

■ Les Protistes

Nous vivons parmi la multitude insoupçonnée de ces organismes unicellulaires. Les uns nous sont indifférents, d'autres utiles, certains nuisibles. Parmi ces derniers, *Plasmodium falciparum* est l'agent causal de la malaria (ou paludisme), la maladie parasitaire la plus dommageable à l'homme.

Comment des êtres unicellulaires parviennent-ils à réaliser les grandes fonctions vitales ? Nous étudierons la grande diversité des structures qui leur permet de se mouvoir, de se protéger, de se nourrir, d'équilibrer leur osmolarité et de se reproduire.

Ensuite la diversification des Protistes en différents Règnes, leur parenté avec les autres grands groupes d'êtres vivants, et l'origine de la vie animale pluricellulaire (les Métazoaires) seront esquissées.

FICHE RÉCAPITULATIVE

- Eukaryotes unicellulaires.
- Marins, dulçaquicoles, ou vivant en milieu terrestre humide.
- Libres, fixés, ou symbiotes : leurs relations avec leurs hôtes vont du mutualisme au parasitisme

EXERCICE

Listez les caractéristiques qui distinguent les Eucaryotes des Procaryotes.

1. Présentation du groupe

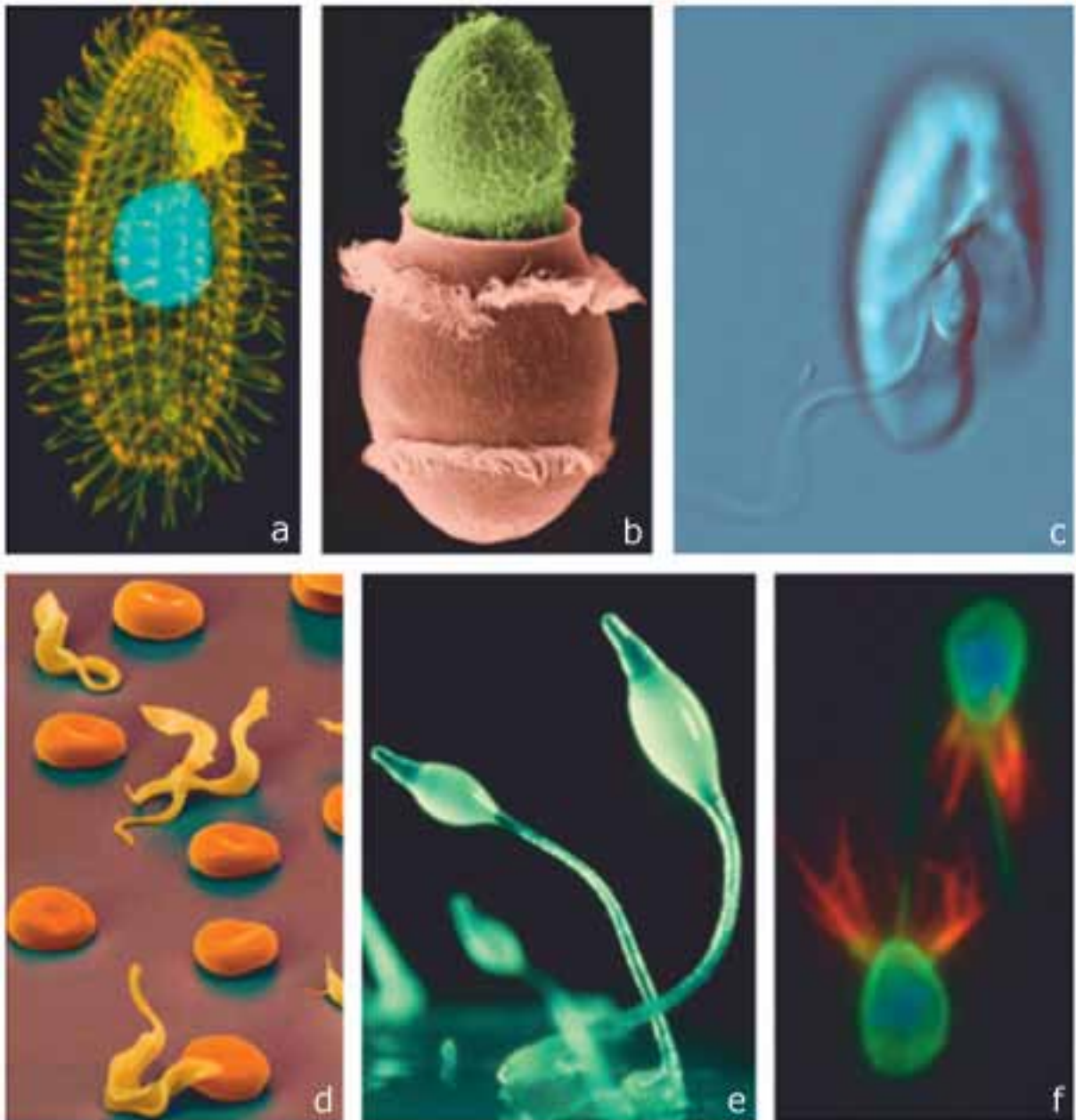


Fig. Pr. 1.7 : Exemples d'espèces de Protistes particulièrement étudiés en recherche : (a) *Tetrahymena thermophila* (b) *Paramecium* sp. et *Didinium* sp. (c) *Oxyrrhis* sp. (d) *Trypanosoma* sp. (e) *Dictyostelium* sp. (f) le Choanoflagellé *Monosiga brevicollis*. (Photos reprises de Montagnes et al (2012) dans la revue *Trends in Microbiology*).

EXERCICE

Quels sont les caractères qui distinguent les Protistes de tous les autres organismes vivants (on parle de synapomorphies) ?

IMPORTANCE DES PROTISTES : PROTISTES ET POLLUTION

Il existe plusieurs types de pollution des eaux de rivière.

En ce qui concerne la pollution organique (eaux d'égout, rejets d'usines alimentaires telles que laiteries, abattoirs, etc.), voici la succession des événements qui se produisent: sur le site de pollution, on constate une activité bactérienne intense, avec une forte consommation d'oxygène. La plupart des organismes eucaryotes ne survivent pas; ils disparaissent donc de la faune habituelle de la rivière. Parmi les Protistes, les Flagellés Bodo et Oikomona, consommateurs de bactéries, survivent généralement bien.

A quelques distances de là, l'activité bactérienne a enrichi l'eau en sels minéraux, ce qui est favorable au développement des algues photosynthétiques; celles-ci prolifèrent et contribuent à réoxygéner le milieu. Les Ciliés herbivores et les Amibes réapparaissent. Petit-à-petit, toute la chaîne alimentaire se reconstitue.

Les stations d'épuration reproduisent ces procédés naturels, mais le processus est accéléré et isolé du courant.

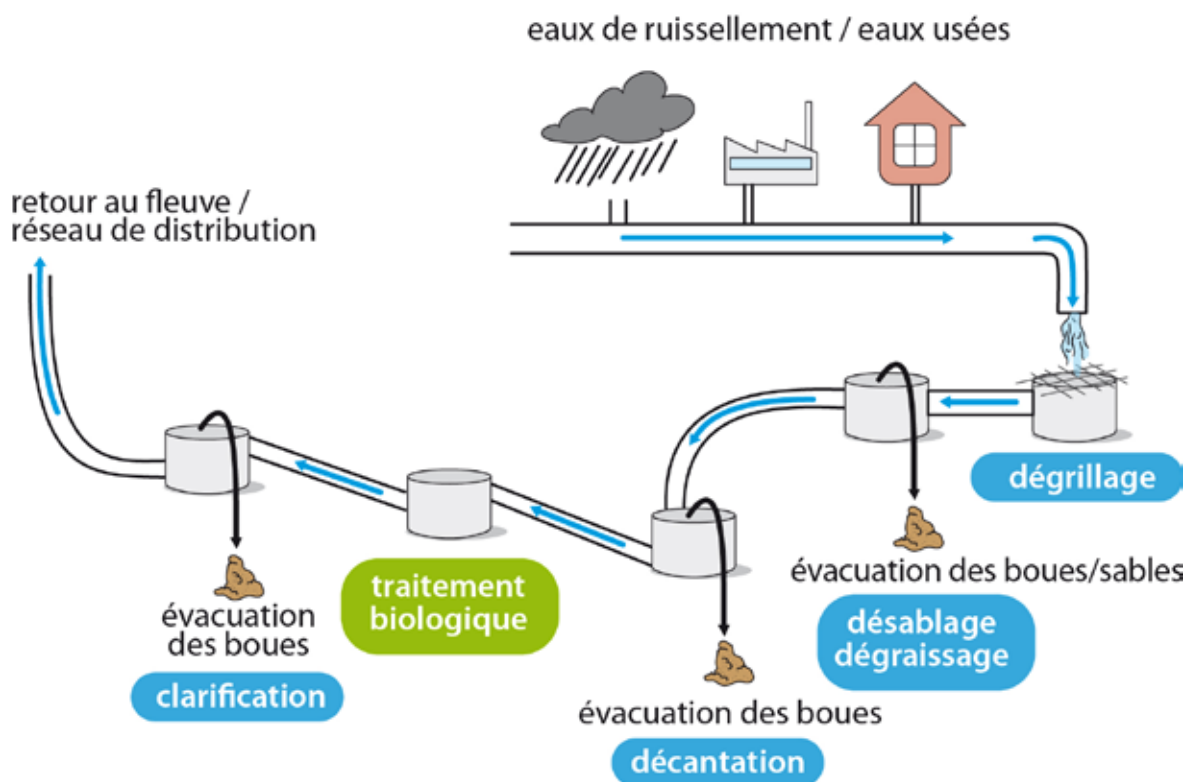


Fig. Pr. 1.8 : Les stations d'épuration : une adaptation de la dépollution naturelle des rivières par les Protistes

2. Exemple-type : *Plasmodium sp.*, vecteur de la malaria

Plasmodium est le parasite qui cause la malaria, ou paludisme. Des accès périodiques de fièvre surviennent dans cette maladie. La fièvre s'accompagne de différents symptômes, comme un gonflement du foie et de la rate, et une anémie sévère. La maladie est causée par plusieurs espèces : *Plasmodium malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum*. La transmission du parasite se fait par un moustique vecteur, l'Anophèle. Cette maladie tue plusieurs millions de personnes chaque année.

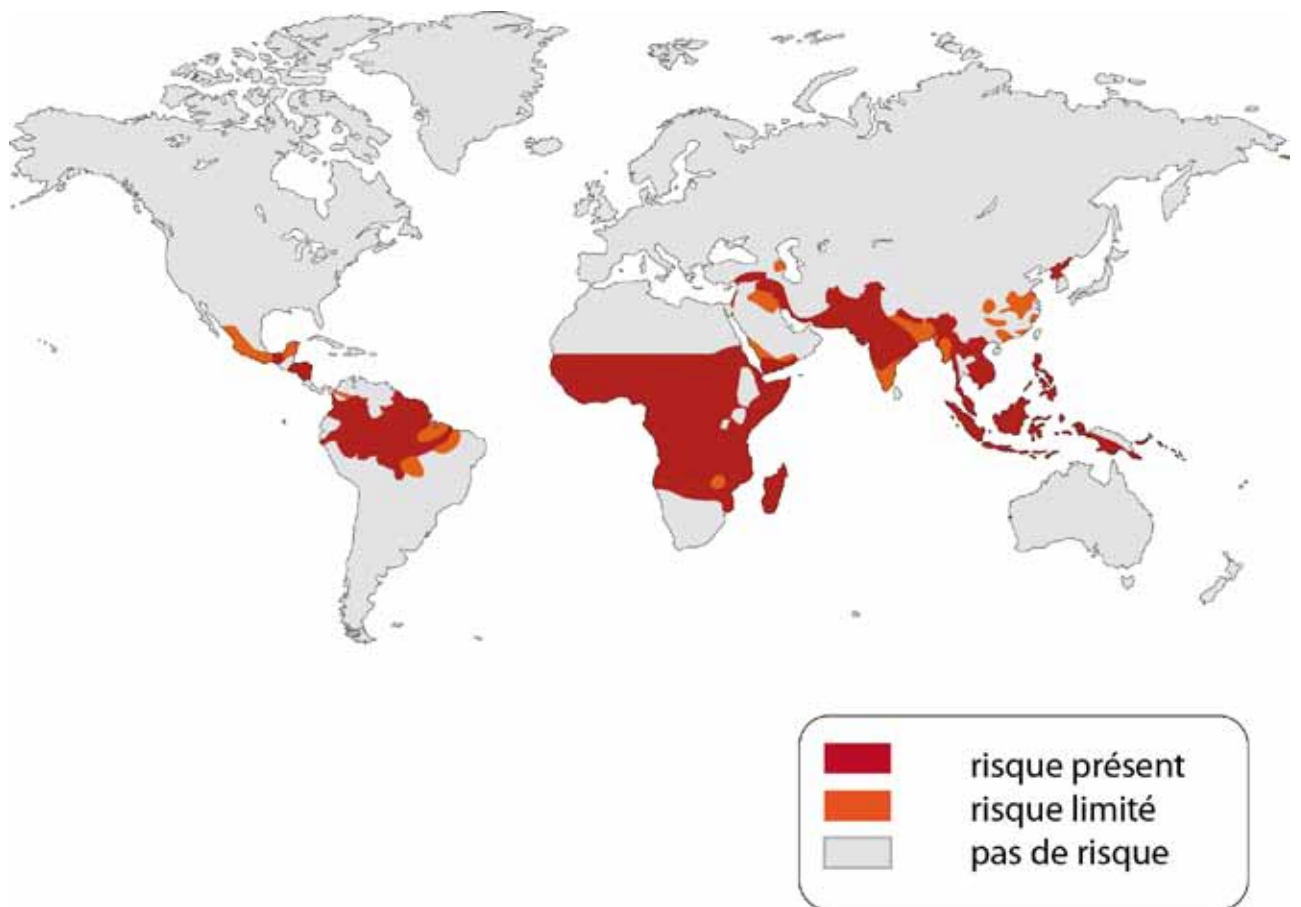


Fig. Pr. 2.3: Distribution géographique mondiale de la malaria. 90% des cas sont répertoriés en Afrique subsaharienne. Modifié d'après Bell et al (2006) dans la journal *Nature Reviews Microbiology* 44 : S7-S20.

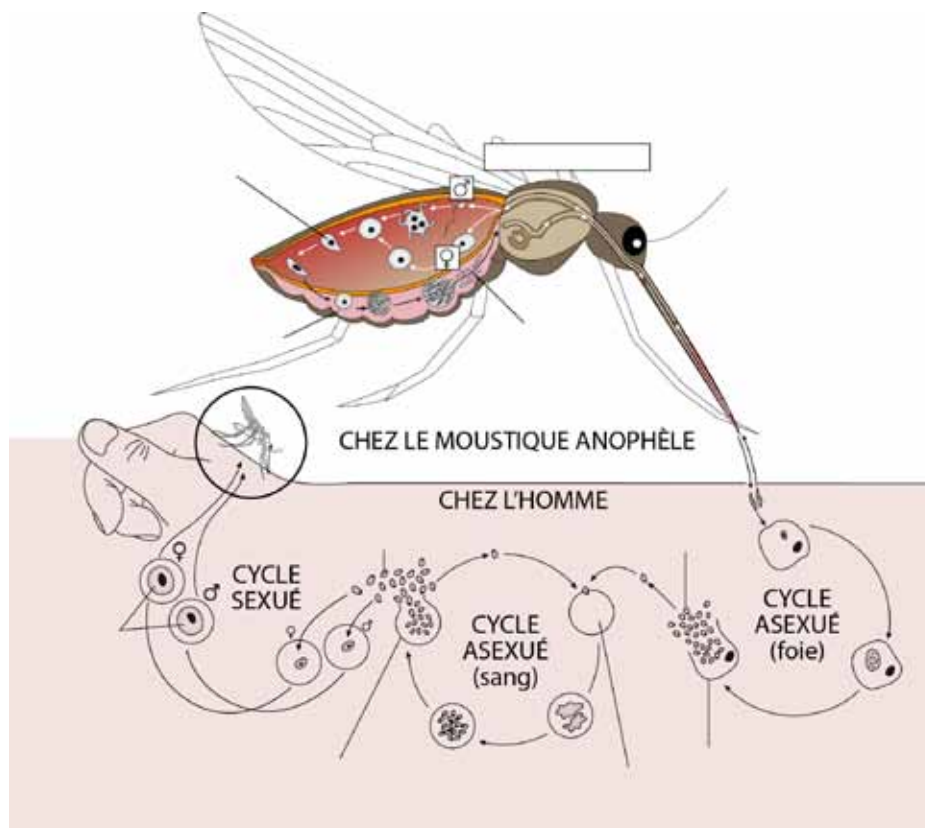


Fig. Pr. 2.5 Cycle de vie de *Plasmodium* sp.

Ce schéma résume le cycle de vie de *Plasmodium* sp, qui se déroule en partie dans le premier hôte (les moustiques du genre *Anopheles* ; partie supérieure du schéma) et en partie dans le second hôte, l'homme (partie inférieure du schéma).

On découvre l'agent pathogène de *Plasmodium*, c-à-d l'étape du cycle de vie qui est capable d'infecter l'humain. On l'appelle le « sporozoïte » et il fait 1 μm de long. Il passe dans le sang via la pique du moustique infecté, et pénètre dans une cellule de foie où il subit des fissions multiples pour fournir des mérozoïtes libérés dans le sang par la rupture de la cellule. Le mérozoïte peut alors pénétrer un globule rouge où il se nourrit du cytoplasme riche en hémoglobine, par endocytose.

Grâce à l'apport de nourriture, le « sporozoïte » grossit (Stade trophozoïte) et se multiplie par reproduction asexuée faisant ensuite exploser le globule rouge qui contient les cellules filles appelés « mérozoïtes ». Les globules rouges parasités éclatent en même temps ce qui provoque accès de fièvre et anémies.

Ces mérozoïtes peuvent entamer une phase de reproduction sexuée en produisant des gamètes mâles et des gamètes femelles haploïdes comme les « sporozoïtes » et « mérozoïtes ».

Seuls les gamètes absorbés par un moustique Anophèle peuvent fusionner et former un zygote diploïde qui poursuit le cycle de vie de *Plasmodium*. Les gamètes qui restent dans le sang du malade dégénèrent. Le zygote perce l'épithélium intestinal du moustique et s'y enkyste.

Une nouvelle phase de multiplication asexuée se produit: le zygote subit une caryocinèse sans cytokinèse. Les noyaux issus sont haploïdes: il s'agit donc d'une méiose. Ces noyaux haploïdes se divisent encore par mitoses pour former finalement quelques milliers de cellules allongées: les sporozoïtes. Ceux-ci sont drainés par la circulation de l'insecte et s'installent dans les glandes salivaires. Lorsque ce moustique pique un homme, il lui injecte un petit lot de sporozoïtes et le cycle de vie est bouclé !

EXERCICE

Quels sont les moyens de lutte à notre disposition pour enrayer le paludisme ?

2.2. EXAMEN INTERNE

2.2.1. Tégument

Nous allons maintenant élargir l'étude des Protistes en décrivant une série de fonctions essentielles à la vie animale telles que le tégument qui sert à protéger l'organisme du milieu extérieur, la locomotion, la digestion, l'excrétion, ... Nous discuterons des adaptations que chaque groupe taxonomique a mis en place pour réaliser ces diverses fonctions, c'est donc le fil rouge qui structure ce cours. La diversité des Protistes est telle que nous ne pourrions donner un aperçu des adaptations mises en place dans ce groupe.

Le « corps » des Protistes est limité par une membrane plasmique à l'ultrastructure typique. De plus, le Protiste peut posséder un squelette externe ou interne de nature diverse, comme une paroi de cellulose qui double la membrane plasmique chez l'algue *Chlamydomonas* sp. Un cas intéressant pour la paléontologie concerne le squelette externe produit par le groupe des Foraminifères, qui accumulent des logettes de tailles croissantes en cours de vie. Ce squelette se fossilise facilement. La diversité des formes de squelettes, ainsi que la diversité des espèces de ce groupe – qui représente la moitié du nombre d'espèces décrites chez les Protistes –, font des Foraminifères un outil essentiel pour le repérage et la datation de couches géologiques.

2.2.2. Système locomoteur

Bien qu'on ne puisse pas encore parler de « système » locomoteur (ni de « systèmes » digestif, excréteur, ... cf. ci-dessous), les Protistes ont élaboré plusieurs moyens pour se déplacer. Vous réaliserez en cours d'année que ces moyens de locomotion sont conservés par les cellules des Métazoaires, bien que leur fonction de locomotion soit parfois détournée.

Par le passé, l'appareil locomoteur était utilisé comme l'un des premiers critères de classification, parce que c'est un des caractères phénotypiques les plus simples à observer sur des organismes de taille aussi limitée, comme vous le verrez en travaux pratiques. Cependant, on s'est rendu compte au cours de la dernière décennie que ce critère ne permet pas de retracer l'histoire évolutive de la diversification des Protistes, et il a depuis été abandonné.

Les Protistes se déplacent à l'aide de flagelles, de cils ou de pseudopodes. Chez les Protistes parasites, l'appareil locomoteur est réduit.

Le Flagelle et les cils

Revoiyez la structure détaillée du flagelle en biologie cellulaire.

Structure

Le flagelle comporte une armature de microtubules. Neuf doublets de microtubules sont disposés en périphérie du flagelle et deux microtubules occupent le centre.

Cette armature est engendrée par un cinétosome, elle porte et meut par battement une évagination de la membrane plasmique : la hampe.

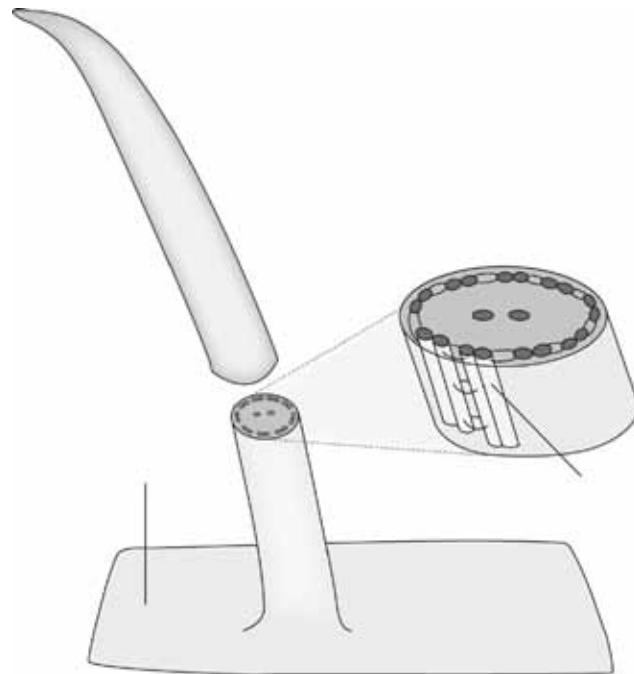


Fig. Pr. 2.8 : Structure d'un cil ou d'un flagelle de cellule animale

Il existe des espèces à 1, 2, 3, 4, 5 flagelles ou plus encore (jusqu'à 14.000 !). Lorsqu'il y a plusieurs flagelles, ils peuvent notamment différer dans leur disposition. Les flagelles sont souvent associés entre eux par des microfilaments reliant leurs cinétosomes. Cette coordination rend les battements particulièrement efficaces.

Un autre moyen de locomotion chez les Protistes consiste en cils. La structure cytotogique du cil est semblable à celle du flagelle, mais sa taille est beaucoup plus réduite. Les zones ciliées, où les cils sont disposés en rangées, couvrent tout ou partie du corps.

Mouvements

Le battement dans un seul plan peut donner soit une propulsion vers l'avant, soit une propulsion vers l'arrière. Le battement dans les trois plans de l'espace produit une propulsion en spirale.

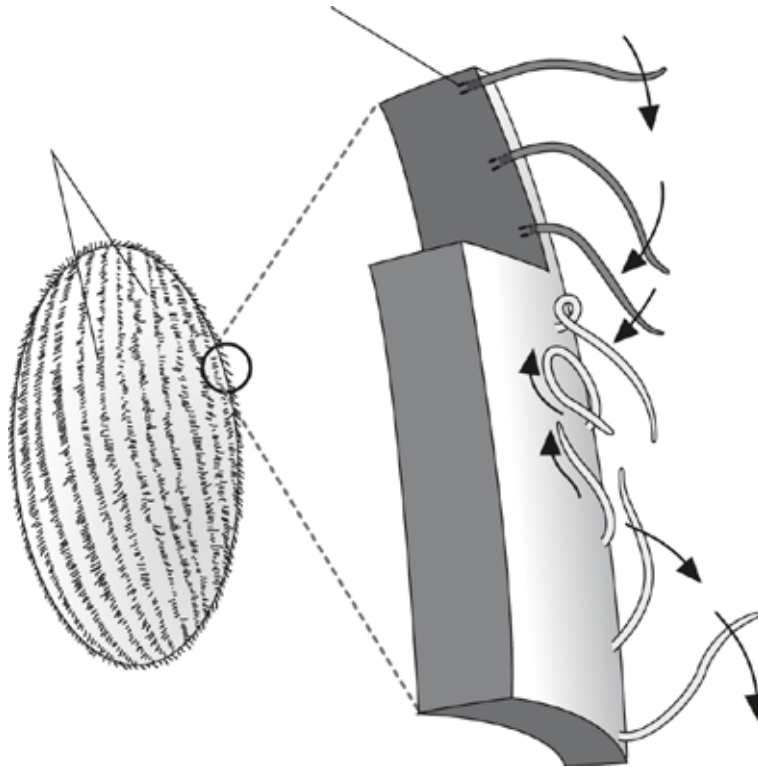


Fig. Pr. 2.10 : Locomotion à l'aide de cils chez un Protiste paramécie

Des vagues de battements courent à la surface des zones ciliées, selon le schéma ci-dessus. Chez certaines espèces évoluées, l'efficacité de quelques zones ciliées est augmentée par l'association de cils voisins au niveau des hampes et des cinétosomes.

Les Pseudopodes

Certains Protistes ont un corps souple et déformable. Des lobes apparaissent continuellement à leur surface ; ces lobes sont des pseudopodes. Ils se déforment lentement, s'allongent, s'élargissent,... et ont comme résultat le déplacement de l'individu.

2.2.3. Système digestif

EXERCICE

Etablissez une comparaison entre les modes de nutrition autotrophe et hétérotrophe.

Bien qu'il existe de nombreux Protistes autotrophes, nous nous intéressons ici principalement aux Protistes hétérotrophes, comme prérequis à l'étude des Métazoaires, qui sont tous hétérotrophes.

Le cas des Amibes

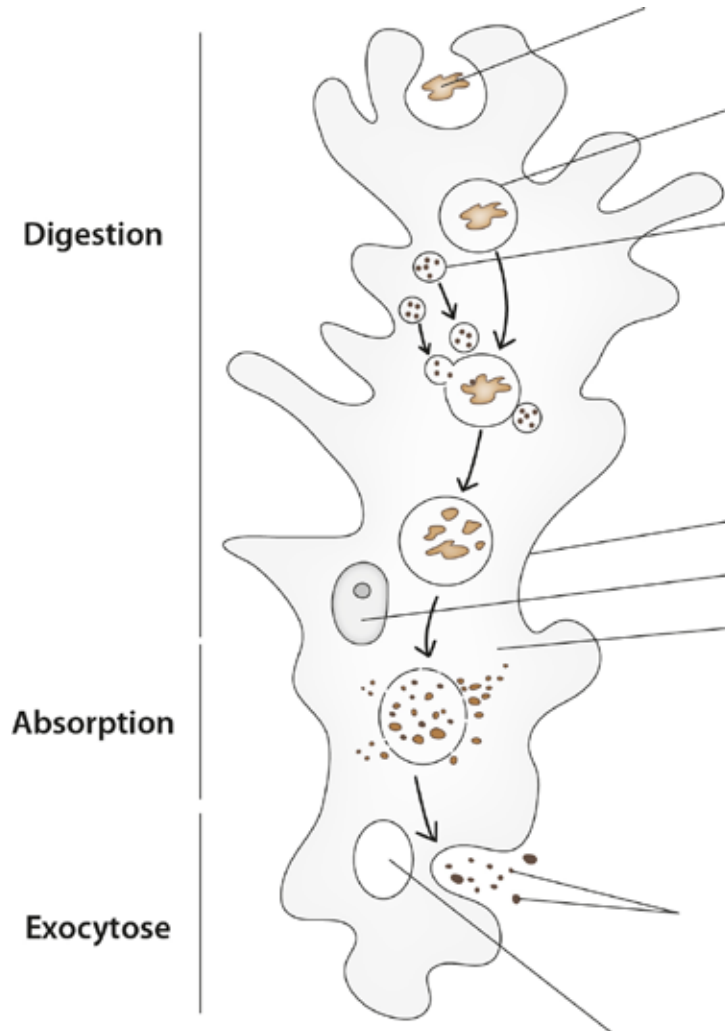


Fig. Pr. 2.13. Digestion intracellulaire chez une amibe

Les Protistes, bien qu'unicellulaires pour la plupart, ont cependant développé plusieurs méthodes très élaborées pour capturer leurs aliments. Les Amibes n'ont aucune structure digestive permanente. D'un point de vue fonctionnel, elles sont cependant analogues au système digestif d'animaux pluricellulaires complexes. La nourriture est absorbée au niveau de vacuoles alimentaires et forment des phagosomes transitoires. La nourriture est digérée à l'intérieur de la cellule; on parle de digestion intracellulaire.

L'amibe engloutit sa proie en l'enfermant entre ses pseudopodes. Elle peut ainsi capturer des proies volumineuses, comme une Paramécie. Au début, la Paramécie se débat dans le phagosome, puis les lysosomes déversent leurs enzymes et la digestion commence. La vacuole alimentaire laisse diffuser les produits de digestion (acides aminés, sucres simples,...) à travers sa membrane, vers le cytosol.

Le cas des Paramécies

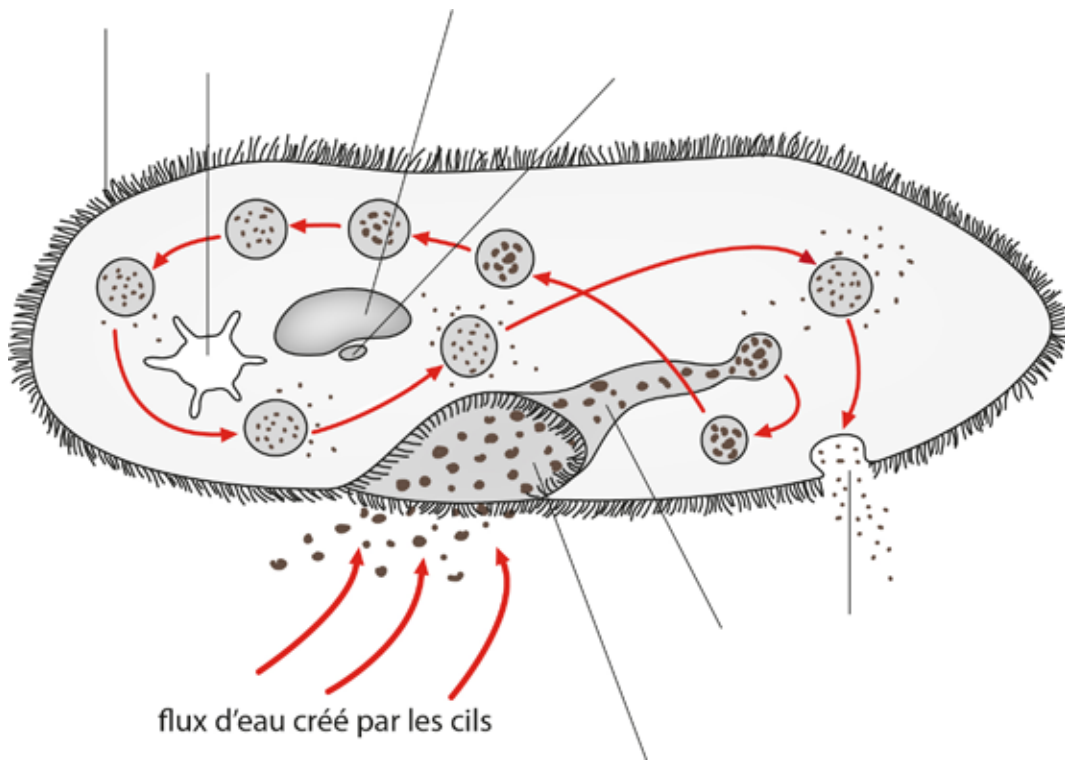


Fig. Pr. 2.14 : Schéma du cytotome et du processus digestif de la Paramécie

Les Ciliés possèdent une seule zone de phagocytose: le cytotome, logé au fond d'une dépression et formant une « cavité buccale » primitive.

La zone ciliée qui entoure la cavité buccale amène les particules alimentaires au cytotome, qui sont absorbées au niveau de phagosomes (vacuole alimentaire)

Des lysosomes s'intègrent aux phagosomes formés pour effectuer la digestion. Les phagosomes suivent un trajet précis dans le cytoplasme et les résidus inassimilables de la digestion sont rejetés au niveau de « l'anus cellulaire », de position fixe lui aussi.

Certains parasites, du sang et des intestins notamment, vivent dans un milieu nutritif comportant des substances simples ; aussi, ils ne montrent aucune structure digestive particulière. Ils absorbent les nutriments directement par diffusion au travers de leur membrane plasmique.

2.2.4. Système respiratoire

Les organismes de petite taille tels que les Protistes n'ont pas besoin de structures spécialisées pour la respiration. La diffusion simple des gaz entre le milieu extérieur et le cytoplasme suffit étant donné le grand rapport surface/volume pour les organismes de cette taille.

2.2.5. Système circulatoire

Les organismes de petite taille tels que les Protistes n'ont pas besoin de structures spécialisées pour la circulation. L'eau, et les solutés diffusent simplement entre le milieu extérieur et le cytoplasme suffisant étant donné leur grand rapport surface/volume.

2.2.6. Système excréteur

Chez de nombreux unicellulaires il n'y a pas de structures excrétrices différenciées. Les déchets azotés diffusent au travers de la membrane plasmique dans l'eau environnante. Certains Protistes possèdent une ou plusieurs vacuoles pulsatiles. Le rôle principal de ces vacuoles est l'élimination de l'excès d'eau ; accessoirement, elles excrètent aussi quelques déchets. Cette structure se retrouve surtout chez les formes d'eau douce sujettes à un flux d'eau important. Chaque vacuole pulsatile passe par un cycle de remplissage et de vidange dans le milieu extérieur par contraction. Souvent la fréquence des contractions est plus importante lorsque la concentration osmotique du milieu environnant décroît.

2.2.7. Système nerveux

Il n'y a pas de système nerveux chez les organismes unicellulaires tels que les Protistes.

2.2.8. Système reproducteur

Chez les Protistes, la reproduction est sexuée ou asexuée. Souvent ces deux modes de reproduction alternent dans la séquence des générations qu'ils engendrent.

Reproduction asexuée

Division binaire : fission ou bourgeonnement

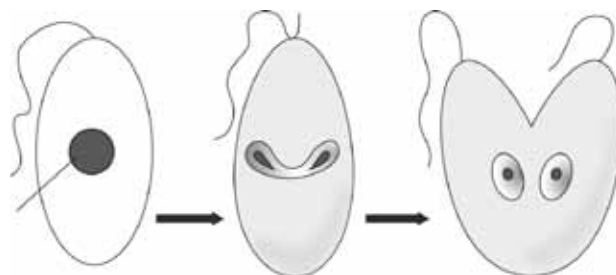


Fig. Pr. 2.16 Reproduction asexuée par fission chez l'Euglène

Chaque caryocinèse (division du noyau) est, dans ce cas, immédiatement suivie d'une cytokinèse (division du cytoplasme) pour produire deux cellules filles.

Division multiple

Une succession de caryocinèses, non suivies de cytokinèses, forme un territoire cytoplasmique plurinucléé appelé plasmode. Ce territoire se différencie ensuite rapidement par cytokinèse en autant d'individus qu'il comporte de noyaux. Nous avons vu un exemple de division multiple dans le cycle de *Plasmodium* : retrouvez-le dans la Fig. Pr. 2.5.

Reproduction sexuée

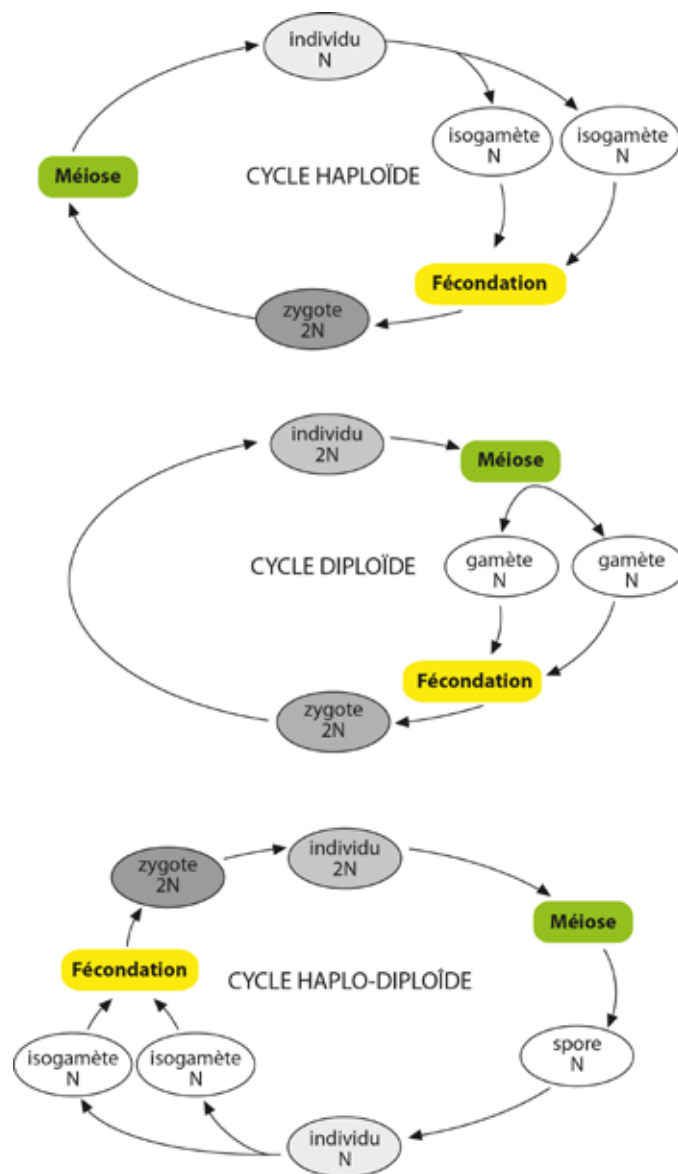


Fig. Pr. 2.17 Les différents cycles de vie impliquant un mode de reproduction sexuée chez les Protistes : alternance de l'haploïdie et de la diploïdie.

De nombreux Protistes pratiquent également la reproduction sexuée. Trois cycles de vie existent en fonction de l'importance relative de la phase haploïde et de la phase diploïde : haploïde, diploïde ou haplo-diploïde.

EXERCICE

Parmi les différents cycles de vie représentés sur la Fig. Pr. 2.16, lequel correspond à celui de *Plasmodium*, le parasite provoquant la malaria, qui vous a été présenté précédemment ? Par ailleurs, quel est le cycle de vie typique des Métazoaires, en ce inclus les êtres humains ?

La reproduction sexuée chez les Paramécies : la conjugaison

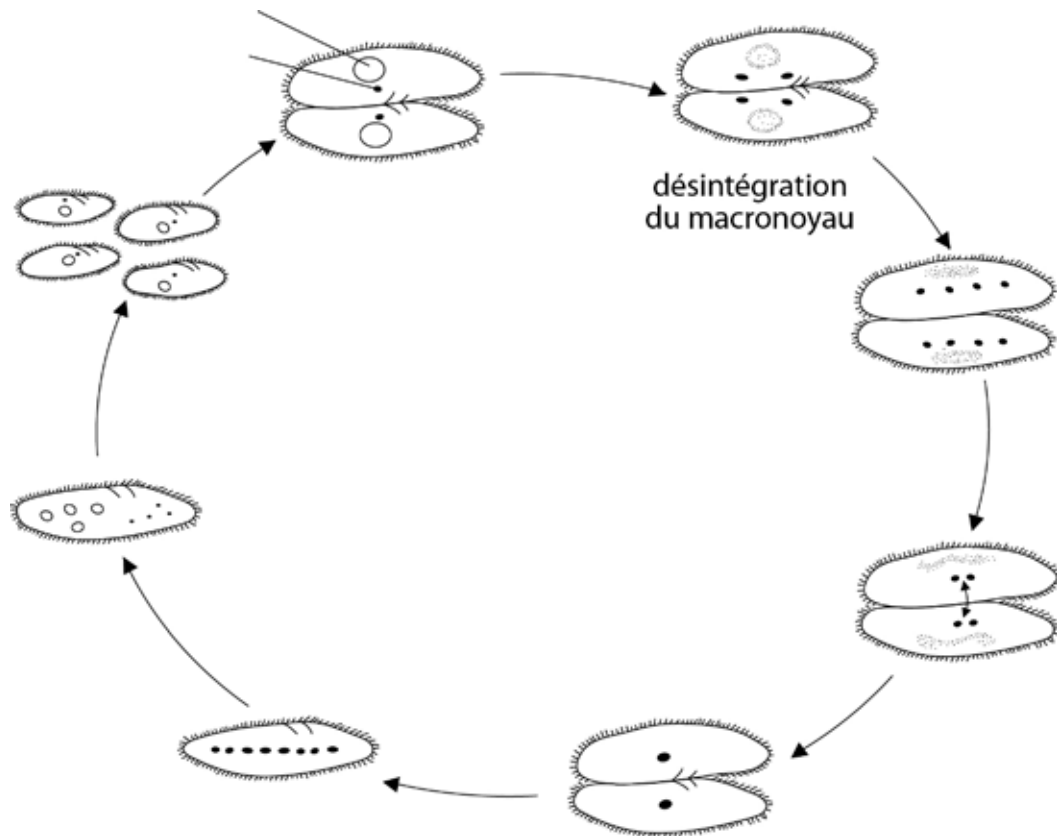


Fig. Pr. 2.18 reproduction sexuée chez la paramécie : conjugaison.

Le processus sexuel de conjugaison est connu chez certains Protistes ciliés comme la Paramécie.

Paramecium caudatum possède deux noyaux : un macronucleus et un micronucleus. Le macronucleus est polyploïde et sert à la gestion quotidienne de la masse cytoplasmique. Le micronucleus est diploïde et reste au repos jusqu'à la phase sexuelle dont il est responsable. Lorsque la conjugaison commence, deux Paramécies s'associent par la face ventrale. Le macronucleus de chacune d'elles dégénère lentement tandis que le micronucleus se divise par méiose. Un seul des 4 noyaux formés subsiste dans chaque conjugué. Après une mitose, un des noyaux de chaque partenaire passe dans l'autre. Chaque noyau migrant fusionne avec le noyau stationnaire. Il y a alors à nouveau un noyau diploïde. Après cela, les conjugués se séparent et le noyau régénère un macronucleus en se répliquant plusieurs fois. Dans ce processus de conjugaison, il n'y a donc pas multiplication des individus mais remaniement du patrimoine génétique.

3/4. Origine, diversité et évolution des Protistes

GÉNÉRALITÉS

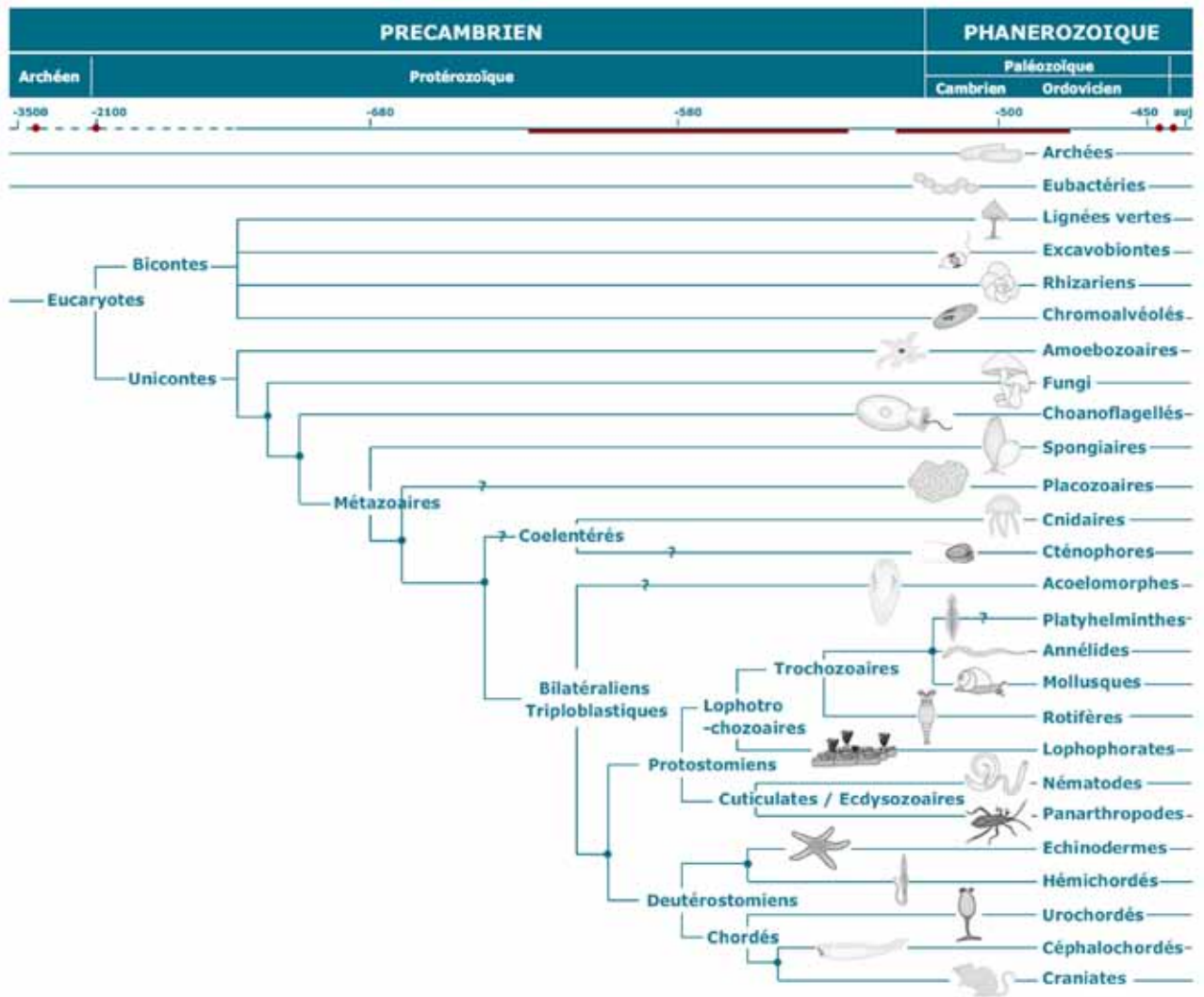


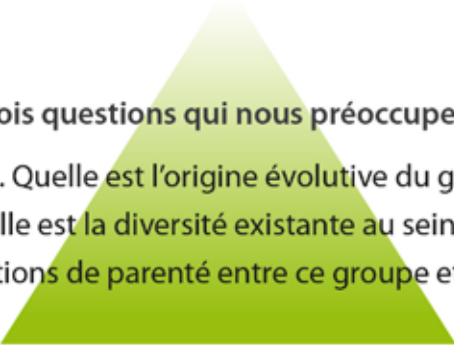
Fig. Pr. 3.1 Arbre phylogénétique hypothétique de la vie sur Terre

L'étude des différents groupes taxonomiques a pour but, au-delà d'acquiescer une culture générale sur la diversité animale, de comprendre comment la complexité et la diversité des organismes présents sur terre se sont mises en place et ont évolué. En effet, une problématique majeure en Biologie reste de nos jours de retracer les étapes de complexification morphologique, physiologique et comportementale qui ont permis de passer d'organismes unicellulaires eucaryotes tels que les Protistes à des organismes tels que... les mammifères

L'étude des organismes les plus simples structurellement tels que les Protistes, les spongiaires et les cnidaires, a dans ce cadre un intérêt particulier, puisqu'ils nous permettent d'imaginer ce à quoi ressemblaient, potentiellement, nos ancêtres.

Par exemple, le plan du corps simple des spongiaires, dépourvu notamment d'organes, de muscles et de système nerveux, permet d'imaginer comment, par le passé, notre ancêtre est passé d'un stade unicellulaire tel que les Protistes, vers la multicellularité.

Comment les cellules qui étaient autrefois des organismes indépendants ont appris à communiquer et à vivre comme une partie d'un corps plus complexe formé de cellules différenciées (ayant des fonctions différentes) ?



Trois questions qui nous préoccupent :

1. Quelle est l'origine évolutive du groupe ?
2. Quelle est la diversité existante au sein du groupe ?
3. Quelles sont les relations de parenté entre ce groupe et les autres groupes étudiés ?

Fig. Pr. 3.2 Origine, diversité et évolution

Quel que soit le groupe taxonomique considéré, cette problématique se résume en trois questions principales :

1. quelle est l'*origine évolutive* du groupe taxonomique ? Il s'agit donc ici de retrouver et de caractériser l'*ancêtre* du groupe étudié, pour identifier les acquisitions de caractères (morphologiques, physiologiques ou autres) qui différencient ce groupe des autres.
2. Quelle est la *diversité existante* au sein du groupe taxonomique ? Répondre à cette question permet d'identifier les caractères qui définissent l'*appartenance au groupe* (on distinguera en cours les caractères synapomorphiques des caractères autapomorphiques). Ces caractères sont ceux pour lesquels il est particulièrement important de comprendre comment et quand ils ont évolué, puisqu'ils correspondent à des étapes évolutives majeures de l'histoire de la vie.
3. Quelles sont les relations de parenté (on parlera de *relations phylogénétiques*) entre ce groupe taxonomique et les autres groupes étudiés ? Ceci permettra de replacer les caractères du groupe dans la séquence plus large de *complexification de la vie*, des Protistes aux organismes multicellulaires tels que les mammifères.

LE CAS DES PROTISTES

1) Quelle est l'origine évolutive des Protistes ?

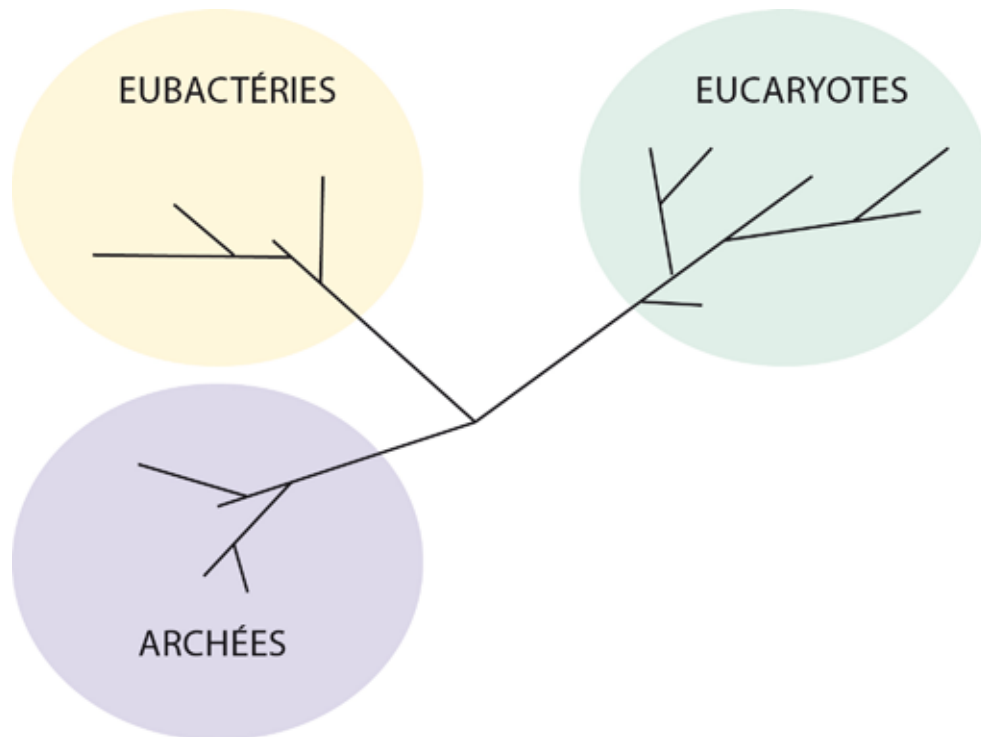


Fig. Pr. 3.7 Représentation schématique de la phylogénie (dans ce cas, phylogénomique) basée sur le séquençage de génomes complets (tout l'ADN) de 1000 eubactéries, 100 archées et 100 eucaryotes en mars 2010.

Depuis l'automatisation des techniques de séquençage de l'ADN, on a utilisé cette approche pour séquencer le génome complet d'un nombre croissant d'organismes, en particulier ceux de petite taille pour lesquels l'accès aux caractères phénotypiques reste limité.

Cet arbre démontre deux choses principalement : il existe deux grands types, et non pas un seul, de bactéries : les Eubactéries et les Archées. Ensuite, cet arbre démontre aussi la monophylie des Eucaryotes, c.-à-d. que tous les Eucaryotes descendent d'un ancêtre commun. On peut en dire que l'apparition d'un noyau au sein des cellules n'a été inventé qu'une seule fois au cours de l'évolution.

Les plus anciennes traces fossiles des Procaryotes remontent à 3 milliards d'années, mais il s'agit bien surtout d'une limite inférieure : les Procaryotes pourraient être encore beaucoup plus anciens. Les Archées se distinguant des Eubactéries par certains caractères biochimiques, comme la présence dans la membrane cellulaire de lipides très particuliers, ou le mécanisme de réplication de l'ADN. On les trouve dans des environnements extrêmes comme en milieu marin saturé en sel. Les Eubactéries, ou « vraies bactéries », comprennent tous les autres Procaryotes ; leur membrane cellulaire diffère de celle des Archées et leur paroi cellulaire de peptidoglycane contient de l'acide muramique. Ce sont surtout les analyses moléculaires qui ont permis de mettre en évidence le schisme existant au sein des Procaryotes, entre Archées et Eubactéries.

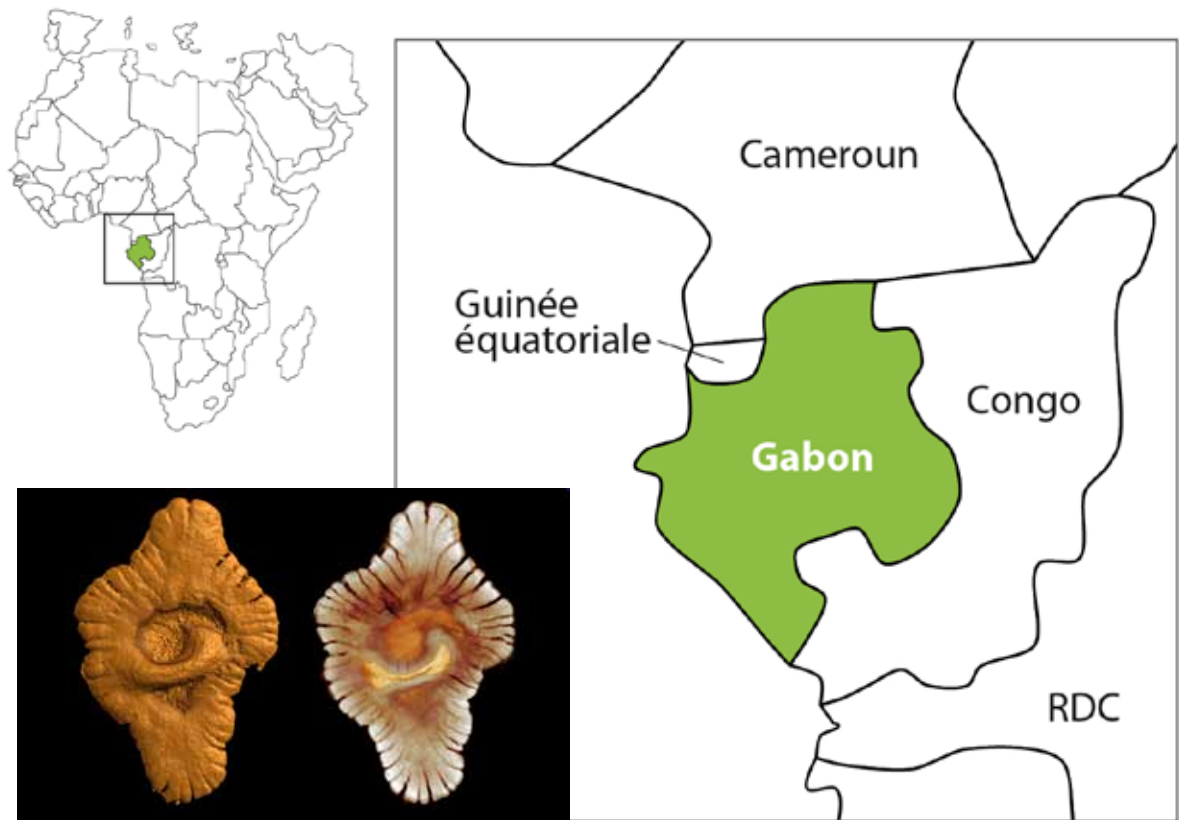


Fig. Pr. 3.8 A gauche, position et disposition des couches fossilifères contenant des traces de vie pluricellulaires vieilles de 2,1 milliards d'années (d'après El Albani et al dans la revue Nature en 2010). A droite: reconstruction virtuelle de la morphologie externe (à gauche) et interne (à droite) d'un spécimen fossile du site gabonais.

Les Eucaryotes (du grec « eu », vrai et « karuon », noyau) regroupent tous les autres organismes vivants. On avait déjà des traces fossiles d'Eucaryotes unicellulaires vieilles de 1,9 milliard d'années. On a récemment découvert des traces de vie pluricellulaire vieilles de 2 milliards d'années au Gabon, alors que jusqu'en 2009 les premières formes de vie pluricellulaire remontaient à 600 millions d'années environ. Il s'agit de macrofossiles de plusieurs cm de longueur, trop grands et trop complexes pour être des procaryotes ou des eucaryotes unicellulaires.

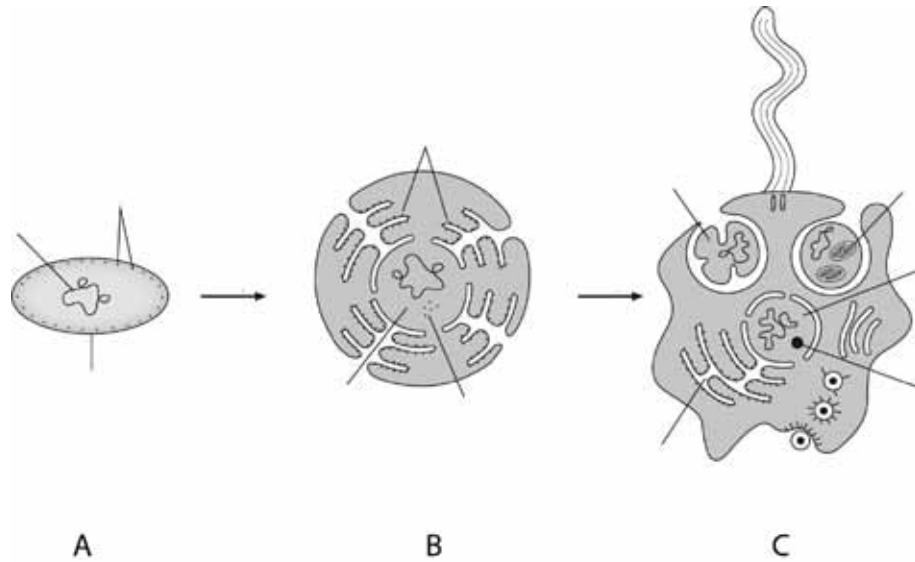


Fig. Pr. 3.9 Hypothèse sur la transition des Procaryotes vers les Eucaryotes, dont les Protistes. A : procaryote classique ; B : accroissement de taille des procaryotes et invagination de la membrane cytoplasmique ; C : inclusion de petits procaryotes dans de plus gros procaryotes.

L'hypothèse retenue actuellement pour expliquer l'apparition d'organismes eucaryotes, plus récents, à partir de Procaryotes, plus anciens, est la suivante. On aurait eu d'une part un accroissement de taille des Procaryotes, puisque les Eucaryotes sont en moyenne 10 fois plus gros que les Procaryotes accompagné d'invaginations de la membrane cytoplasmique pour produire des organites tels que le reticulum endoplasmique ou la membrane entourant le noyau. Enfin, on imagine l'inclusion de petits Procaryotes dans de plus gros Procaryotes, les premiers devenant ainsi des organites des seconds, tels que les mitochondries et les chloroplastes (en C).

2) Quelle est la diversité existant au sein des Protistes ?

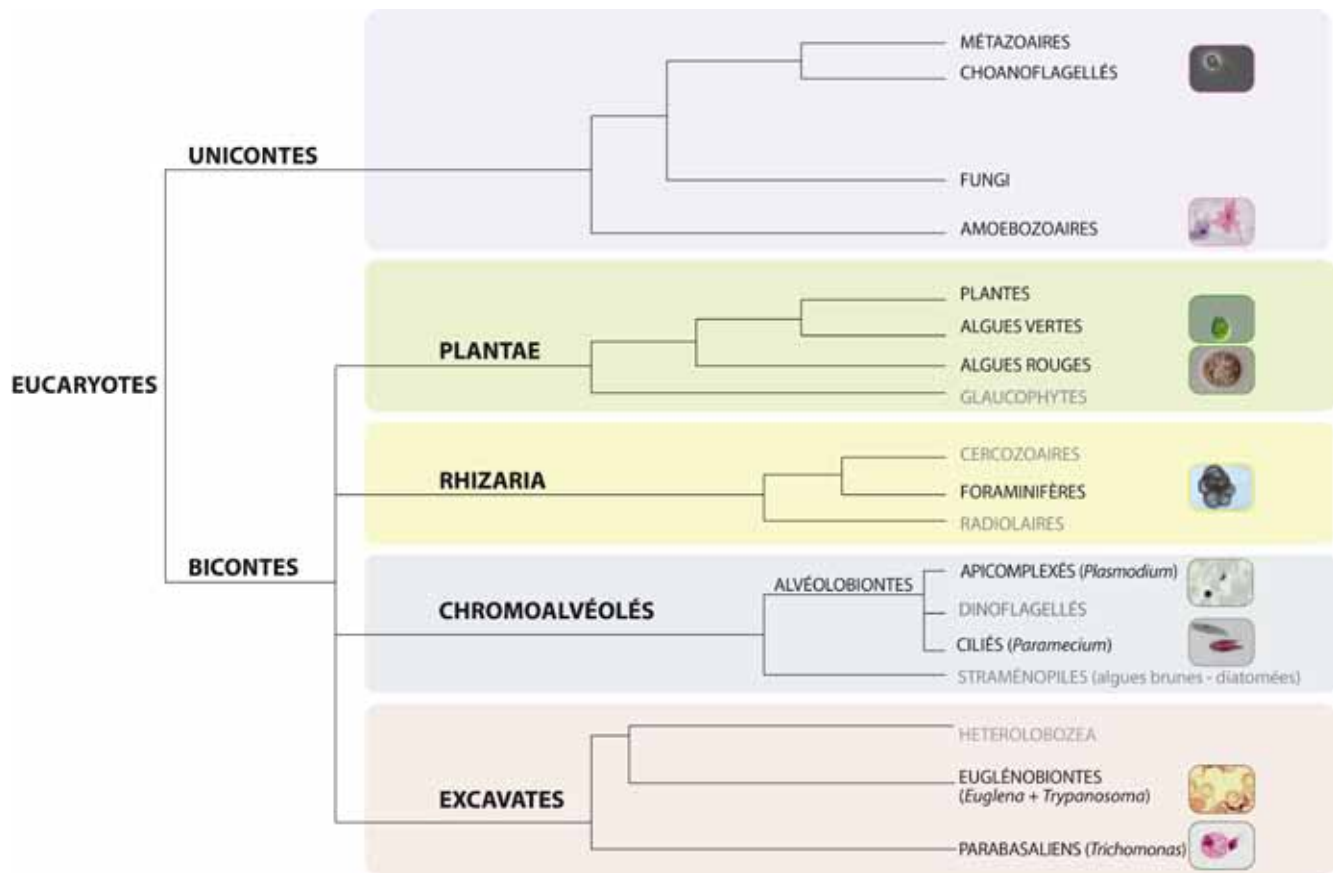


Fig. Pr. 3.10 Arbre phylogénomique des Protistes. Quelques observations intéressantes: la plupart des Excavates sont parasites comme le trypanosome *Trypanosoma brucei* que l'on retrouve chez les Kinetoplastids au sein des Euglénobiontes ou *Trichomonas*, un parasite responsable de maladies uro-génitales sévères chez les humains (dans le clade des Trichomonads). Parmi les Rhizaria on retrouve les Foraminifères, ces Protistes à test calcaire dont les traces fossiles servent à la datation des couches géologiques, et dont les espèces vivantes actuellement servent de bioindicateurs de la qualité de l'eau. Les Chromalvéolés regroupent la plupart des algues (diatomées, ...) ainsi que les Protistes ciliés comme la *Paramecie* dans le clade des Ciliés et des Protistes parasites tel que le *plasmodium* (dans le clade Apicomplexés). Parmi les Unikontes, on trouve les amibes (Amoébozoaires), ainsi que les champignons et les Métazoaires (d'après Keeling et al. dans la revue *Trends in Ecology and Evolution* en 2005).

La phylogénomique (phylogénie appliquée à l'analyse de génomes complets) des Eucaryotes nous révèle plusieurs choses. Premièrement, la plupart des organismes vivants est de taille microscopique : Archées, Eubactéries et Eucaryotes unicellulaires forment la grande majorité des groupes présents sur cet arbre!

Deuxièmement, vous constatez que la diversité des Protistes est telle qu'on a créé plusieurs règnes pour les classer. L'un de ces règnes, celui des Unikontes, englobe les Animaux ou « Métaozaires » qui n'ont plus droit à un règne pour eux seuls. Les Protistes font partie soit du règne des « Plantae » où on retrouve une partie des Protistes photosynthétiques tels que les algues vertes (*Chlamydomonas*,...), soit des règnes nommés « Excavates », « Chromalvéolates », « Rhizaria » et « Unikontes » dans lequel sont regroupés pour la plupart les Protistes hétérotrophes. Une espèce emblématique de chaque règne est indiquée dans la légende de la figure mais il faut se rendre compte que les relations entre ces Protistes ne se voient pas dans leur phénotype, mais uniquement dans leur génotype.

Troisièmement, on peut constater que les Protistes, dont on retrouve des représentants parmi les Plantae, et les Unikontes et qui forment l'ensemble des Excavates, des Rhizaria et des Chromalvéolates, est donc un groupe « paraphylétique », tout comme celui des "Invertébrés ». Ceci signifie qu'il n'existe pas un seul groupe comprenant tous les Protistes, et donc qu'il n'existe pas de caractères qui permettent de distinguer les Protistes de tous les autres organismes vivants de façon définitive (pas d'autapomorphies, ou de synapomorphies). Le terme « Protiste », tout comme le terme « Invertébré », est utilisé à défaut de mieux, à l'heure actuelle en Biologie.

3) Origine de la multicellularité : des Protistes aux Spongiaires ?

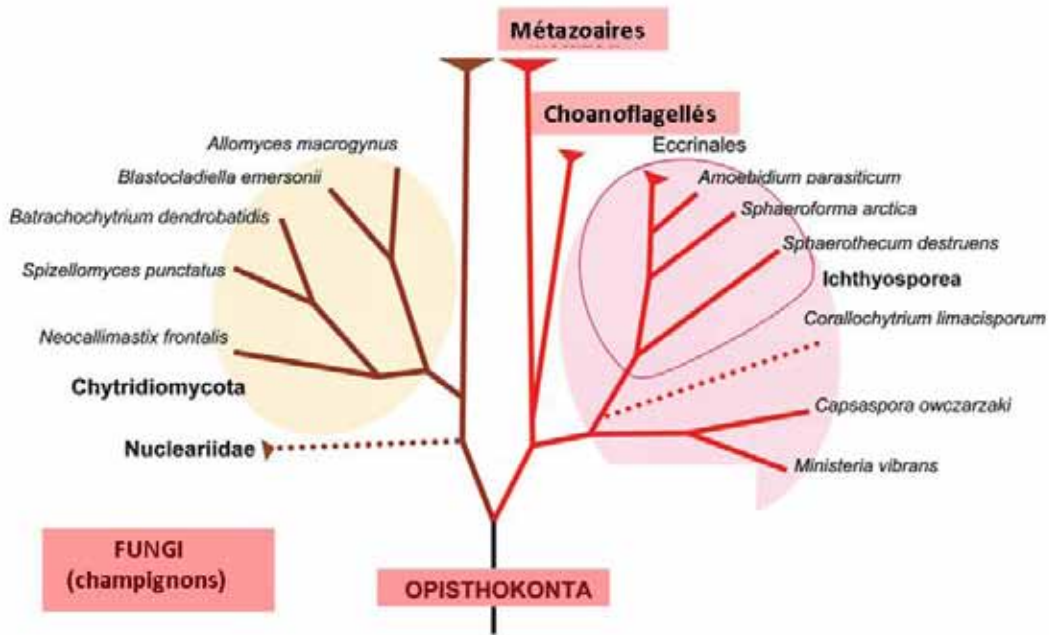


Fig. Pr. 3.11: Arbre phylogénomique des Opisthokontes (d'après Mikhailov et al dans la revue Bioessays en 2009).

Les Unikontes nous intéressent plus particulièrement puisque c'est dans ce groupe que se retrouvent les Métazoaires. On a ainsi découvert qu'un groupe de Protistes à collerette, les Choanoflagellés, sont le clade sœur des Métazoaires. C'est donc au sein des Unikontes qu'on trouve l'origine de la vie animale.

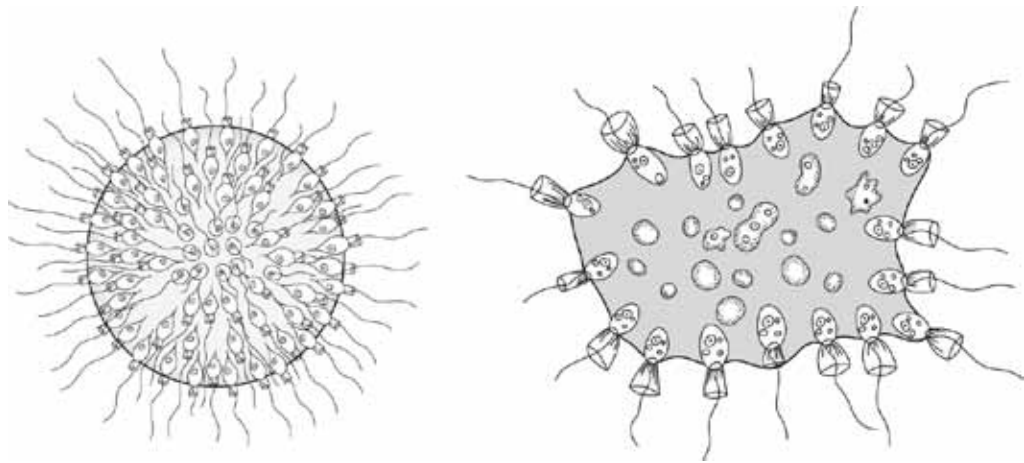


Fig. Pr.3.12 Un aperçu de la diversité des Choanoflagellés vivant en colonie: à gauche *Proterospongia* sp., à droite *Sphaeroeca* sp.

Qui sont les Choanoflagellés ? Il en existe 600 espèces ; d'une taille d'environ 10 μm , ils vivent en eau douce et en eau de mer, sous forme fixée ou libre, solitaire ou coloniale. Les formes coloniales sont formées de cellules juxtaposées, mais non différenciées morphologiquement. Au-delà de leur position dans l'arbre de vie à côté des Métazoaires, les Choanoflagellés possèdent quelques caractéristiques phénotypiques et génotypiques qui soutiennent l'idée qu'ils sont à l'origine de la vie animale pluricellulaire.

EXERCICE

Donnez les caractéristiques phénotypiques et génotypiques qui rapprochent les Choanoflagellés des Spongiaires ?

■ TP Protistes (6 h)

OBJECTIFS :

1. Découvrir, organiser et classer la diversité des Protistes sur base des préparations proposées (animaux vivants et fixés)
2. Introduire les principes de phylogénie sur base d'analyse moléculaire et croisement des données morphologiques avec les données moléculaires disponibles en vue de la classification des individus

Vous serez donc amenés à :

- Trouver des critères morphologiques permettant la classification des individus observés
- Apprendre à utiliser les critères moléculaires sur ordinateur

INTRODUCTION :

On regroupe sous le nom de PROTISTES les êtres vivants **eucaryotes unicellulaires**. Leur classification fait l'objet de bien des controverses, mais leur **origine polyphylétique** est de plus en plus probable. Ils ne constituent donc pas un Embranchement ou Phylum suivant la définition actuelle, et ce nom de « Protistes » regroupe des organismes d'origines évolutives très diverses. A défaut d'un autre cadre, c'est dans celui du cours de Zoologie que l'on traitera des Protistes.

Nous verrons au cours de ce TP une série de représentants emblématiques des embranchements principaux de Protistes. Vous les découvrirez d'abord lors d'une séance au niveau morphologique et comportemental grâce à une série de préparations fixées et d'organismes à observer vivants au microscope. On parle de caractères phénotypiques.

Vous aurez ensuite accès à une partie de leur patrimoine génétique, on parle de caractère génotypique. Le but de cette seconde séance est de vous familiariser d'une part avec la complexité du problème que posent les biologistes qui veulent organiser la diversité de la vie sur Terre, et d'autre part avec les solutions qu'ils ont développées pour résoudre ce problème. Dans ce but, nous vous demandons donc de proposer, sur base de caractères phénotypiques puis génotypiques, une classification des Protistes qui vous sont présentés.

PARTIE 1: Identification de caractères phénotypiques pour la classification des Protistes

1. Complétez le tableau de critères morphologiques permettant l'identification des différents individus que vous allez observer au cours de ce TP et essayez de classer les individus sur base de ces critères :

2. Observation d'un mélange de Protistes (préparation *Mixed Protozoa w.m.*)

Dans les préparations, les colorations sont artificielles et ne servent qu'à améliorer les contrastes des structures. Elles ne sont en aucun cas un critère de distinction des espèces.

Dans cette préparation retrouvez une Amibe.

L'Amibe est dulçaquicole. Elle n'édifie ni squelette interne, ni squelette externe. Son corps, tantôt ramassé sur lui-même, tantôt très allongé, est de forme variable et irrégulière. Il peut atteindre 500 μm . Il développe des lobes arrondis ou des évaginations digitiformes, les **pseudopodes**. Le corps est limité par une **membrane plasmique**. Le **cytoplasme** contient les organites cellulaires traditionnels : un noyau ovalaire, des vésicules contenant des particules alimentaires (**vacuoles alimentaires**), une **vacuole pulsatile**, et diverses **inclusions**.

Faites un schéma d'une Amibe. Légendez-y les structures citées en gras dans les notes de TP. Estimez la taille de cet individu.

3. Observation de l'Euglène (préparation Euglena, w.m.)

En parcourant cette préparation, on repère facilement des individus de grande taille, fusiformes, assez colorés, dont le **cytoplasme** renferme, à côté d'un noyau central rond à gros nucléole, une série d'**inclusions**. Certaines inclusions comportent une région centrale de même taille que le nucléole, se prolongeant par deux expansions fusiformes ; ce sont des **plastés chlorophylliens**. Ces Protistes sont donc capables de photosynthèse ; ce sont des « Euglènes ». L'une des extrémités de ces individus est pointue, l'autre est tronquée et s'enfonce en goulot d'où sort un **flagelle** visible en utilisant les réglages adéquats du microscope.

Schématisez et légendez à l'aide des notes (mots en gras) une Euglène. Estimez sa taille et légendez les structures en gras dans les notes de TP.

4. Observation de Trypanosomes (préparation *Trypanosoma sp.*)

On étudie les Trypanosomes dans des frottis de sang d'individus atteints de la maladie du sommeil. Les préparations disponibles proviennent de rats (« *Trypanosoma rhodesiense* in blood smear rat ») ou d'Homme (« *T. gambiense* »). Les Trypanosomes se trouvent dans le plasma entre les globules rouges (dépourvus de noyaux) et les globules blancs (dotés d'un noyau rond ou multilobé, fortement coloré en violet).

Le corps de *T. rhodesiense* est **fusiforme**. Il porte un seul **flagelle** implanté sur un cinétosome situé au voisinage du **kinétoplaste** à **l'extrémité postérieure** de l'animal, en arrière du noyau. Le flagelle se dirige vers l'avant en soulevant la membrane plasmique, formant ainsi la structure appelée **membrane ondulante**. Seule l'extrémité du flagelle, situé à l'extrémité antérieure de l'animal, est libre. Le flagelle vous permet donc **d'orienter** l'animal.

Observez l'individu, faites un schéma vous permettant de repérer les structures citées en gras dans les notes de TP. Estimez sa taille.

5. Observation de *Trichomonas vaginalis*

La préparation (« *T. vaginalis*, smear ») consiste en un frottis coloré réalisé à partir d'une culture *in vitro* inoculée avec un prélèvement vaginal d'une femme. Celle-ci souffrait de vaginite purulente due à la présence de ce parasite vivant dans les cavités des voies génitales humaines. La réalisation de ce frottis entraîne facilement des déplacements de structures et est source d'artéfacts. On recherchera donc des individus bien préservés où l'ensemble des caractéristiques décrites est visible.

Ces Protistes, en forme de poire lorsqu'ils sont vivants, prennent dans le frottis une forme lenticulaire plate. Ils mesurent en moyenne une vingtaine de μm de long. Ils portent à la **région antérieure** cinq flagelles implantés sur le cinétosome au-dessus du **noyau** ovoïde. Le granule sphérique surplombant le noyau correspond au **complexe kinétoplastique** ; des fibrilles relient ces structures. Un **axostyle** tubulaire, formé de microtubules, parcourt la longueur du corps et paraît faire saillie à l'arrière où il reste cependant enveloppé par la membrane plasmique. Quatre des cinq **flagelles** sont **libres**, le cinquième, rabattu le long du corps sous la membrane plasmique, forme une courte **membrane ondulante**, puis devient libre à l'arrière.

Observez l'individu, faites un schéma vous permettant de repérer les structures citées en gras dans les notes de TP. Estimez sa taille.

6. Observation de *Plasmodium malariae*

La préparation (« *Pl. malariae*, blood smear ») consiste en un frottis de sang d'un individu atteint de malaria : on trouve les parasites à l'intérieur des globules rouges.

Observer tout d'abord l'aspect des différents types de globules sanguins du frottis de façon à ne pas confondre certains **leucocytes** avec les globules rouges parasités. Rechercher ensuite des **globules rouges** infectés : ils sont légèrement rétrécis ou présentent dans leur cytoplasme une structure pouvant ressembler à un noyau, d'où la confusion possible avec des leucocytes.

Parmi eux, repérer en particulier :

- un globule rouge contenant un parasite de petite taille, uninucléé, pauvre en cytoplasme : c'est un **mérozoïte** (= agamocyte)
- un globule rouge contenant un parasite de grande taille, un trophozoïte occupant presque tout le cytoplasme, présentant une vacuole et contenant des granules noirs irréguliers, produits de dégradation de l'hémoglobine : il s'agit soit d'un **trophozoïte** (= agamonte), soit d'un **gamonte**
- un globule contenant une rosace de **mérozoïte** en formation. C'est la phase de multiplication agame. Vous observez donc le stade **schizonte**
- un globule contenant des **mérozoïte** individualisés. Une fois les **mérozoïte** arrivés à maturité, l'éclatement du globule libère dans le sang des individus susceptibles de recommencer le cycle agame ou de se transformer en gamètes qui achèveront leur évolution à condition d'être absorbés par un Anophèle (moustique) d'une espèce appropriée.

Observez, identifiez et schématisez les différents stades du cycle du parasite présents dans ce frottis sanguin. Notez les critères utilisés pour l'identification de chacun d'entre eux.

Quel est le stade le plus/le moins fréquent ?

7. Observation des Protistes vivants

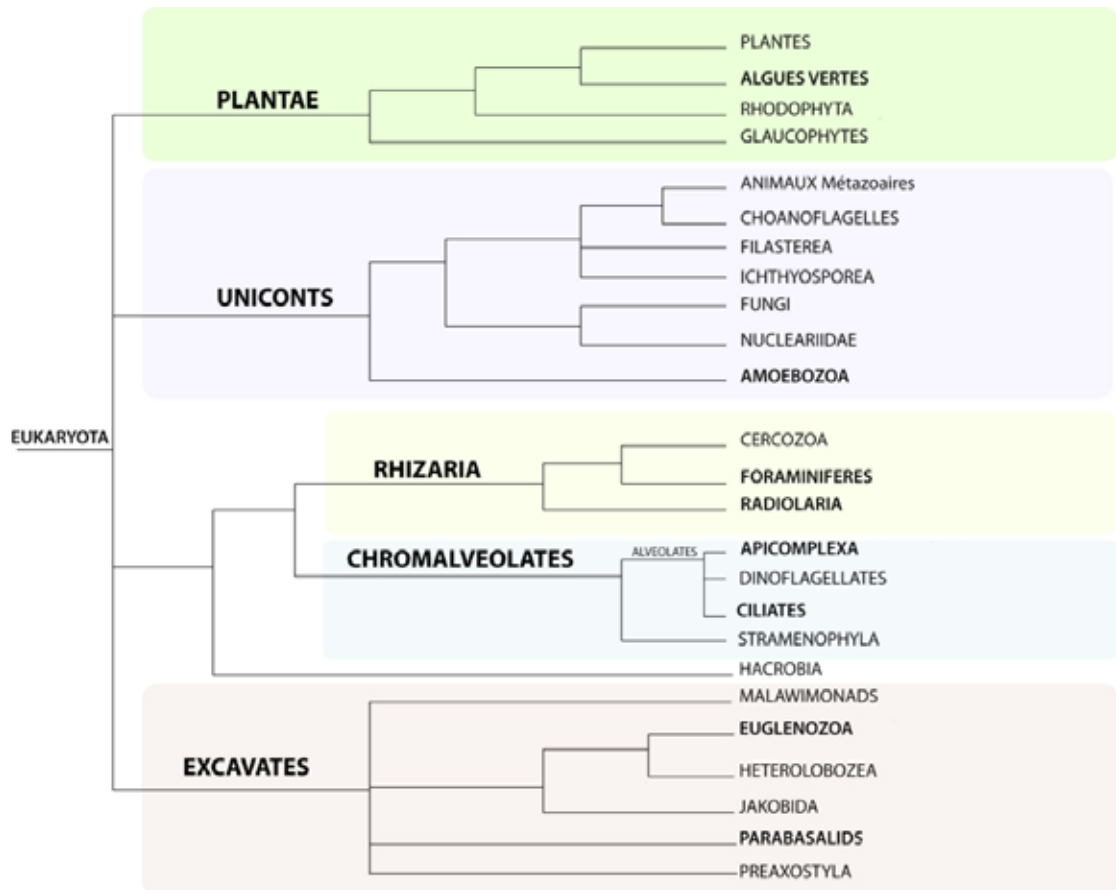
Parmi les animaux observables dans ces préparations, vous pourrez rencontrer un grand nombre de Paramécies de différentes tailles.

La Paramécie est un cilié dulçaquicole atteignant une taille relativement grande (250 μm). Des **cils** de longueur uniforme, sont disposés en rangées parallèles sur tout le corps. On les distingue aisément en périphérie.

La région moyenne du corps présente une dépression en entonnoir, le **péristome**. Au fond de celui-ci se trouve le cytostome ou bouche. Dans le **cytoplasme**, l'appareil nucléaire occupe une position centrale : il est constitué de deux types de noyaux, **macronucleus** (végétatif) et **micronucleus** (reproducteur). Ce dernier n'est pas toujours visible car c'est un granule dense logé dans une échancrure du macronucleus lui-même fort coloré. Deux **vacuoles pulsatiles**, discernables lorsqu'elles sont en diastole (gonflées), sont disposées l'une au-dessus de l'autre sur une des faces, au tiers supérieur et au tiers inférieur. En systole (contractées), on ne les distingue pas. Le cytoplasme peut également contenir diverses **vacuoles alimentaires**.

Schématisez les organismes unicellulaires que vous pouvez observer dans les préparations contenant les animaux vivants qui vous sont proposées. Notez leur mode de déplacement si vous l'observez.

8. Remplacez les individus que vous avez observés dans l'arbre phylogénétique suivant selon les connaissances acquises dans le cours théorique :



PARTIE 2 : Utilisation des caractères moléculaires pour établir les relations évolutives des Protistes.

Vous avez tenté de classer une série de Protistes (vivants, en coupe, ou sur base de photos de microscopie électronique) sur base de caractères phénotypiques, c'est à dire sur base de leur morphologie, de leur physiologie ou de leur comportement. Les systématiciens ont fait de même pendant plusieurs siècles, mais les résultats différaient énormément en fonction des caractères choisis. Les différentes solutions que vous avez obtenues reflètent cette difficulté de la même façon.

Aujourd'hui vous allez découvrir l'approche développée cette dernière décennie pour venir à bout du classement des Protistes. Cette méthode est la phylogénie moléculaire à laquelle allez être initié sur ordinateur.

EXERCICE 1

A quoi correspondent les différentes lignes du fichier « sequence Protistes.txt »?
Et les colonnes ?

EXERCICE 2

De quel gène, ou portion du génome, provient la séquence copiée dans ce fichier ? Pour répondre à cette question, utilisez l'application « Blast » développée par NCBI (National Centre for Biotechnology Information) aux USA et disponible gratuitement dans le monde : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PAGE=Proteins>. Résumez le principe de votre démarche ci-dessous.

EXERCICE 3

Qu'est-ce qu'un « caractère moléculaire » ? En quoi cela diffère-t-il d'un « caractère génotypique » ?

EXERCICE 4

Dans quel(s) cas l'utilisation de caractères moléculaires s'avère-t-elle appropriée ?

EXERCICE 5

Comment procède-t-on pour construire un arbre phylogénétique sur base de caractères phénotypiques ou génotypiques ?

EXERCICE 6

Quelles observations pouvez-vous tirer de l'arbre phylogénétique que vous avez produit ?
Les relations entre Protistes sont-elles proches de ce que vous aviez établi sur base des caractères phénotypiques ?