a Mitochondrial Fission-promoting Protein in *Saccharomyces cerevisiae* ». *Molecular Biology of the Cell* 21(14):2443-52. doi: 10.1091/mbc.E10-02-0096.
- Harner, Max, Christian Körner, Dirk Walther, Dejana Mokranjac, Johannes Kaesmacher, Ulrich Welsch, Janice Griffith, Matthias Mann, Fulvio Reggiori, et Walter Neupert. 2011. « The Mitochondrial Contact Site Complex, a Determinant of Mitochondrial Architecture ». *The EMBO Journal* 30(21):4356-70. doi: 10.1038/emboj.2011.379.
- Head, Brian, Lorena Griparic, Mandana Amiri, Shilpa Gandre-Babbe, et Alexander M. van der Bliek. 2009. « Inducible Proteolytic Inactivation of OPA1 Mediated by the OMA1 Protease in Mammalian Cells ». *The Journal of Cell Biology* 187(7):959-66. doi: 10.1083/jcb.200906083.
- Heisch, R. B., J. P. McMAHON, et P. E. Mansonbahr. 1958. « The Isolation of *Trypanosoma Rhodesiense* from a Bushbuck ». *British Medical Journal* 2(5106):1203-4. doi: 10.1136/bmj.2.5106.1203.
- Heredero-Bermejo, Irene, Joseph M. Varberg, Robert Charvat, Kylie Jacobs, Tamila Garbuz, William J. Sullivan, et Gustavo Arrizabalaga. 2019. « TgDrpC, an Atypical Dynamin-Related Protein in *Toxoplasma Gondii*, Is Associated with Vesicular Transport Factors and Parasite Division ». *Molecular Microbiology* 111(1):46-64. doi: 10.1111/mmi.14138.
- Herman, Murielle, Stuart Gillies, Paul A. Michels, et Daniel J. Rigden. 2006. « Autophagy and Related Processes in Trypanosomatids: Insights from Genomic and Bioinformatic Analyses ». *Autophagy* 2(2):107-18. doi: 10.4161/auto.2.2.2369.

- Herman, Murielle, David Pérez-Morga, Nicolas Schtickzelle, et Paul A. M. Michels. 2008. « Turnover of Glycosomes during Life-Cycle Differentiation of *Trypanosoma Brucei* ». *Autophagy* 4(3):294-308. doi: 10.4161/auto.5443.
- Hermann, G. J., J. W. Thatcher, J. P. Mills, K. G. Hales, M. T. Fuller, J. Nunnari, et J. M. Shaw. 1998. « Mitochondrial Fusion in Yeast Requires the Transmembrane GTPase Fzo1p ». *The Journal of Cell Biology* 143(2):359-73. doi: 10.1083/jcb.143.2.359.
- Hertz-Fowler, Christiane, Luisa M. Figueiredo, Michael A. Quail, Marion Becker, Andrew Jackson, Nathalie Bason, Karen Brooks, Carol Churcher, Samah Fahkro, Ian Goodhead, Paul Heath, Magdalena Kartvelishvili, Karen Mungall, David Harris, Heidi Hauser, Mandy Sanders, David Saunders, Kathy Seeger, Sarah Sharp, Jesse E. Taylor, Danielle Walker, Brian White, Rosanna Young, George A. M. Cross, Gloria Rudenko, J. David Barry, Edward J. Louis, et Matthew Berriman. 2008. « Telomeric Expression Sites Are Highly Conserved in *Trypanosoma Brucei* ». *PloS One* 3(10):e3527. doi: 10.1371/journal.pone.0003527.
- Herzig, S., F. Long, U. S. Jhala, S. Hedrick, R. Quinn, A. Bauer, D. Rudolph, G. Schutz, C. Yoon, P. Puigserver, B. Spiegelman, et M. Montminy. 2001. « CREB Regulates Hepatic Gluconeogenesis through the Coactivator PGC-1 ». *Nature* 413(6852):179-83. doi: 10.1038/35093131.
- Hide, G., N. Buchanan, S. Welburn, I. Maudlin, J. D. Barry, et A. Tait. 1991. « *Trypanosoma Brucei* Rhodesiense: Characterisation of Stocks from Zambia, Kenya, and Uganda Using Repetitive DNA Probes ». *Experimental Parasitology* 72(4):430-39. doi: 10.1016/0014-4894(91)90089-f.
- Hill, K., K. Model, M. T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner, et N. Pfanner. 1998. « Tom40 Forms the Hydrophilic Channel of the Mitochondrial Import Pore for Preproteins [See Comment] ». *Nature* 395(6701):516-21. doi: 10.1038/26780.
- Hirumi, Hiroyuki, et Kazuko Hirumi. 1989. « Continuous Cultivation of *Trypanosoma brucei* Blood Stream Forms in a Medium Containing a Low Concentration of Serum Protein without Feeder Cell Layers ». *The Journal of Parasitology* 75(6):985-89. doi: 10.2307/3282883.
- Hoare, C. A. 1966. « The Classification of Mammalian Trypanosomes ». *Ergebnisse Der Mikrobiologie, Immunitätsforschung Und Experimentellen Therapie* 39:43-57. doi: 10.1007/978-3-662-38353-7_3.
- Hoppins, Suzanne, Sean R. Collins, Ann Cassidy-Stone, Eric Hummel, Rachel M. Devay, Laura L. Lackner, Benedikt Westermann, Maya Schuldiner, Jonathan S. Weissman, et Jodi Nunnari. 2011. « A Mitochondrial-Focused Genetic Interaction Map Reveals a Scaffold-like Complex Required for Inner Membrane Organization in Mitochondria ». *The Journal of Cell Biology* 195(2):323-40. doi: 10.1083/jcb.201107053.
- Horváth, Anton, Eva Horáková, Petra Dunajčíková, Zdenek Verner, Eliska Pravdová, Iveta Slapetová, L'udmila Cuninková, et Julius 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* ». *Molecular Microbiology* 58(1):116-30. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04813.x.

- Horwich, A. L., F. Kalousek, I. Mellman, et L. E. Rosenberg. 1985. « A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. » *The EMBO Journal* 4(5):1129-35.
- Hughes, Louise, Samantha Borrett, Katie Towers, Tobias Starborg, et Sue Vaughan. 2017. « Patterns of Organelle Ontogeny through a Cell Cycle Revealed by Whole Cell Reconstructions Using 3D Electron Microscopy ». *Journal of Cell Science* jcs.198887. doi: 10.1242/jcs.198887.
- Hurt, E. C., B. Pesold-Hurt, et G. Schatz. 1984. « The Cleavable Prepiece of an Imported Mitochondrial Protein Is Sufficient to Direct Cytosolic Dihydrofolate Reductase into the Mitochondrial Matrix ». *FEBS Letters* 178(2):306-10. doi: 10.1016/0014-5793(84)80622-5.
- Ilemobade, A. A. 2009. « Tsetse and Trypanosomosis in Africa: The Challenges, the Opportunities ». *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 76(1):35-40. doi: 10.4102/ojvr.v76i1.59.
- Ishihara, N. 2004. « Mitofusin 1 and 2 Play Distinct Roles in Mitochondrial Fusion Reactions via GTPase Activity ». *Journal of Cell Science* 117(26):6535-46. doi: 10.1242/jcs.01565.
- Iyer, Advaita, Moritz Niemann, Mauro Serricchio, Caroline E. Dewar, Silke Oeljeklaus, Luce Farine, Bettina Warscheid, André Schneider, et Peter Bütikofer. 2022. « The Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex Localizes to the Mitochondrial - Endoplasmic Reticulum Interface and Its Subunits Modulate Phospholipid Biosynthesis in Trypanosoma Brucei » édité par K. L. Hill. *PLOS Pathogens* 18(5):e1009717. doi: 10.1371/journal.ppat.1009717.
- James, Dominic I., Philippe A. Parone, Yves Mattenberger, et Jean-Claude Martinou. 2003. « Hfis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(38):36373-79. doi: 10.1074/jbc.M303758200.
- Jamonneau, V., A. Garcia, S. Ravel, G. Cuny, B. Oury, P. Solano, P. N'Guessan, L. N'Dri, et R. Sanon. 2002. « Genetic Characterization of Trypanosoma Brucei Gambiense and Clinical Evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire ». *Tropical Medicine and International Health* 7(7):12.
- Jamonneau, Vincent, Hamidou Ilboudo, Jacques Kaboré, Dramane Kaba, Mathurin Koffi, Philippe Solano, André Garcia, David Courtin, Claude Laveissière, Kouakou Lingue, Philippe Büscher, et Bruno Bucheton. 2012. « Untreated Human Infections by Trypanosoma Brucei Gambiense Are Not 100% Fatal ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(6):e1691. doi: 10.1371/journal.pntd.0001691.
- John, George B., Yonglei Shang, Li Li, Christian Renken, Carmen A. Mannella, Jeanne M. L. Selker, Linda Rangell, Michael J. Bennett, et Jiping Zha. 2005. « The Mitochondrial Inner Membrane Protein Mitofilin Controls Cristae Morphology ». *Molecular Biology of the Cell* 16(3):1543-54. doi: 10.1091/mbc.e04-08-0697.
- Joshi, Amit S., Morgan N. Thompson, Naomi Fei, Maik Hüttemann, et Miriam L. Greenberg. 2012. « Cardiolipin and Mitochondrial Phosphatidylethanolamine Have Overlapping

- Functions in Mitochondrial Fusion in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Journal of Biological Chemistry* 287(21):17589-97. doi: 10.1074/jbc.M111.330167.
- Kanki, Tomotake, et Daniel J. Klionsky. 2008. « Mitophagy in Yeast Occurs through a Selective Mechanism ». *The Journal of Biological Chemistry* 283(47):32386-93. doi: 10.1074/jbc.M802403200.
- Kanki, Tomotake, Ke Wang, Yang Cao, Misuzu Baba, et Daniel J. Klionsky. 2009. « Atg32 Is a Mitochondrial Protein That Confers Selectivity during Mitophagy ». *Developmental Cell* 17(1):98-109. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.014.
- Karbowski, Mariusz, Albert Neutzner, et Richard J. Youle. 2007. « The Mitochondrial E3 Ubiquitin Ligase MARCH5 Is Required for Drp1 Dependent Mitochondrial Division ». *The Journal of Cell Biology* 178(1):71-84. doi: 10.1083/jcb.200611064.
- Käser, Sandro, Silke Oeljeklaus, Jiří Týč, Sue Vaughan, Bettina Warscheid, et André Schneider. 2016. « Outer membrane protein functions as integrator of protein import and DNA inheritance in mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(31):E4467-75. doi: 10.1073/pnas.1605497113.
- Kaurov, Iosif, Marie Vancová, Bernd Schimanski, Lawrence Rudy Cadena, Jiří Heller, Tomáš Bílý, David Potěšil, Claudia Eichenberger, Hannah Bruce, Silke Oeljeklaus, Bettina Warscheid, Zbyněk Zdráhal, André Schneider, Julius Lukeš, et Hassan Hashimi. 2018. « The Diverged Trypanosome MICOS Complex as a Hub for Mitochondrial Cristae Shaping and Protein Import ». *Current Biology: CB* 28(21):3393-3407.e5. doi: 10.1016/j.cub.2018.09.008.
- Kennedy, Peter G. E. 2006. « Human African Trypanosomiasis-Neurological Aspects ». *Journal of Neurology* 253(4):411-16. doi: 10.1007/s00415-006-0093-3.
- Kerscher, Oliver, Jason Holder, Maithreyan Srinivasan, Roxanne S. Leung, et Robert E. Jensen. 1997. « The Tim54p–Tim22p Complex Mediates Insertion of Proteins into the Mitochondrial Inner Membrane ». *The Journal of Cell Biology* 139(7):1663-75.
- Kerscher, Oliver, Naresh B. Sepuri, et Robert E. Jensen. 2000. « Tim18p Is a New Component of the Tim54p-Tim22p Translocon in the Mitochondrial Inner Membrane ». *Molecular Biology of the Cell* 11(1):103-16.
- Koch, Annett, Meinolf Thiemann, Markus Grabenbauer, Yisang Yoon, Mark A. McNiven, et Michael Schrader. 2003. « Dynamin-like Protein 1 Is Involved in Peroxisomal Fission ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(10):8597-8605. doi: 10.1074/jbc.M211761200.
- Koehler, C. M., M. P. Murphy, N. A. Bally, D. Leuenberger, W. Oppliger, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz, et E. Or. 2000. « Tim18p, a New Subunit of the TIM22 Complex That Mediates Insertion of Imported Proteins into the Yeast Mitochondrial Inner Membrane ». *Molecular and Cellular Biology* 20(4):1187-93. doi: 10.1128/MCB.20.4.1187-1193.2000.
- Kornmann, Benoît, Erin Currie, Sean R. Collins, Maya Schuldiner, Jodi Nunnari, Jonathan S. Weissman, et Peter Walter. 2009. « An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen ». *Science (New York, N.Y.)* 325(5939):477-81. doi: 10.1126/science.1175088.

- Kornmann, Benoît, Christof Osman, et Peter Walter. 2011. « The Conserved GTPase Gem1 Regulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Connections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(34):14151-56. doi: 10.1073/pnas.1111314108.
- Koshiba, Takumi, Scott A. Detmer, Jens T. Kaiser, Hsiuchen Chen, J. Michael McCaffery, et David C. Chan. 2004. « Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes ». *Science* 305(5685):858-62. doi: 10.1126/science.1099793.
- Kristjanson, P. M., B. M. Swallow, G. J. Rowlands, R. L. Kruska, et P. N. de Leeuw. 1999. « Measuring the Costs of African Animal Trypanosomosis, the Potential Benefits of Control and Returns to Research ». *Agricultural Systems* 20.
- Kutik, Stephan, Diana Stojanovski, Lars Becker, Thomas Becker, Michael Meinecke, Vivien Krüger, Claudia Prinz, Chris Meisinger, Bernard Guiard, Richard Wagner, Nikolaus Pfanner, et Nils Wiedemann. 2008. « Dissecting Membrane Insertion of Mitochondrial Beta-Barrel Proteins ». *Cell* 132(6):1011-24. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.028.
- Labrousse, A. M., M. D. Zappaterra, D. A. Rube, et A. M. van der Bliek. 1999. « C. Elegans Dynamin-Related Protein DRP-1 Controls Severing of the Mitochondrial Outer Membrane ». *Molecular Cell* 4(5):815-26. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80391-3.
- Lamour, Nadia, Loïc Rivière, Virginie Coustou, Graham H. Coombs, Michael P. Barrett, et Frédéric Bringaud. 2005. « Proline Metabolism in Procyclic Trypanosoma Brucei Is Down-Regulated in the Presence of Glucose ». *The Journal of Biological Chemistry* 280(12):11902-10. doi: 10.1074/jbc.M414274200.
- Larsson, N. G., J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G. S. Barsh, et D. A. Clayton. 1998. « Mitochondrial Transcription Factor A Is Necessary for MtDNA Maintenance and Embryogenesis in Mice ». *Nature Genetics* 18(3):231-36. doi: 10.1038/ng0398-231.
- Laveissière, Claude, et Claude Penchenier. 2017. « Historique ». P. 33-42 in *Manuel de lutte contre la maladie du sommeil, Didactiques*. Marseille: IRD Éditions.
- Laveran, Alphonse, et Félix Mesnil. 1912. *Trypanosomes et trypanosomiasés, par A. Laveran ... et F. Mesnil ...* Masson.
- Leak, S. G. A. 1998. *Tsetse Biology and Ecology: Their Role in the Epidemiology and Control of Trypanosomosis*. CAB International, in association with the International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya.
- Leduc-Gaudet, Jean-Philippe, Sabah N. A. Hussain, Esther Barreiro, et Gilles Gouspillou. 2021. « Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Skeletal Muscle Health and Aging ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(15):8179. doi: 10.3390/ijms22158179.
- Lee, Jason E., Laura M. Westrate, Haoxi Wu, Cynthia Page, et Gia K. Voeltz. 2016. « Multiple Dynamin Family Members Collaborate to Drive Mitochondrial Division ». *Nature* 540(7631):139-43. doi: 10.1038/nature20555.
- Lee, Joo-Yong, Meghan Kapur, Ming Li, Moon-Chang Choi, Sujin Choi, Hak-June Kim, Inhye Kim, Eunji Lee, J. Paul Taylor, et Tso-Pang Yao. 2014. « MFN1 deacetylation

- activates adaptive mitochondrial fusion and protects metabolically challenged mitochondria ». *Journal of Cell Science* 127(22):4954-63. doi: 10.1242/jcs.157321.
- Legros, Frédéric, Anne Lombès, Paule Frachon, et Manuel Rojo. 2002. « Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins ». *Molecular Biology of the Cell* 13(12):4343-54. doi: 10.1091/mbc.e02-06-0330.
- Levine, N. D., J. O. Corliss, F. E. Cox, G. Deroux, J. Grain, B. M. Honigberg, G. F. Leedale, A. R. Loeblich, J. Lom, D. Lynn, E. G. Merinfeld, F. C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra, et F. G. Wallace. 1980. « A Newly Revised Classification of the Protozoa ». *The Journal of Protozoology* 27(1):37-58. doi: 10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x.
- Li, Huiliang, Zhifu Han, Yan Lu, Yahui Lin, Lianhui Zhang, Yimin Wu, et Heng Wang. 2004. « Isolation and Functional Characterization of a Dynamin-like Gene from Plasmodium Falciparum ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320(3):664-71. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.010.
- Liang, Xue-hai, Asaf Haritan, Shai Uliel, et Shulamit Michaeli. 2003. « trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation ». *Eukaryotic Cell* 2(5):830-40. doi: 10.1128/EC.2.5.830-840.2003.
- Lindner, Andreas K., Veerle Lejon, François Chappuis, Jorge Seixas, Leon Kazumba, Michael P. Barrett, Erick Mwamba, Olema Erphas, Elie A. Akl, Gemma Villanueva, Hanna Bergman, Pere Simarro, Augustin Kadima Ebeja, Gerardo Priotto, et Jose Ramon Franco. 2020. « New WHO Guidelines for Treatment of Gambiense Human African Trypanosomiasis Including Fexinidazole: Substantial Changes for Clinical Practice ». *The Lancet. Infectious Diseases* 20(2):e38-46. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30612-7.
- Llopis, J., J. M. McCaffery, A. Miyawaki, M. G. Farquhar, et R. Y. Tsien. 1998. « Measurement of Cytosolic, Mitochondrial, and Golgi PH in Single Living Cells with Green Fluorescent Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(12):6803-8. doi: 10.1073/pnas.95.12.6803.
- Losón, Oliver C., Zhiyin Song, Hsiuchen Chen, et David C. Chan. 2013. « Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 Mediate Drp1 Recruitment in Mitochondrial Fission ». *Molecular Biology of the Cell* 24(5):659-67. doi: 10.1091/mbc.E12-10-0721.
- Lukeš, Julius, D. Lys Guilbride, Jan Votýpka, Alena Zíková, Rob Benne, et Paul T. Englund. 2002. « Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure ». *Eukaryotic Cell* 1(4):495-502. doi: 10.1128/EC.1.4.495-502.2002.
- Malka, Florence, Olwenn Guillery, Carmen Cifuentes-Diaz, Emmanuelle Guillou, Pascale Belenguer, Anne Lombès, et Manuel Rojo. 2005. « Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes ». *EMBO Reports* 6(9):853-59. doi: 10.1038/sj.embor.7400488.
- von der Malsburg, Karina, Judith M. Müller, Maria Bohnert, Silke Oeljeklaus, Paulina Kwiatkowska, Thomas Becker, Adrianna Loniewska-Lwowska, Sebastian Wiese, Sanjana Rao, Dusanka Milenkovic, Dana P. Hutu, Ralf M. Zerbes, Agnes Schulze-Specking, Helmut E. Meyer, Jean-Claude Martinou, Sabine Rospert, Peter Rehling,

- Chris Meisinger, Marten Veenhuis, Bettina Warscheid, Ida J. van der Klei, Nikolaus Pfanner, Agnieszka Chacinska, et Martin van der Laan. 2011. « Dual Role of Mitofilin in Mitochondrial Membrane Organization and Protein Biogenesis ». *Developmental Cell* 21(4):694-707. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.026.
- Mantilla, Brian S., Leticia Marchese, Aitor Casas-Sánchez, Naomi A. Dyer, Nicholas Egeh, Marc Biran, Frédéric Bringaud, Michael J. Lehane, Alvaro Acosta-Serrano, et Ariel M. Silber. 2017. « Proline Metabolism is Essential for *Trypanosoma brucei* Survival in the Tsetse Vector ». *PLoS Pathogens* 13(1):e1006158. doi: 10.1371/journal.ppat.1006158.
- Margulis, Lynn. 1970. « Origin of eukaryotic cells: Evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant and animal cells on the precambrian Earth. » *Yale University Press*.
- Matsuda, Noriyuki, Shigeto Sato, Kahori Shiba, Kei Okatsu, Keiko Saisho, Clement A. Gautier, Yu-Shin Sou, Shinji Saiki, Sumihiro Kawajiri, Fumiaki Sato, Mayumi Kimura, Masaaki Komatsu, Nobutaka Hattori, et Keiji Tanaka. 2010. « PINK1 Stabilized by Mitochondrial Depolarization Recruits Parkin to Damaged Mitochondria and Activates Latent Parkin for Mitophagy ». *The Journal of Cell Biology* 189(2):211-21. doi: 10.1083/jcb.200910140.
- Mattie, Sevan, Jan Riemer, Jeremy G. Wideman, et Heidi M. McBride. 2018. « A New Mitofusin Topology Places the Redox-Regulated C Terminus in the Mitochondrial Intermembrane Space ». *Journal of Cell Biology* 217(2):507-15. doi: 10.1083/jcb.201611194.
- Mazet, Muriel, Pauline Morand, Marc Biran, Guillaume Bouyssou, Pierrette Courtois, Sylvie Daulouède, Yoann Millerioux, Jean-Michel Franconi, Philippe Vincendeau, Patrick Moreau, et Frédéric Bringaud. 2013. « Revisiting the Central Metabolism of the Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*: Production of Acetate in the Mitochondrion Is Essential for Parasite Viability ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(12):e2587. doi: 10.1371/journal.pntd.0002587.
- Melatti, Carmen, Manuela Pieperhoff, Leandro Lemgruber, Ehmke Pohl, Lilach Sheiner, et Markus Meissner. 2019. « A Unique Dynamin-Related Protein Is Essential for Mitochondrial Fission in *Toxoplasma Gondii* » édité par K. Kim. *PLoS Pathogens* 15(4):e1007512. doi: 10.1371/journal.ppat.1007512.
- Melo, E. J., M. Attias, et W. De Souza. 2000. « The Single Mitochondrion of Tachyzoites of *Toxoplasma Gondii* ». *Journal of Structural Biology* 130(1):27-33. doi: 10.1006/jsbi.2000.4228.
- Melville, S. E., V. Leech, C. S. Gerrard, A. Tait, et J. M. Blackwell. 1998. « The Molecular Karyotype of the Megabase Chromosomes of *Trypanosoma Brucei* and the Assignment of Chromosome Markers ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 94(2):155-73. doi: 10.1016/s0166-6851(98)00054-1.
- Millerioux, Yoann, 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. 2013. « The Threonine Degradation Pathway of the *Trypanosoma Brucei* Procyclic Form: The Main Carbon Source for Lipid Biosynthesis Is under Metabolic Control: Metabolic

Adaptation for Acetate Production ». *Molecular Microbiology* n/a-n/a. doi: 10.1111/mmi.12351.

Millerioux, Yoann, Muriel Mazet, Guillaume Bouyssou, Stefan Allmann, Tiila-Riikka Kiema, Eloïse Bertiaux, Laetitia Fouillen, Chandan Thapa, Marc Biran, Nicolas Plazolles, Franziska Dittrich-Domergue, Aline Crouzols, Rik K. Wierenga, Brice Rotureau, Patrick Moreau, et Frédéric Bringaud. 2018. « De novo biosynthesis of sterols and fatty acids in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: Carbon source preferences and metabolic flux redistributions ». *PLoS Pathogens* 14(5):e1007116. doi: 10.1371/journal.ppat.1007116.

Mokranjac, Dejana, Martin Sichtung, Walter Neupert, et Kai Hell. 2003. « Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria ». *The EMBO Journal* 22(19):4945-56. doi: 10.1093/emboj/cdg485.

Mokranjac, Dejana, Martin Sichtung, Dusan Popov-Celeketić, Koyeli Mapa, Lada Gevorkyan-Airapetov, Keren Zohary, Kai Hell, Abdussalam Azem, et Walter Neupert. 2009. « Role of Tim50 in the Transfer of Precursor Proteins from the Outer to the Inner Membrane of Mitochondria ». *Molecular Biology of the Cell* 20(5):1400-1407. doi: 10.1091/mbc.e08-09-0934.

Morgan, Gareth W., David Goulding, et Mark C. Field. 2004. « The Single Dynamin-like Protein of *Trypanosoma Brucei* Regulates Mitochondrial Division and Is Not Required for Endocytosis* ». *Journal of Biological Chemistry* 279(11):10692-701. doi: 10.1074/jbc.M312178200.

Mowatt, M. R., et C. E. Clayton. 1987. « Developmental regulation of a novel repetitive protein of *Trypanosoma brucei*. » *Molecular and Cellular Biology* 7(8):2838-44.

Mowatt, M. R., G. S. Wisdom, et C. E. Clayton. 1989. « Variation of Tandem Repeats in the Developmentally Regulated Procyclic Acidic Repetitive Proteins of *Trypanosoma Brucei* ». *Molecular and Cellular Biology* 9(3):1332-35. doi: 10.1128/mcb.9.3.1332-1335.1989.

Mozdy, A. D., J. M. McCaffery, et J. M. Shaw. 2000. « Dnm1p GTPase-Mediated Mitochondrial Fission Is a Multi-Step Process Requiring the Novel Integral Membrane Component Fis1p ». *The Journal of Cell Biology* 151(2):367-80. doi: 10.1083/jcb.151.2.367.

Mugnier, Monica R., George A. M. Cross, et F. Nina Papavasiliou. 2015. « The in Vivo Dynamics of Antigenic Variation in *Trypanosoma Brucei* ». *Science (New York, N.Y.)* 347(6229):1470-73. doi: 10.1126/science.aaa4502.

Narendra, Derek P., Seok Min Jin, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, Clement A. Gautier, Jie Shen, Mark R. Cookson, et Richard J. Youle. 2010. « PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin ». *PLoS Biology* 8(1):e1000298. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298.

Narendra, Derek, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, et Richard J. Youle. 2008. « Parkin Is Recruited Selectively to Impaired Mitochondria and Promotes Their Autophagy ». *The Journal of Cell Biology* 183(5):795-803. doi: 10.1083/jcb.200809125.

- Navarro, M., et K. Gull. 2001. « A Pol I Transcriptional Body Associated with VSG Mono-Allelic Expression in *Trypanosoma Brucei* ». *Nature* 414(6865):759-63. doi: 10.1038/414759a.
- Naylor, Kari, Elena Ingerman, Voytek Okreglak, Michael Marino, Jenny E. Hinshaw, et Jodi Nunnari. 2006. « Mdv1 Interacts with Assembled Dnm1 to Promote Mitochondrial Division ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(4):2177-83. doi: 10.1074/jbc.M507943200.
- Nelson, David, et Michael Cox. 2000. *Lehninger principles of biochemistry*. Third Edition.
- Niemann, Moritz, Sebastian Wiese, Jan Mani, Astrid Chanfon, Christopher Jackson, Chris Meisinger, Bettina Warscheid, et André Schneider. 2013. « Mitochondrial Outer Membrane Proteome of *Trypanosoma Brucei* Reveals Novel Factors Required to Maintain Mitochondrial Morphology ». *Molecular & Cellular Proteomics* 12(2):515-28. doi: 10.1074/mcp.M112.023093.
- Odiit, M., F. Kansime, et J. C. Enyaru. 1997. « Duration of Symptoms and Case Fatality of Sleeping Sickness Caused by *Trypanosoma Brucei Rhodesiense* in Tororo, Uganda ». *East African Medical Journal* 74(12):792-95.
- Ogbadoyi, Emmanuel O., Derrick R. Robinson, et Keith Gull. 2003. « A High-Order Trans-Membrane Structural Linkage Is Responsible for Mitochondrial Genome Positioning and Segregation by Flagellar Basal Bodies in Trypanosomes ». *Molecular Biology of the Cell* 14(5):1769-79. doi: 10.1091/mbc.e02-08-0525.
- Okamoto, Koji, Noriko Kondo-Okamoto, et Yoshinori Ohsumi. 2009. « Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy ». *Developmental Cell* 17(1):87-97. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.013.
- Olichon, A., G. Elachouri, L. Baricault, C. Delettre, P. Belenguer, et G. Lenaers. 2007. « OPA1 Alternate Splicing Uncouples an Evolutionary Conserved Function in Mitochondrial Fusion from a Vertebrate Restricted Function in Apoptosis ». *Cell Death and Differentiation* 14(4):682-92. doi: 10.1038/sj.cdd.4402048.
- Olichon, Aurélien, Laurent J. Emorine, Eric Descoins, Laetitia Pelloquin, Laetitia Brichese, Nicole Gas, Emmanuelle Guillou, Cécile Delettre, Annie Valette, Christian P. Hamel, Bernard Ducommun, Guy Lenaers, et Pascale Belenguer. 2002. « The Human Dynamin-Related Protein OPA1 Is Anchored to the Mitochondrial Inner Membrane Facing the Inter-Membrane Space ». *FEBS Letters* 523(1-3):171-76. doi: 10.1016/s0014-5793(02)02985-x.
- Opperdoes, F. R., et P. Borst. 1977. « Localization of Nine Glycolytic Enzymes in a Microbody-like Organelle in *Trypanosoma Brucei*: The Glycosome ». *FEBS Letters* 80(2):360-64. doi: 10.1016/0014-5793(77)80476-6.
- Otera, Hidenori, Chunxin Wang, Megan M. Cleland, Kiyoko Setoguchi, Sadaki Yokota, Richard J. Youle, et Katsuyoshi Mihara. 2010. « Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells ». *The Journal of Cell Biology* 191(6):1141-58. doi: 10.1083/jcb.201007152.
- Overath, Peter, et Markus Engstler. 2004. « Endocytosis, Membrane Recycling and Sorting of GPI-Anchored Proteins: *Trypanosoma Brucei* as a Model System ». *Molecular Microbiology* 53(3):735-44. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04224.x.

- Palade, G. E. 1953. « An Electron Microscope Study of the Mitochondrial Structure ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 1(4):188-211. doi: 10.1177/1.4.188.
- Palmer, Catherine S., Laura D. Osellame, David Laine, Olga S. Koutsopoulos, Ann E. Frazier, et Michael T. Ryan. 2011. « MiD49 and MiD51, New Components of the Mitochondrial Fission Machinery ». *EMBO Reports* 12(6):565-73. doi: 10.1038/embor.2011.54.
- Pankiv, Serhiy, Terje Høyvarde Clausen, Trond Lamark, Andreas Brech, Jack-Ansgar Bruun, Heidi Outzen, Aud Øvervatn, Geir Bjørkøy, et Terje Johansen. 2007. « P62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(33):24131-45. doi: 10.1074/jbc.M702824200.
- Park, Y. Y., O. T. K. Nguyen, H. Kang, et H. Cho. 2014. « MARCH5-Mediated Quality Control on Acetylated Mfn1 Facilitates Mitochondrial Homeostasis and Cell Survival ». *Cell Death & Disease* 5:e1172. doi: 10.1038/cddis.2014.142.
- Pays, Etienne, Benoit Vanhollebeke, Pierrick Uzureau, Laurence Lecordier, et David Pérez-Morga. 2014. « The Molecular Arms Race between African Trypanosomes and Humans ». *Nature Reviews Microbiology* 12(8):575-84. doi: 10.1038/nrmicro3298.
- Pérez-Morga, David, Benoit Vanhollebeke, Françoise Paturiaux-Hanocq, Derek P. Nolan, Laurence Lins, Fabrice Homblé, Luc Vanhamme, Patricia Tebabi, Annette Pays, Philippe Poelvoorde, Alain Jacquet, Robert Brasseur, et Etienne Pays. 2005. « Apolipoprotein L-I Promotes Trypanosome Lysis by Forming Pores in Lysosomal Membranes ». *Science (New York, N.Y.)* 309(5733):469-72. doi: 10.1126/science.1114566.
- Pollastri, Michael P. 2018. « Fexinidazole: A New Drug for African Sleeping Sickness on the Horizon ». *Trends in Parasitology* 34(3):178-79. doi: 10.1016/j.pt.2017.12.002.
- Priest, J. W., et S. L. Hajduk. 1994. « Developmental Regulation of Mitochondrial Biogenesis in *Trypanosoma Brucei* ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26(2):179-91. doi: 10.1007/BF00763067.
- Pusnik, Mascha, Jan Mani, Oliver Schmidt, Moritz Niemann, Silke Oeljeklaus, Felix Schnarwiler, Bettina Warscheid, Trevor Lithgow, Chris Meisinger, et André Schneider. 2012. « An essential novel component of the noncanonical mitochondrial outer membrane protein import system of trypanosomatids ». *Molecular Biology of the Cell* 23(17):3420-28. doi: 10.1091/mbc.E12-02-0107.
- Pusnik, Mascha, Oliver Schmidt, Andrew J. Perry, Silke Oeljeklaus, Moritz Niemann, Bettina Warscheid, Trevor Lithgow, Chris Meisinger, et André Schneider. 2011. « Mitochondrial Preprotein Translocase of Trypanosomatids Has a Bacterial Origin ». *Current Biology: CB* 21(20):1738-43. doi: 10.1016/j.cub.2011.08.060.
- Pyakurel, Aswin, Claudia Savoia, Daniel Hess, et Luca Scorrano. 2015. « Extracellular Regulated Kinase Phosphorylates Mitofusin 1 to Control Mitochondrial Morphology and Apoptosis ». *Molecular Cell* 58(2):244-54. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.021.
- Qi, Yuanbo, Liming Yan, Caiting Yu, Xiangyang Guo, Xin Zhou, Xiaoyu Hu, Xiaofang Huang, Zihao Rao, Zhiyong Lou, et Junjie Hu. 2016. « Structures of Human Mitofusin 1

- Provide Insight into Mitochondrial Tethering ». *The Journal of Cell Biology* 215(5):621-29. doi: 10.1083/jcb.201609019.
- Rabl, Regina, Vincent Soubannier, Roland Scholz, Frank Vogel, Nadine Mendl, Andreja Vasiljev-Neumeyer, Christian Körner, Ravi Jagasia, Thomas Keil, Wolfgang Baumeister, Marek Cyrklaff, Walter Neupert, et Andreas S. Reichert. 2009. « Formation of Cristae and Crista Junctions in Mitochondria Depends on Antagonism between Fc1 and Su e/g ». *The Journal of Cell Biology* 185(6):1047-63. doi: 10.1083/jcb.200811099.
- Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia, et T. Pozzan. 1993. « Microdomains with High Ca²⁺ Close to IP₃-Sensitive Channels That Are Sensed by Neighboring Mitochondria ». *Science (New York, N.Y.)* 262(5134):744-47. doi: 10.1126/science.8235595.
- Robinson, D. R., T. Sherwin, A. Ploubidou, E. H. Byard, et K. Gull. 1995. « Microtubule Polarity and Dynamics in the Control of Organelle Positioning, Segregation, and Cytokinesis in the Trypanosome Cell Cycle ». *The Journal of Cell Biology* 128(6):1163-72. doi: 10.1083/jcb.128.6.1163.
- Roditi, I., M. Carrington, et M. Turner. 1987. « Expression of a Polypeptide Containing a Dipeptide Repeat Is Confined to the Insect Stage of *Trypanosoma Brucei* ». *Nature* 325(6101):272-74. doi: 10.1038/325272a0.
- Roditi, I., H. Schwarz, T. W. Pearson, R. P. Beecroft, M. K. Liu, J. P. Richardson, H. J. Bühring, J. Pleiss, R. Bülow, et R. O. Williams. 1989. « Procyclin Gene Expression and Loss of the Variant Surface Glycoprotein during Differentiation of *Trypanosoma Brucei*. » *Journal of Cell Biology* 108(2):737-46. doi: 10.1083/jcb.108.2.737.
- Rojo, Manuel, Frédéric Legros, Danielle Chateau, et Anne Lombès. 2002. « Membrane Topology and Mitochondrial Targeting of Mitofusins, Ubiquitous Mammalian Homologs of the Transmembrane GTPase Fzo ». *Journal of Cell Science* 115(8):1663-74. doi: 10.1242/jcs.115.8.1663.
- Rotureau, Brice, et Jan Van Den Abbeele. 2013. « Through the Dark Continent: African Trypanosome Development in the Tsetse Fly ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3:53. doi: 10.3389/fcimb.2013.00053.
- Samant, Sadhana A., Hannah J. Zhang, Zhigang Hong, Vinodkumar B. Pillai, Nagalingam R. Sundaresan, Donald Wolfgeher, Stephen L. Archer, David C. Chan, et Mahesh P. Gupta. 2014. « SIRT3 Deacetylates and Activates OPA1 to Regulate Mitochondrial Dynamics during Stress ». *Molecular and Cellular Biology* 34(5):807-19. doi: 10.1128/MCB.01483-13.
- Santel, A., et M. T. Fuller. 2001. « Control of Mitochondrial Morphology by a Human Mitofusin ». *Journal of Cell Science* 114(Pt 5):867-74. doi: 10.1242/jcs.114.5.867.
- Santel, Ansgar, Stephan Frank, Brigitte Gaume, Michael Herrler, Richard J. Youle, et Margaret T. Fuller. 2003. « Mitofusin-1 Protein Is a Generally Expressed Mediator of Mitochondrial Fusion in Mammalian Cells ». *Journal of Cell Science* 116(Pt 13):2763-74. doi: 10.1242/jcs.00479.
- Scarpulla, Richard C. 2008. « Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function ». *Physiological Reviews* 88(2):611-38. doi: 10.1152/physrev.00025.2007.

- Schägger, H., W. A. Cramer, et G. von Jagow. 1994. « Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis ». *Analytical Biochemistry* 217(2):220-30. doi: 10.1006/abio.1994.1112.
- Schnarwiler, Felix, Moritz Niemann, Nicholas Doiron, Anke Harsman, Sandro Käser, Jan Mani, Astrid Chanfon, Caroline E. Dewar, Silke Oeljeklaus, Christopher B. Jackson, Mascha Pusnik, Oliver Schmidt, Chris Meisinger, Sebastian Hiller, Bettina Warscheid, Achim C. Schnauffer, Torsten Ochsenreiter, et André Schneider. 2014. « Trypanosomal TAC40 Constitutes a Novel Subclass of Mitochondrial β -Barrel Proteins Specialized in Mitochondrial Genome Inheritance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(21):7624-29. doi: 10.1073/pnas.1404854111.
- Schnauffer, Achim, G. Desmond Clark-Walker, Alodie G. Steinberg, et Ken Stuart. 2005. « The F1-ATP Synthase Complex in Bloodstream Stage Trypanosomes Has an Unusual and Essential Function ». *The EMBO Journal* 24(23):4029-40. doi: 10.1038/sj.emboj.7600862.
- Schneider, André. 2001. « Unique Aspects of Mitochondrial Biogenesis in Trypanosomatids ». *International Journal for Parasitology* 31(13):1403-15. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00296-X.
- Schneider, André, Dejan Bursać, et Trevor Lithgow. 2008. « The Direct Route: A Simplified Pathway for Protein Import into the Mitochondrion of Trypanosomes ». *Trends in Cell Biology* 18(1):12-18. doi: 10.1016/j.tcb.2007.09.009.
- Schwede, Angela, Nicola Jones, Markus Engstler, et Mark Carrington. 2011. « The VSG C-Terminal Domain Is Inaccessible to Antibodies on Live Trypanosomes ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 175(2):201-4. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.11.004.
- Sesaki, H., et R. E. Jensen. 1999. « Division versus Fusion: Dnm1p and Fzo1p Antagonistically Regulate Mitochondrial Shape ». *The Journal of Cell Biology* 147(4):699-706. doi: 10.1083/jcb.147.4.699.
- Sesaki, Hiromi, Sheryl M. Southard, Michael P. Yaffe, et Robert E. Jensen. 2003. « Mgm1p, a Dynamin-related GTPase, Is Essential for Fusion of the Mitochondrial Outer Membrane ». *Molecular Biology of the Cell* 14(6):2342-56. doi: 10.1091/mbc.E02-12-0788.
- Shapiro, T. A., et P. T. Englund. 1995. « The Structure and Replication of Kinetoplast DNA ». *Annual Review of Microbiology* 49:117-43. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.001001.
- Sharma, Reuben, Lori Peacock, Eva Gluenz, Keith Gull, Wendy Gibson, et Mark Carrington. 2008. « Asymmetric Cell Division as a Route to Reduction in Cell Length and Change in Cell Morphology in Trypanosomes ». *Protist* 159(1):137-51. doi: 10.1016/j.protis.2007.07.004.
- Sharma, Shvetank, Ujjal K. Singha, et Minu Chaudhuri. 2010. « Role of Tob55 on Mitochondrial Protein Biogenesis in Trypanosoma Brucei ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 174(2):89-100. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.07.003.

- Signorell, Aita, Eva Gluenz, Jochen Rettig, André Schneider, Michael K. Shaw, Keith Gull, et Peter Bütikofer. 2009. « Perturbation of Phosphatidylethanolamine Synthesis Affects Mitochondrial Morphology and Cell-Cycle Progression in Procyclic-Form *Trypanosoma Brucei* ». *Molecular Microbiology* 72(4):1068-79. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06713.x.
- Signorell, Aita, Monika Rauch, Jennifer Jelk, Michael A. J. Ferguson, et Peter Bütikofer. 2008. « Phosphatidylethanolamine in *Trypanosoma brucei* Is Organized in Two Separate Pools and Is Synthesized Exclusively by the Kennedy Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 283(35):23636-44. doi: 10.1074/jbc.M803600200.
- Simarro, Pere P., Abdoulaye Diarra, Jose A. Ruiz Postigo, José R. Franco, et Jean G. Jannin. 2011. « The Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000–2009: The Way Forward ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(2):e1007. doi: 10.1371/journal.pntd.0001007.
- Simmen, Thomas, Joseph E. Aslan, Anastassia D. Blagoveshchenskaya, Laurel Thomas, Lei Wan, Yang Xiang, Sylvain F. Feliciangeli, Chien-Hui Hung, Colin M. Crump, et Gary Thomas. 2005. « PACS-2 Controls Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Communication and Bid-Mediated Apoptosis ». *The EMBO Journal* 24(4):717-29. doi: 10.1038/sj.emboj.7600559.
- Singha, Ujjal K., VaNae Hamilton, et Minu Chaudhuri. 2015. « Tim62, a Novel Mitochondrial Protein in *Trypanosoma Brucei*, Is Essential for Assembly and Stability of the TbTim17 Protein Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 290(38):23226-39. doi: 10.1074/jbc.M115.663492.
- Singha, Ujjal K., Vanae Hamilton, Melanie R. Duncan, Ebony Weems, Manish K. Tripathi, et Minu Chaudhuri. 2012. « Protein Translocase of Mitochondrial Inner Membrane in *Trypanosoma Brucei* ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(18):14480-93. doi: 10.1074/jbc.M111.322925.
- Singha, Ujjal K., Emmanuel Peprah, Shuntae Williams, Robert Walker, Lipi Saha, et Minu Chaudhuri. 2008. « Characterization of the mitochondrial inner membrane protein translocator Tim17 from *Trypanosoma brucei* ». *Molecular and biochemical parasitology* 159(1):30-43. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.01.003.
- Singha, Ujjal K., Anuj Tripathi, Joseph T. Smith, Linda Quinones, Aparajita Saha, Tanusree Singha, et Minu Chaudhuri. 2021. « Novel IM-associated protein Tim54 plays a role in the mitochondrial import of internal signal-containing proteins in *Trypanosoma brucei* ». *Biology of the cell* 113(1):39-57. doi: 10.1111/boc.202000054.
- Sirrenberg, C., M. F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert, et M. Brunner. 1996. « Import of Carrier Proteins into the Mitochondrial Inner Membrane Mediated by Tim22 ». *Nature* 384(6609):582-85. doi: 10.1038/384582a0.
- Sjostrand, F. S. 1953. « Electron Microscopy of Mitochondria and Cytoplasmic Double Membranes ». *Nature* 171(4340):30-32. doi: 10.1038/171030a0.
- Sloof, P., J. L. Bos, A. F. Konings, H. H. Menke, P. Borst, W. E. Gutteridge, et W. Leon. 1983. « Characterization of Satellite DNA in *Trypanosoma Brucei* and *Trypanosoma Cruzi* ». *Journal of Molecular Biology* 167(1):1-21. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80031-x.

- Smirnova, E., L. Griparic, D. L. Shurland, et A. M. van der Bliek. 2001. « Dynamin-Related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 12(8):2245-56. doi: 10.1091/mbc.12.8.2245.
- Smith, Terry K., Frédéric Bringaud, Derek P. Nolan, et Luisa M. Figueiredo. 2017. « Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle ». *F1000Research* 6:F1000 Faculty Rev-683. doi: 10.12688/f1000research.10342.2.
- Song, Zhiyin, Hsiuchen Chen, Maja Fiket, Christiane Alexander, et David C. Chan. 2007. « OPA1 Processing Controls Mitochondrial Fusion and Is Regulated by mRNA Splicing, Membrane Potential, and Yme1L ». *The Journal of Cell Biology* 178(5):749-55. doi: 10.1083/jcb.200704110.
- Song, Zhiyin, Mariam Ghochani, J. Michael McCaffery, Terrence G. Frey, et David C. Chan. 2009. « Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion ». *Molecular Biology of the Cell* 20(15):3525-32. doi: 10.1091/mbc.e09-03-0252.
- Sperka-Gottlieb, C. D., A. Hermetter, F. Paltauf, et G. Daum. 1988. « Lipid Topology and Physical Properties of the Outer Mitochondrial Membrane of the Yeast, *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 946(2):227-34. doi: 10.1016/0005-2736(88)90397-5.
- Stanway, Rebecca R., Nancy Mueller, Bernd Zobiak, Stefanie Graewe, Ulrike Froehlke, Patrick J. M. Zessin, Martin Aepfelbacher, et Volker T. Heussler. 2011. « Organelle Segregation into Plasmodium Liver Stage Merozoites ». *Cellular Microbiology* 13(11):1768-82. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01657.x.
- Steverding, Dietmar. 2008. « The history of African trypanosomiasis ». *Parasites & Vectors* 1(1):3. doi: 10.1186/1756-3305-1-3.
- Stroud, David A., Silke Oeljeklaus, Sebastian Wiese, Maria Bohnert, Urs Lewandrowski, Albert Sickmann, Bernard Guiard, Martin van der Laan, Bettina Warscheid, et Nils Wiedemann. 2011. « Composition and Topology of the Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Encounter Structure ». *Journal of Molecular Biology* 413(4):743-50. doi: 10.1016/j.jmb.2011.09.012.
- Stuart, K. 1983. « Mitochondrial DNA of an African Trypanosome ». *Journal of Cellular Biochemistry* 23(1-4):13-26. doi: 10.1002/jcb.240230103.
- Sturm, N. R., et L. Simpson. 1990. « Kinetoplast DNA Minicircles Encode Guide RNAs for Editing of Cytochrome Oxidase Subunit III mRNA ». *Cell* 61(5):879-84. doi: 10.1016/0092-8674(90)90198-n.
- Taguchi, Naoko, Naotada Ishihara, Akihiro Jofuku, Toshihiko Oka, et Katsuyoshi Mihara. 2007. « Mitotic Phosphorylation of Dynamin-Related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(15):11521-29. doi: 10.1074/jbc.M607279200.
- Takken, V., M. A. Oladunmade, H. U. Feldmann, J. A. Onah, S. O. Tenabe, et H. J. Hamann. 1986. « The eradication of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae) using traps, insecticide-impregnated targets and the sterile insect technique in central Nigeria ».

- Tal, Ruth, Gal Winter, Nitai Ecker, Daniel J. Klionsky, et Hagai Abeliovich. 2007. « Aup1p, a Yeast Mitochondrial Protein Phosphatase Homolog, Is Required for Efficient Stationary Phase Mitophagy and Cell Survival ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(8):5617-24. doi: 10.1074/jbc.M605940200.
- Tanaka, Atsushi, Megan M. Cleland, Shan Xu, Derek P. Narendra, Der-Fen Suen, Mariusz Karbowski, et Richard J. Youle. 2010. « Proteasome and P97 Mediate Mitophagy and Degradation of Mitofusins Induced by Parkin ». *The Journal of Cell Biology* 191(7):1367-80. doi: 10.1083/jcb.201007013.
- Tenter, A. M., A. R. Heckerroth, et L. M. Weiss. 2000. « Toxoplasma Gondii: From Animals to Humans ». *International Journal for Parasitology* 30(12-13):1217-58. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00124-7.
- Tetaud, Emmanuel, Isabelle Lecuix, Tara Sheldrake, Théo Baltz, et Alan H. Fairlamb. 2002. « A New Expression Vector for Crithidia Fasciculata and Leishmania ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 120(2):195-204. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00002-6.
- Tetley, L., et K. Vickerman. 1985. « Differentiation in Trypanosoma Brucei: Host-Parasite Cell Junctions and Their Persistence during Acquisition of the Variable Antigen Coat ». *Journal of Cell Science* 74:1-19. doi: 10.1242/jcs.74.1.1.
- Tieu, Q., et J. Nunnari. 2000. « Mdv1p Is a WD Repeat Protein That Interacts with the Dynamin-Related GTPase, Dnm1p, to Trigger Mitochondrial Division ». *The Journal of Cell Biology* 151(2):353-66. doi: 10.1083/jcb.151.2.353.
- Tilokani, Lisa, Shun Nagashima, Vincent Paupe, et Julien Prudent. 2018. « Mitochondrial Dynamics: Overview of Molecular Mechanisms » édité par C. Garone et M. Minczuk. *Essays in Biochemistry* 62(3):341-60. doi: 10.1042/EBC20170104.
- Tomás, Ana M., et Helena Castro. 2013. « Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids ». *Antioxidants & Redox Signaling* 19(7):696-707. doi: 10.1089/ars.2012.4948.
- Toyama, Erin Quan, Sébastien Herzig, Julien Curchet, Tommy L. Lewis, Oliver C. Losón, Kristina Hellberg, Nathan P. Young, Hsiuchen Chen, Franck Polleux, David C. Chan, et Reuben J. Shaw. 2016. « Metabolism. AMP-Activated Protein Kinase Mediates Mitochondrial Fission in Response to Energy Stress ». *Science (New York, N.Y.)* 351(6270):275-81. doi: 10.1126/science.aab4138.
- Trikin, Roman, Nicholas Doiron, Anneliese Hoffmann, Beat Haenni, Martin Jakob, Achim Schnauffer, Bernd Schimanski, Benoît Zuber, et Torsten Ochsenreiter. 2016. « TAC102 Is a Novel Component of the Mitochondrial Genome Segregation Machinery in Trypanosomes ». *PLoS Pathogens* 12(5):e1005586. doi: 10.1371/journal.ppat.1005586.
- Urbaniak, Michael D., M. Lucia S. Guther, et Michael A. J. Ferguson. 2012. « Comparative SILAC Proteomic Analysis of Trypanosoma brucei Bloodstream and Procyclic Lifecycle Stages ». *PLoS ONE* 7(5):e36619. doi: 10.1371/journal.pone.0036619.
- Uzureau, Pierrick, Sophie Uzureau, Laurence Lecordier, Frédéric Fontaine, Patricia Tebabi, Fabrice Homblé, Axelle Grélard, Vanessa Zhendre, Derek P. Nolan, Laurence Lins, Jean-Marc Crowet, Annette Pays, Cécile Felu, Philippe Poelvoorde, Benoit Vanhollebeke, Soren K. Moestrup, Jeppe Lyngsø, Jan Skov Pedersen, Jeremy C.

- Mottram, Erick J. Dufourc, David Pérez-Morga, et Etienne Pays. 2013. « Mechanism of Trypanosoma Brucei Gambiense Resistance to Human Serum ». *Nature* 501(7467):430-34. doi: 10.1038/nature12516.
- Van Den Abbeele, J., Y. Claes, D. van Bockstaele, D. Le Ray, et M. Coosemans. 1999. « Trypanosoma Brucei Spp. Development in the Tsetse Fly: Characterization of the Post-Mesocyclic Stages in the Foregut and Proboscis ». *Parasitology* 118 (Pt 5):469-78. doi: 10.1017/s0031182099004217.
- Van der Ploeg, L. H., D. C. Schwartz, C. R. Cantor, et P. Borst. 1984. « Antigenic Variation in Trypanosoma Brucei Analyzed by Electrophoretic Separation of Chromosome-Sized DNA Molecules ». *Cell* 37(1):77-84. doi: 10.1016/0092-8674(84)90302-7.
- Van Hellemond, J. J., F. R. Opperdoes, et A. G. Tielens. 1998. « Trypanosomatidae Produce Acetate via a Mitochondrial Acetate:Succinate CoA Transferase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6):3036-41. doi: 10.1073/pnas.95.6.3036.
- Vance, J. E. 1990. « Phospholipid Synthesis in a Membrane Fraction Associated with Mitochondria ». *The Journal of Biological Chemistry* 265(13):7248-56.
- Vanhamme, L., A. Pays, P. Tebabi, S. Alexandre, et 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 ». *Molecular and Cellular Biology* 15(10):5598-5606. doi: 10.1128/MCB.15.10.5598.
- Vanhamme, Luc, Françoise Paturiaux-Hanocq, Philippe Poelvoorde, Derek P. Nolan, Laurence Lins, Jan Van Den Abbeele, Annette Pays, Patricia Tebabi, Huang Van Xong, Alain Jacquet, Nicole Moguilevsky, Marc Dieu, John P. Kane, Patrick De Baetselier, Robert Brasseur, et Etienne Pays. 2003. « Apolipoprotein L-I Is the Trypanosome Lytic Factor of Human Serum ». *Nature* 422(6927):83-87. doi: 10.1038/nature01461.
- Vanhollebeke, Benoit, Géraldine De Muylder, Marianne J. Nielsen, Annette Pays, Patricia Tebabi, Marc Dieu, Martine Raes, Soren K. Moestrup, et Etienne Pays. 2008. « A Haptoglobin-Hemoglobin Receptor Conveys Innate Immunity to Trypanosoma Brucei in Humans ». *Science (New York, N.Y.)* 320(5876):677-81. doi: 10.1126/science.1156296.
- Vanwalleghem, Gilles, Frédéric Fontaine, Laurence Lecordier, Patricia Tebabi, Kristoffer Klewe, Derek P. Nolan, Yoshiki Yamaryo-Botté, Cyrille Botté, Anneke Kremer, Gabriela Schumann Burkard, Joachim Rassow, Isabel Roditi, David Pérez-Morga, et Etienne Pays. 2015. « Coupling of Lysosomal and Mitochondrial Membrane Permeabilization in Trypanolysis by APOL1 ». *Nature Communications* 6(1):8078. doi: 10.1038/ncomms9078.
- Vassella, Erik, Jan Van Den Abbeele, Peter Bütikofer, Christina Kunz Renggli, André Furger, Reto Brun, et Isabel Roditi. 2000. « A major surface glycoprotein of Trypanosoma brucei is expressed transiently during development and can be regulated post-transcriptionally by glycerol or hypoxia ». *Genes & Development* 14(5):615-26.
- Vassella, Erik, Michael Oberle, Simon Urwyler, Christina Kunz Renggli, Erwin Studer, Andrew Hemphill, Cristina Fragoso, Peter Bütikofer, Reto Brun, et Isabel Roditi. 2009.

- « Major Surface Glycoproteins of Insect Forms of *Trypanosoma Brucei* Are Not Essential for Cyclical Transmission by Tsetse ». *PloS One* 4(2):e4493. doi: 10.1371/journal.pone.0004493.
- Vaughan, Sue, et Keith Gull. 2003. « The Trypanosome Flagellum ». *Journal of Cell Science* 116(Pt 5):757-59. doi: 10.1242/jcs.00287.
- Verhoef, Julie M. J., Markus Meissner, et Taco W. A. Kooij. 2021. « Organelle Dynamics in Apicomplexan Parasites ». *mBio* 12(4):e01409-21. doi: 10.1128/mBio.01409-21.
- Verner, Zdeněk, Somsuvro Basu, Corinna Benz, Sameer Dixit, Eva Dobáková, Drahomíra Faktorová, Hassan Hashimi, Eva Horáková, Zhenqiu Huang, Zdeněk Paris, Priscila Peña-Díaz, Lucie Ridlon, Jiří Týč, David Wildridge, Alena Zíková, et Julius Lukeš. 2015. « Malleable Mitochondrion of *Trypanosoma Brucei* ». P. 73-151 in *International Review of Cell and Molecular Biology*. Vol. 315. Elsevier.
- Vickerman, K., P. J. Myler, et K. D. Stuart. 1993. « African Trypanosomiasis. » *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. (Ed. 3):170-212.
- Vickerman, K., et T. M. Preston. 1976. « Comparative Cell Biology of the Kinetoplastid Flagellates ». *Biology of the Kinetoplastida*.
- Villafranz, Oriana, Marc Biran, Erika Pineda, Nicolas Plazolles, Edern Cahoreau, Rodolpho Ornitz Oliveira Souza, Magali Thonnus, Stefan Allmann, Emmanuel Tetaud, Loïc Rivière, Ariel M. Silber, Michael P. Barrett, Alena Zíková, Michael Boshart, Jean-Charles Portais, et Frédéric Bringaud. 2021. « Procyclic trypanosomes recycle glucose catabolites and TCA cycle intermediates to stimulate growth in the presence of physiological amounts of proline ». *PLoS Pathogens* 17(3):e1009204. doi: 10.1371/journal.ppat.1009204.
- Vink, Cornelis, Gloria Rudenko, et H. Steven Seifert. 2012. « Microbial Antigenic Variation Mediated by Homologous DNA Recombination ». *FEMS Microbiology Reviews* 36(5):917-48. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00321.x.
- Virbasius, J. V., et R. C. Scarpulla. 1994. « Activation of the Human Mitochondrial Transcription Factor A Gene by Nuclear Respiratory Factors: A Potential Regulatory Link between Nuclear and Mitochondrial Gene Expression in Organelle Biogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(4):1309-13. doi: 10.1073/pnas.91.4.1309.
- Vives-Bauza, Cristofol, Chun Zhou, Yong Huang, Mei Cui, Rosa L. A. de Vries, Jiho Kim, Jessica May, Maja Aleksandra Tocilescu, Wencheng Liu, Han Seok Ko, Jordi Magrané, Darren J. Moore, Valina L. Dawson, Regis Grailhe, Ted M. Dawson, Chenjian Li, Kim Tieu, et Serge Przedborski. 2010. « PINK1-Dependent Recruitment of Parkin to Mitochondria in Mitophagy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(1):378-83. doi: 10.1073/pnas.0911187107.
- Vogel, Frank, Carsten Bornhövd, Walter Neupert, et Andreas S. Reichert. 2006. « Dynamic Subcompartmentalization of the Mitochondrial Inner Membrane ». *The Journal of Cell Biology* 175(2):237-47. doi: 10.1083/jcb.200605138.
- Vreysen, M. J., K. M. Saleh, M. Y. Ali, A. M. Abdulla, Z. R. Zhu, K. G. Juma, V. A. Dyck, A. R. Msangi, P. A. Mkonyi, et H. U. Feldmann. 2000. « *Glossina Austeni* (Diptera:

- Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique ». *Journal of Economic Entomology* 93(1):123-35. doi: 10.1603/0022-0493-93.1.123.
- Waiswa, C., W. Olaho-Mukani, et E. Katunguka-Rwakishaya. 2003. « Domestic Animals as Reservoirs for Sleeping Sickness in Three Endemic Foci in South-Eastern Uganda ». *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 97(2):149-55. doi: 10.1179/000349803235001688.
- Welburn, S. C., K. Picozzi, E. M. Fèvre, P. G. Coleman, M. Odiit, M. Carrington, et I. Maudlin. 2001. « Identification of Human-Infective Trypanosomes in Animal Reservoir of Sleeping Sickness in Uganda by Means of Serum-Resistance-Associated (SRA) Gene ». *Lancet (London, England)* 358(9298):2017-19. doi: 10.1016/s0140-6736(01)07096-9.
- Wells, J. M., T. D. Prospero, L. Jenni, et R. W. Le Page. 1987. « DNA Contents and Molecular Karyotypes of Hybrid Trypanosoma Brucei ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 24(1):103-16. doi: 10.1016/0166-6851(87)90121-6.
- Wheeler, Richard J., Keith Gull, et Jack D. Sunter. 2019. « Coordination of the Cell Cycle in Trypanosomes ». *Annual Review of Microbiology* 73:133-54. doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115617.
- Wickstead, Bill, Klaus Ersfeld, et Keith Gull. 2004. « The Small Chromosomes of Trypanosoma Brucei Involved in Antigenic Variation Are Constructed around Repetitive Palindromes ». *Genome Research* 14(6):1014-24. doi: 10.1101/gr.2227704.
- Wideman, Jeremy G., Ryan M. R. Gawryluk, Michael W. Gray, et Joel B. Dacks. 2013. « The Ancient and Widespread Nature of the ER-Mitochondria Encounter Structure ». *Molecular Biology and Evolution* 30(9):2044-49. doi: 10.1093/molbev/mst120.
- Wiedemann, Nils, Vera Kozjak, Agnieszka Chacinska, Birgit Schönfisch, Sabine Rospert, Michael T. Ryan, Nikolaus Pfanner, et Chris Meisinger. 2003. « Machinery for Protein Sorting and Assembly in the Mitochondrial Outer Membrane ». *Nature* 424(6948):565-71. doi: 10.1038/nature01753.
- Wirtz, E., S. Leal, C. Ochatt, et G. A. Cross. 1999. « A Tightly Regulated Inducible Expression System for Conditional Gene Knock-Outs and Dominant-Negative Genetics in Trypanosoma Brucei ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 99(1):89-101. doi: 10.1016/s0166-6851(99)00002-x.
- von Wissmann, Beatrix, Noreen Machila, Kim Picozzi, Eric M. Fèvre, Barend M. deC Bronsvort, Ian G. Handel, et Susan C. Welburn. 2011. « Factors Associated with Acquisition of Human Infective and Animal Infective Trypanosome Infections in Domestic Livestock in Western Kenya ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(1):e941. doi: 10.1371/journal.pntd.0000941.
- World Health Organization, et Switzerland WHO Expert Committee on the Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis. 2013. *Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis*. 984. Geneva: World Health Organization.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla, et B. M. Spiegelman. 1999. « Mechanisms Controlling

Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1 ». *Cell* 98(1):115-24. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80611-X.

Xong, H. V., L. Vanhamme, M. Chamekh, C. E. Chimfwembe, J. Van Den Abbeele, A. Pays, N. Van Meirvenne, R. Hamers, P. De Baetselier, et E. Pays. 1998. « A VSG Expression Site-Associated Gene Confers Resistance to Human Serum in *Trypanosoma Rhodesiense* ». *Cell* 95(6):839-46. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81706-7.

Xu, Shan, Edward Cherok, Shweta Das, Sunan Li, Brian A. Roelofs, Shealina X. Ge, Brian M. Polster, Liron Boyman, W. Jonathan Lederer, Chunxin Wang, et Mariusz Karbowski. 2016. « Mitochondrial E3 Ubiquitin Ligase MARCH5 Controls Mitochondrial Fission and Cell Sensitivity to Stress-Induced Apoptosis through Regulation of MiD49 Protein ». *Molecular Biology of the Cell* 27(2):349-59. doi: 10.1091/mbc.E15-09-0678.

Yamamoto, Hayashi, Masatoshi Esaki, Takashi Kanamori, Yasushi Tamura, Shuh ichi Nishikawa, et Toshiya Endo. 2002. « Tim50 Is a Subunit of the TIM23 Complex That Links Protein Translocation across the Outer and Inner Mitochondrial Membranes ». *Cell* 111(4):519-28. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01053-x.

Yoon, Yisang, Eugene W. Krueger, Barbara J. Oswald, et Mark A. McNiven. 2003. « The Mitochondrial Protein Hfis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-like Protein DLP1 ». *Molecular and Cellular Biology* 23(15):5409-20. doi: 10.1128/MCB.23.15.5409-5420.2003.

Zhao, Jian, Tong Liu, Shaobo Jin, Xinming Wang, Mingqi Qu, Per Uhlén, Nikolay Tomilin, Oleg Shupliakov, Urban Lendahl, et Monica Nistér. 2011. « Human MIEF1 Recruits Drp1 to Mitochondrial Outer Membranes and Promotes Mitochondrial Fusion Rather than Fission ». *The EMBO Journal* 30(14):2762-78. doi: 10.1038/emboj.2011.198.

Zíková, Alena, Achim Schnauffer, Rachel A. Dalley, Aswini K. Panigrahi, et Kenneth D. Stuart. 2009. « The F₀F₁-ATP Synthase Complex Contains Novel Subunits and Is Essential for Procyclic *Trypanosoma brucei* ». *PLoS Pathogens* 5(5):e1000436. doi: 10.1371/journal.ppat.1000436.

Zinser, E., C. D. Sperka-Gottlieb, E. V. Fasch, S. D. Kohlwein, F. Paltauf, et G. Daum. 1991. « Phospholipid Synthesis and Lipid Composition of Subcellular Membranes in the Unicellular Eukaryote *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Journal of Bacteriology* 173(6):2026-34. doi: 10.1128/jb.173.6.2026-2034.1991.

Résumé

Titre : Étude d'une mitofusine atypique impliquée dans la dynamique mitochondriale chez *Trypanosoma brucei*

Les trypanosomes africains sont des parasites unicellulaires responsables de la trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil chez l'Homme, et de la trypanosomiase animale africaine ou Nagana chez le bétail. Au cours de son cycle de vie, le trypanosome se présente sous au moins deux formes répliquatives ; la forme procyclique, retrouvée dans l'insecte vecteur (la mouche tsétsé) et la forme sanguine retrouvée dans l'hôte mammifère. Contrairement à la plupart des autres eucaryotes qui possèdent de nombreuses mitochondries, *Trypanosoma brucei*, n'en possède qu'une seule, qui existe sous deux formes principales : (i) une forme pleinement active et développée caractéristique de la forme procyclique qui possède les complexes de la chaîne respiratoire et utilisant la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie et (ii) une forme fonctionnellement et morphologiquement réprimée que l'on retrouve dans la forme sanguine où l'énergie est produite exclusivement par la glycolyse. Cette unique mitochondrie subit des changements morphologiques drastiques qui reflètent l'adaptation à différents environnements, alternant entre l'hémolymphe et les fluides tissulaires riches en proline de la mouche tsétsé et le sang riche en glucose de l'hôte mammifère. Ce remodelage dynamique de la mitochondrie suggère que les trypanosomes possèdent des mécanismes permettant la fusion et la fission de la mitochondrie. L'objectif de ma thèse a été d'identifier et de caractériser une protéine pouvant être impliquée dans la dynamique mitochondriale. Nous avons ainsi caractérisé une mitofusine atypique, *TbMfnL* (Tb927.7.2410), impliquée dans le remodelage des membranes mitochondriales. *TbMfnL* présente des similitudes avec les deux dynamines impliquées dans la fusion des membranes mitochondriales chez les cellules de mammifère (*Mfn/Opa1*) et plus particulièrement avec *Mfn* qui est la protéine impliquée dans la fusion de la membrane externe de la mitochondrie. Grâce à l'utilisation de techniques de microscopie à fluorescence et de microscopie électronique, nous avons pu montrer que *TbMfnL* est localisée dans les membranes mitochondriales. La surexpression de la protéine *TbMfnL* dans les formes procycliques entraîne une importante modification de la structure mitochondriale avec une forte augmentation des branchements mitochondriaux aboutissant à un phénotype d'hyperfusion. L'inactivation de la protéine n'a pas révélé de modification de structure, en accord avec le faible niveau des processus de fission mitochondriale observé chez ce parasite. Nous avons également pu démontrer que *TbMfnL* possède un domaine GTPase fonctionnel, la caractérisant comme une protéine de la famille des dynamines. L'analyse approfondie des domaines de la protéine a permis de mettre en évidence l'importance d'une séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS) en N-terminal, non retrouvée chez *HsMfn*, qui est essentielle à la bonne localisation et à la fonction de la protéine. En plus du domaine MTS, les deux domaines transmembranaires identifiés dans la protéine jouent également un rôle important dans la localisation de *TbMfnL*. Nous avons également montré, lors de la surexpression de *TbMfnL*, une stimulation de la biogenèse lipidique qui se traduit par une forte augmentation du volume de la cellule, du noyau et de la mitochondrie. Enfin, nous avons recherché de potentiels partenaires de la protéine *TbMfnL* par BioID, et avons identifié une douzaine de candidats potentiels. L'ensemble de ces données a permis la caractérisation de la première protéine impliquée dans la fusion mitochondriale chez *T. brucei* : *TbMfnL*.
Mots clés : *Trypanosoma brucei*, mitochondrie, dynamique mitochondriale, fusion, mitofusine, *TbMfnL*, métabolisme

Abstract

Title: Study of an unusual mitofusin involved in mitochondrial dynamics in *Trypanosoma brucei*

African trypanosomes are unicellular parasites responsible for African sleeping sickness as well as the related cattle disease Nagana. During the trypanosome life cycle, the parasite exists in at least two replicative forms; the procyclic form, found in the tsetse fly *Glossina* spp., and the bloodstream form found in the vertebrate host. Unlike most other eukaryotes that contain numerous mitochondria, the pathogenic trypanosomes have a single one, which exists in at least two major forms: (i) the fully active and developed one characteristic for the procyclic stage that harbors the oxidative phosphorylation complexes (OXPHOS) for energy production and (ii) the functionally and morphologically repressed form found in the bloodstream stage with energy produced exclusively through glycolysis. The shape and functional plasticity of their single mitochondrion undergoes spectacular changes, reflecting adaptation to different environments, alternating between the proline-rich haemolymph and tissue fluids of the blood-feeding tsetse fly and the glucose-rich blood of a mammalian host. Dynamic remodelling of the organelle suggests that trypanosomes possess fusion and fission machineries. The objective of my thesis was to identify and characterize a protein that may be involved in mitochondrial dynamics. We characterized an atypical mitofusin, *TbMfnL* (Tb927.7.2410), involved in mitochondrial membrane remodeling. *TbMfnL* shows similarities with the two dynamins involved in mitochondrial membrane fusion in mammalian cells (*Mfn/Opa1*) and more particularly with *Mfn* which is involved in mitochondrial outer membrane fusion. Using fluorescence microscopy and electron microscopy techniques, we were able to show that *TbMfnL* is localized in mitochondrial membranes. Overexpression of the *TbMfnL* protein in the procyclic forms leads to an important modification of the mitochondrial structure with a strong increase of the mitochondrial branches leading to a hyperfusion phenotype. Inactivation of the protein did not reveal any structural modification, in agreement with the low level of mitochondrial fission processes observed in this parasite. We were also able to demonstrate that *TbMfnL* has a functional GTPase domain, characterizing it as a dynamin family protein. In-depth analysis of the protein domains has revealed the importance of an N-terminal mitochondria targeting sequence (MTS), not found in *HsMfn*, which is essential for the proper localization and function of the protein. In addition to the MTS domain, the two transmembrane domains identified in the protein also play an important role in the localization of *TbMfnL*. We have also shown that overexpression of *TbMfnL* stimulates lipid biogenesis resulting in a strong increase in cell, nucleus and mitochondria volumes. Finally, we searched for potential partners of the *TbMfnL* protein by BioID, and identified a dozen potential candidates. All these data allowed the characterization of the first protein involved in mitochondrial fusion in *T. brucei*: *TbMfnL*.

Key words: *Trypanosoma brucei*, mitochondria, mitochondrial dynamics, fusion, mitofusin, *TbMfnL*, metabolism