

Que savons-nous de l'histoire évolutive des Eucaryotes ?

2. De la diversification des protistes à la radiation des multicellulaires*

André Adoutte, Agnès Germot, Hervé Le Guyader, Hervé Philippe

Société Française de Génétique

Président

A. Nicolas

Président d'honneur

F. Jacob

Vice-présidents

R. Berger

H. Pinon

C. Stoll

Secrétaire général

M. Solignac

Trésorier

P.-M. Sinet

Prière d'adresser toute correspondance au Secrétariat général de la SFG, Michel Solignac, laboratoire de biologie et génétique évolutives, bâtiment 13, Cnrs, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

Comité de rédaction

A. Bernheim

M. Bolotin-Fukuhara

M. Fellous

J. Générumont

B. Michel

R. Motta

A. Nicolas

S. Sommer

P. Thuriaux

D. de Vienne

Secrétaire

M.-L. Prunier

Ainsi que nous l'avons souligné dans le premier article de cette série, la monophylie des Eucaryotes ne fait guère de doutes [1]. En dehors de l'enveloppe nucléaire proprement dite et de l'organisation de l'ADN en chromosomes, les Eucaryotes partagent un grand nombre de caractères qui signent leur origine commune : réticulum endoplasmique et ensemble de vésicules membranaires intracellulaires interreliées, cytosquelette et en particulier microtubules et microfilaments, division du matériel génétique par mitose ou méiose.

La phylogénie moléculaire est aussi en accord avec cette hypothèse de monophylie : même si l'arbre universel du vivant est difficile à enraciner, les Eucaryotes peuvent être regroupés aisément sur un seul de ses rameaux et il serait bien arbitraire de placer la racine de l'arbre en leur sein.

Nous nous attacherons, dans ce deuxième article, à faire le point sur l'histoire évolutive des Eucaryotes à la lumière des phylogénies moléculaires récentes, en articulant notre analyse autour de quatre questions centrales : quelles sont les lignées d'Eucaryotes les plus anciennes ? Que nous apporte leur étude sur la genèse de la cellule eucaryote ? Comment s'est effectuée leur diversification ? A quel moment sont apparus les grands groupes multicellulaires et quels sont les protistes qui en sont les plus proches ?

* La partie 1 de cet article a été publiée dans *m/s* n° 8, vol. 11, p. I-XIII, août 1995.

** Classe de plantes cryptogames à reproduction sexuée, intermédiaires entre les lichens et les mousses.

Un point de départ : la morphologie cellulaire

• **Les plantes terrestres supérieures, les animaux, les champignons.** C'est par des caractéristiques assez « macroscopiques » que les très grandes subdivisions ont été opérées parmi les Eucaryotes dès le XVIII^e siècle [2] puis affinées au XIX^e et au XX^e siècle, la plupart de ces subdivisions persistant jusqu'à nos jours. On a distingué très tôt les plantes terrestres supérieures des animaux, et on a rattaché aux plantes les mousses, les hépatiques** et les algues macroscopiques. Il semblait alors logique de regrouper les champignons supérieurs et les plantes avec lesquelles ils partagent l'absence de mobilité, l'apparence superficielle d'une nutrition par des « racines » et la possession de parois cellulaires (qui se révéleront plus tard être de composition différente de celle des plantes).

• **Les protistes, eucaryotes unicellulaires.** Ce regroupement dichotomique laissait sans affectation un immense ensemble d'organismes dont la diversité se confirmait tout au long du XIX^e et du XX^e siècle, celui des Eucaryotes unicellulaires. La définition de cet ensemble était essentiellement négative : il regroupait les organismes « bloqués » au stade unicellulaire ainsi que quelques groupes présentant des formes coloniales ou plasmodiales mais, en tout cas, ne présentant jamais de véritables tissus organisés. Dès l'origine, les frontières de cet

Tableau I

 LES 45 PHYLUMS DE PROTISTES DE CORLISS (1984)
 REGROUPÉS EN 18 « SUPERENSEMBLES »

Rhizopodes	Chromobiontes
Karyoblastea	Chrysochyta
Amoebozoa	Haptophyta
Acrasia	Bacillariophyta
Eumycetozoa	Xanthophyta
Plasmodiophorea	Eustigmatophyta
Granuloreticulosea	Phaeophyta
(incert. sed. : Xenophyophora)	(Incert. sed. : Proteromonadea
Mastigomycètes	Bicosoecida
Hyphochytridiomycota	Heterochloride
Oomycota	Raphidophyceae)
(Incert. sed. :	Actinopodes
Chytridiomycota)	Heliozoa
Chlorobiontes	Taxopoda
Chlorophyta	Acantharia
Prasinophyta	Polycystina
Conjugatophyta	Phaeodaria
Charophyta	Dinoflagellés
(Incert. sed. : Glaucophyta)	Peridinia
Euglenozoa	Syndinea
Euglenophyta	(Incert. sed. : Ebridea
Kinetoplastida	Ellobiophyceae
(Incert. sed. : Pseudociliata)	Acritarcha)
Rhodophytes	Ciliés
Rhodophyta	Ciliophora
Cryptomonadines	Sporozoaires
Cryptophyta	Sporozoa
Choanoflagellés	(Incert. sed. : Perkinsida)
Choanoflagellata	Microsporidies
Labyrinthomorphes	Microsporidia
Labyrinthulea	Haplosporidies
Thraustochytriacea	Haplosporidia
Polymastigotes	Myxosporidies
Metamonadea	Myxosporidia
Parabasalia	(Incert. sed. : Actinomyxidea
Paraflagellés	Martelliidea
Opalinata	Paramyxidea)

uns des autres avec certaines lignées néanmoins qui se prolongent dans un autre groupe. Autrement dit, les groupes sont constitués d'organismes n'ayant pas d'histoire évolutive commune (sauf pour les animaux), donc ne partageant pas de caractéristiques profondes.

On voit donc que si la synthèse de Whittaker clarifiait bon nombre de questions en accordant une plus grande importance aux Protistes, reconnus en tant que groupe, elle faisait naître de graves ambiguïtés en créant une classification non naturelle (c'est-à-dire non phylogénétique) et laissait ouvertes les deux questions évoquées plus haut, l'origine des Eucaryotes et l'origine des divers groupes de multicellulaires. On ne pouvait progresser que par une étude plus approfondie des protistes eux-mêmes. C'est ce qui a été réalisé à partir des années 60, avec, d'abord, l'accumulation de données descriptives ultrastructurales. Celles-ci ont permis de délimiter un nombre assez élevé de groupes de protistes au sein desquels les espèces présentent entre elles des similitudes fortes et spécifiques et semblent donc constituer des lignées monophylétiques.

La grande diversité morphologique des protistes

Plusieurs traités récents ont été consacrés à décrire tous les groupes de protistes dans leur grande diversité architecturale [6-8]. Indiquons seulement les deux principales étapes de délimitation des groupes qui correspondent, grossièrement, aux observations en microscopie optique puis en microscopie électronique.

La première classification des Protozoaires, qui remonte au XIX^e siècle [9], reconnaît 4 grandes classes : les « Sarcodines » (également appelés « Rhizopodes ») et organismes apparentés (Héliozoaires, Radiolaires); les « Mastigophores », porteurs de flagelles; les « Infusoires », correspondant aux Ciliés et les « Sporozoaires » correspondant, pour l'essentiel, à des parasites intracellulaires, à cycles complexes, généralement sans cils ni

ment eux-mêmes naissance à trois groupes distincts de multicellulaires, animaux, plantes, et champignons. Ainsi, les protistes occupent une position charnière, entre procaryotes et eucaryotes multicellulaires et une grande importance est accordée dans le schéma à cette ligne de démarcation entre Eucaryotes unicellulaires et multicellulaires. S'il en est bien ainsi, l'étude des protistes peut éclairer deux questions évolutives majeures : l'origine de la cellule Eucaryote et l'origine des grands groupes multicellulaires. C'est une des raisons

principales qui justifie l'intérêt qu'on leur porte.

• **Les incertitudes et les ambiguïtés.** Le schéma de Whittaker contient des incertitudes et des ambiguïtés dues au fait que l'auteur a choisi de ne pas former des groupes strictement monophylétiques mais plutôt de regrouper les êtres vivants en cinq grands « règnes », définis en fonction de caractéristiques écologiques ou de grades d'organisation. Les groupes sont représentés dans un empilement vertical, comme dérivant les

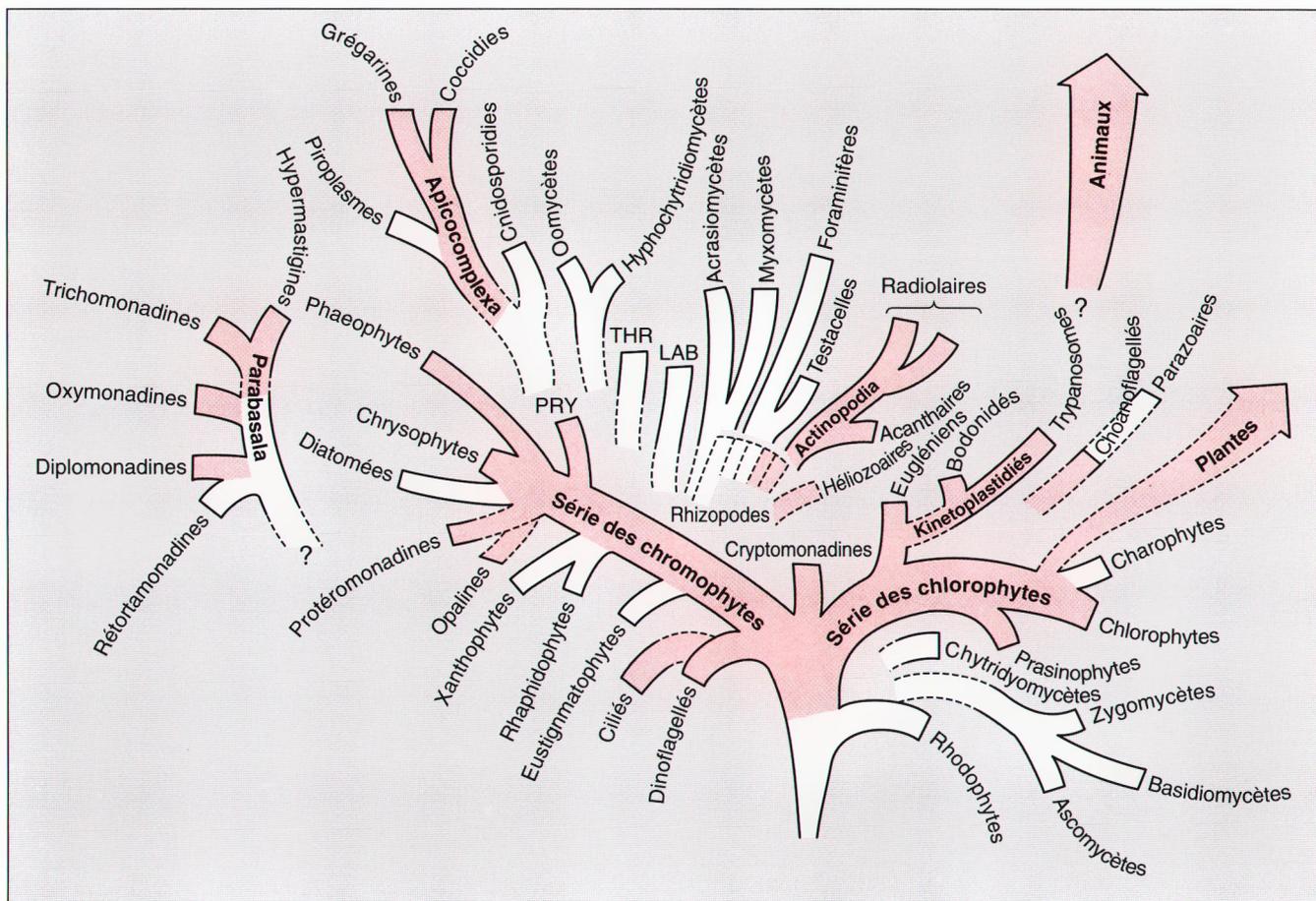


Figure 2. **L'ébauche de phylogénie de Taylor (1978)**. L'arbre est organisé autour de deux rameaux, la « série des Chromophytes », d'une part, et celle des « Chlorophytes », d'autre part. Tous les organismes à chlorophylle a + c sont rattachés à la première, tous ceux à chlorophylle a + b à la seconde (y compris les plantes). Les Rhodophytes sont placés comme le groupe le plus primitif, suivis de près par les Dinoflagellés, apparentés aux Ciliés. Les Champignons vrais (Zygomycètes, Basidiomycètes, et Ascomycètes), apparentés aux Chytridiomycètes, sont aussi placés très bas dans l'arbre. De très nombreux groupes de protistes ainsi que les Animaux ne sont fermement reliés à aucun rameau.

flagelles (Grégarines, Coccidies, Myxosporidies...). Si certaines de ces classes (Mastigophores) vont « éclater » en sous-ensembles très distants, d'autres persistent jusqu'à aujourd'hui en tant qu'ensembles monophylétiques (Ciliés).

Les apports de la microscopie électronique et la prise en compte des organismes photosynthétiques ont abouti, à la fin des années 70, à la reconnaissance d'un nombre beaucoup plus important de groupes de protistes [10-11]. Les critères qui sont utilisés pour différencier les groupes concernent, pour l'essentiel, l'architecture cellulaire et en tout premier lieu l'organisation du cytosquelette.

Si les différents « phylums » de protistes commencent alors à émerger avec clarté, les relations de parenté entre eux demeurent bien mystérieuses.

A titre d'exemple, on peut citer la proposition de Taylor (figure 2) de 1978 qui constitue une tentative courageuse pour concrétiser par un schéma les hypothèses phylogénétiques de l'époque [12]. En fait, seules deux lignées évolutives sont identifiées de manière solide, sous le nom de série des Chromophytes et série des Chlorophytes. La première correspond à l'ensemble des algues à chlorophylles a et c, et dont le chloroplaste est entouré d'une enveloppe

membranaire supplémentaire très particulière, le « chloroplast endoplasmic reticulum » (CER), ensemble de deux membranes généralement en continuité avec l'enveloppe nucléaire, possédant des ribosomes à sa surface la plus externe, cytosolique (figure 3). La seconde branche solide correspond aux algues vertes auxquelles les plantes vertes sont rattachées. Il s'agit du vaste ensemble d'organismes dont les chloroplastes contiennent des chlorophylles a et b et présentent, de plus, une organisation ultrastructurale similaire. C'est donc le type de pigmentation des plastes qui fournit la synapomorphie forte unissant les sous-groupes à cha-

cun des deux rameaux principaux. En dehors de ces deux branches, c'est l'incertitude qui règne !

Premières phylogénies moléculaires

Les phylogénies moléculaires vont apporter des compléments ou des réorganisations majeures de ces notions. Après les premières tentatives de reconstruction phylogénétique fondées sur l'ARN ribosomique 5S [13] dont le pouvoir résolutif est limité, la publication de 1986 de Sogin *et al.* [14], utilisant les 15 séquences complètes d'ARNr 18S d'Eucaryotes alors disponibles, marque les débuts de la phylogénie moléculaire des protistes, représentés par 9 espèces. L'arbre de distances obtenu, rapidement confirmé et élargi par des séquences partielles d'ARNr 28S obtenus par notre équipe en collaboration avec celles de J.-P. Bachellerie et de G. Brugerolle [15], révélait une série de points : (1) si l'on enracine l'arbre en utilisant des procaryotes comme groupe extérieur, on observe que les protistes émergent avant les Métazoaires, les Métaphytes et les Champignons, ces trois derniers groupes occupant une position terminale au sein de la branche eucaryote. En dépit du faible nombre d'espèces représentées, la topologie de cet arbre semble confirmer la vieille intuition postulant que les protistes ont précédé les multicellulaires ; (2) la diversité moléculaire au sein des protistes excède celle observée au sein de l'ensemble Métazoaires-Métaphytes ; loin de constituer un petit ensemble « fourre-tout », peu diversifié, les protistes sont séparés les uns des autres par de très grandes distances moléculaires et leur diversification semble s'être étalée sur une période plus longue que celle des multicellulaires ; (3) les protistes qui émergent le plus bas dans l'arbre des Eucaryotes sont un Trypanosome et une Euglène, organismes flagellés.

Cependant, d'autres protistes vont se disputer le titre de « lignée la plus ancienne des Eucaryotes » : Vossbrinck *et al.* vont d'abord observer que la séquence d'une Microsporidie, *Vairimorpha necatrix*, place ces organismes tout à la base de l'arbre des

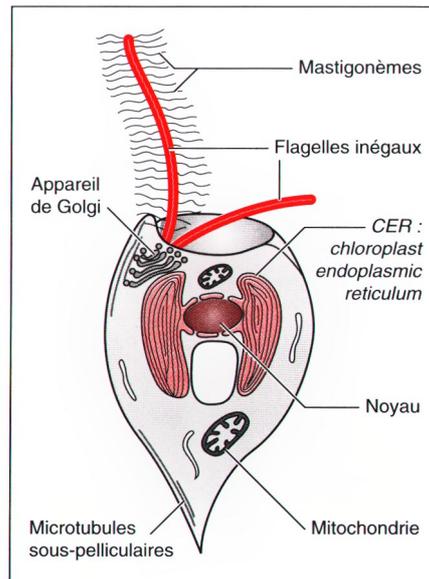


Figure 3. **Schéma de l'organisation d'une Chrysophyte.** Noter l'existence d'une enveloppe membranaire autour du chloroplaste, en continuité avec l'enveloppe nucléaire (= CER) et les appendices sur l'un des flagelles (hétérokonte). Ce schéma, comme la plupart des suivants est redessiné d'après la référence [6]. La barre d'échelle correspond à 2 μm pour cette figure et pour les suivantes à l'exception de la figure 5A.

Eucaryotes, bien avant tous les autres protistes alors séquencés [16]. Ils font une observation supplémentaire de grande portée : l'ARNr 5,8S qui, chez tous les Eucaryotes, est codé par un segment d'ADN distinct, situé entre le gène de l'ARNr 18S et celui de l'ARNr 28S, est fusionné à l'extrémité 5' de l'ARNr 28S chez les Microsporidies comme chez les Procaryotes [17]. On avait donc là un caractère totalement distinct de la séquence primaire confirmant la proximité des Microsporidies et des Procaryotes.

Peu après, Sogin *et al.* obtiennent la première séquence d'une Diplomonadine, *Giardia lamblia*, et suggèrent que c'est plutôt cette espèce qui occupe la position la plus inférieure dans l'arbre des Eucaryotes [18]. Ils notent également quelques caractéristiques dans la séquence de l'ARNr qui l'apparentent à des séquences procaryotiques. Ces deux groupes de

protistes, Microsporidies et Diplomonadines, partagent un caractère supplémentaire : tous deux sont dépourvus de mitochondries. L'émergence de ces deux groupes amitochondriaux à la base de l'arbre des Eucaryotes semblait apporter une confirmation éclatante à l'hypothèse de Cavalier-Smith [19] qui avait proposé, quelques années auparavant, la position « basale » d'une série de protistes sans mitochondries, forgeant pour eux le terme d'*Archaezoa* et imaginant donc que la symbiose mitochondriale se serait effectuée non chez les tout premiers Eucaryotes mais dans une seconde étape de leur histoire. Dans son esprit, ces deux groupes étaient effectivement parmi les plus primitifs mais il pensait que plus précoce encore était un groupe d'Amibes, également dépourvues de mitochondries, à organisation cellulaire très simple, telles que *Pelomyxa*, qu'il dénomma Archéamibes [20], et pour lesquelles aucune séquence n'était encore disponible.

A ce schéma général, nous apportons plusieurs précisions en poursuivant l'utilisation d'une portion relativement courte mais très utile de l'ARNr 28S [21] : (1) tant dans l'arbre d'ARNr 18S que dans celui d'ARNr 28S, les Ciliés émergent tardivement, entourés de groupes à code génétique universel. Nous avons donc pu conclure que le code génétique très original des Ciliés découvert peu avant [22], avec deux des trois codons Stop du code universel codant pour la glutamine, constituait un code dérivé et non, comme certains l'avait suggéré, une relique d'un code primitif. Le même raisonnement a été appliqué aux caractéristiques nucléaires des Dinoflagellés qui, sur la base des premières séquences de ces organismes obtenues à Banyuls [23], émergeaient également dans le haut de l'arbre, près des Ciliés ; (2) nous ajoutons un Myxomycète, *Physarum*, aux groupes de « la base de l'arbre » et notions que la quasi-totalité des lignées « précoces » étaient flagellées ce qui suggérerait que le flagelle eucaryote avec son organisation microtubulaire typique à symétrie 9 constituait une invention évolutive très

ancienne. Nous observons également qu'une Trichomonadine, *Trichomonas vaginalis*, émergeait assez bas dans l'arbre, ce que Sogin allait préciser peu après [24] en la plaçant parmi les trois groupes les plus précoces des Eucaryotes. (3) Enfin, en échantillonnant systématiquement parmi les protistes photosynthétiques, nous montrions [25] que tous avaient une origine tardive, peut-être polyphylétique, mais surtout que les algues rouges n'émergeaient pas à la base de l'arbre des Eucaryotes. La symbiose chloroplastique semblait donc s'être produite bien après la symbiose mitochondriale.

Ainsi les données moléculaires des ARNr ont considérablement modifié la phylogénie des Eucaryotes : les premiers groupes à émerger semblaient être des taxons d'Eucaryotes assez « marginaux », dépourvus de mitochondries et certainement pas photosynthétiques ; tous les multicellulaires se retrouvaient, à l'opposé, dans une position terminale de l'arbre, y occupant une place relativement restreinte ; entre ces deux zones, un assez grand nombre de phylums de protistes dont les affinités étaient difficiles à définir par des critères morphologiques se trouvaient désormais rattachés. Une structuration de l'arbre d'ensemble des Eucaryotes en trois zones semblait donc se dégager (figure 4).

La vision globale actuelle, déduite des ARN ribosomiques

Aujourd'hui, la base de données d'ARNr 18S compte plus de 3 000 séquences complètes dont 700 environ appartiennent aux Eucaryotes. Des représentants de nombreux « phylums » de protistes ont été séquencés ce qui permet de présenter des arbres beaucoup plus denses et d'examiner la solidité du découpage en trois zones. Une série d'arbres phylogénétiques généraux des Eucaryotes, basés sur des séquences complètes d'ARNr 18S, a été publiée [26-29].

En 1993, les distorsions possibles résultant de forts biais en GC chez certaines espèces ont été soulignées [30,

31]. Le débat portait sur l'identification de celui des trois groupes de protistes qui occupe la position la plus primitive. L'émergence très précoce des Diplomonadines (*Giardia*) observée par Sogin *et al.* [18] était contestée en raison de la composition en GC très particulière de cette espèce et une première étude de l'effet de changement du groupe externe sur la topologie de la base de l'arbre semblait confirmer cette hypothèse [31]. L'un de nous a repris cette question avec une base de données élargie et des méthodes de ré-échantillonnage systématique des taxons [32]. L'étude du niveau de sa-

turation des transitions par rapport aux transversions (voir notre premier article [1]) a montré que seules les transversions conviennent à de telles échelles évolutives et qu'en les utilisant, on s'affranchit du biais introduit par les différences de taux de GC. Les Microsporidies paraissent alors constituer, de manière robuste, le taxon d'émergence la plus précoce. Le résultat est important car il identifie le groupe qui pourrait nous donner une idée de l'organisation des premiers Eucaryotes.

La figure 4 fournit un exemple de l'état actuel de l'arbre global des Eucaryotes.

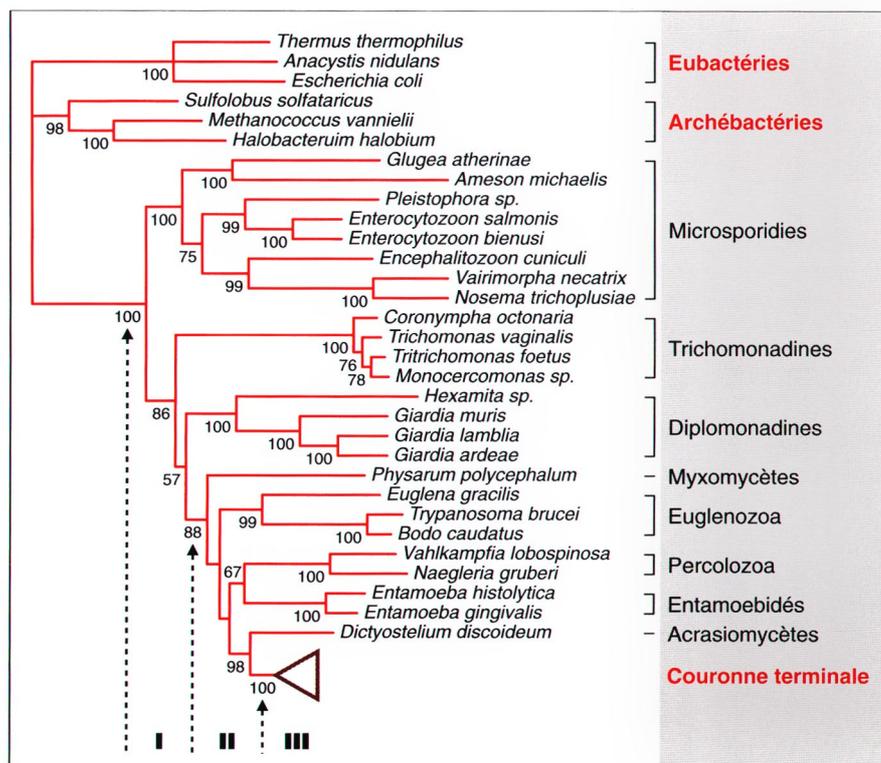


Figure 4. **Arbre phylogénétique général des Eucaryotes découpé en trois zones.** L'arbre a été construit par une méthode de distance (neighbor-joining, voir [1]) en utilisant uniquement les transversions observées dans l'ARNr 18S. Un ensemble d'Eubactéries et d'Archéobactéries a été utilisé comme groupe extérieur des Eucaryotes. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50 % sont figurées sur les branches correspondantes. Trois zones : zone I « base de l'arbre », zone II « médiane » et zone III « couronne terminale » ont été indiquées. La monophylie de chacun des groupes figurés dans l'arbre est très fortement soutenue, de même que la majorité des ordres de branchement, à l'exception de celui qui concerne l'ordre d'émergence relatif des Trichomonadines par rapport aux Diplomonadines. De même, l'ordre d'émergence des groupes au sein de la zone II est mal défini. La « couronne terminale » contient un très vaste échantillon de groupes repris de manière plus détaillée dans la figure 6.

La première zone, qui correspond à la base de l'arbre, regroupe, comme nous l'avons déjà signalé, trois taxons d'organismes unicellulaires, les Microsporidies, les Trichomonadines et les Diplomonadines. Ces organismes, parasites dans leur très grande majorité, présentent une structure de cellule eucaryote assez simple – si l'on excepte certaines adaptations secondaires liées à la vie parasitaire – (figure 5A, B, C). Cela est particulièrement vrai des Microsporidies, qui sont toutes des parasites intracellulaires obligatoires. Les Diplomonadines et les Trichomonadines présentent quant à elles un système flagellaire ainsi que des fibres associées aux ciliotésomes, ce qui constitue une différenciation importante de leur cytosquelette, comparé à celui des Microsporidies. Ces trois taxons sont dépourvus de mitochondries, de péroxysomes et vivent dans des conditions proches de l'anaérobiose.

La deuxième zone comprend un ensemble de groupes émergeant suivant un ordre mal résolu. Ceux-ci correspondent à des organismes unicellulaires présentant des structures très variées (avec ou sans mitochon-

dries, flagelles, appareil de Golgi, etc.). Deux grands types d'organisation cellulaire sont rencontrés dans cette zone, flagellé ou amiboïde (avec, chez certains groupes, une alternance des deux types au cours du cycle de vie). Deux espèces au moins de cette zone, *Physarum polycephalum* et *Dictyostelium discoideum*, présentent des phases plasmodiales ou forment des agrégats au cours de leur cycle.

Enfin, la troisième zone correspond à ce que l'on appelle en termes imagés la « couronne terminale ». On y trouve des organismes unicellulaires, mais aussi les Champignons, les plantes terrestres, ou les animaux *stricto sensu*, c'est-à-dire les Métazoaires.

Bien que la vision d'une évolution par complexité croissante soit entachée de téléologie [33], on peut positionner dans l'arbre l'apparition de différents caractères typiques de la cellule eucaryote comme par exemple l'acquisition des organites. Cavalier-Smith [28] et Patterson [11] ont produit des scénarios concernant la base de l'arbre des Eucaryotes, dans lesquels on part d'un ancêtre nucléé à chromosomes subissant la mitose et la méiose, qui

acquiert un flagelle, puis des dictyosomes et enfin des mitochondries. L'étude d'un tel arbre apporte donc beaucoup d'informations sur les grandes étapes évolutives des Eucaryotes. Néanmoins, des difficultés d'interprétation existent. Elles ont pour origine soit des réversions, soit des spécialisations extrêmes qui compliquent l'interprétation des étapes d'évolution morphologique, soit enfin l'existence d'incertitudes sur la topologie même des branchements.

Les radiations évolutives: un phénomène récurrent

Quelle signification donner à l'absence de résolution entre certaines lignées que l'on trouve à divers endroits de l'arbre? Pendant longtemps, on a interprété ce fait comme un échec des phylogénies moléculaires, dû à l'utilisation de séquences trop courtes, à une faiblesse des algorithmes de reconstruction, ou à un manque de pertinence des informations contenues dans les séquences de macromolécules. Plus récemment, nous nous sommes demandés si cette

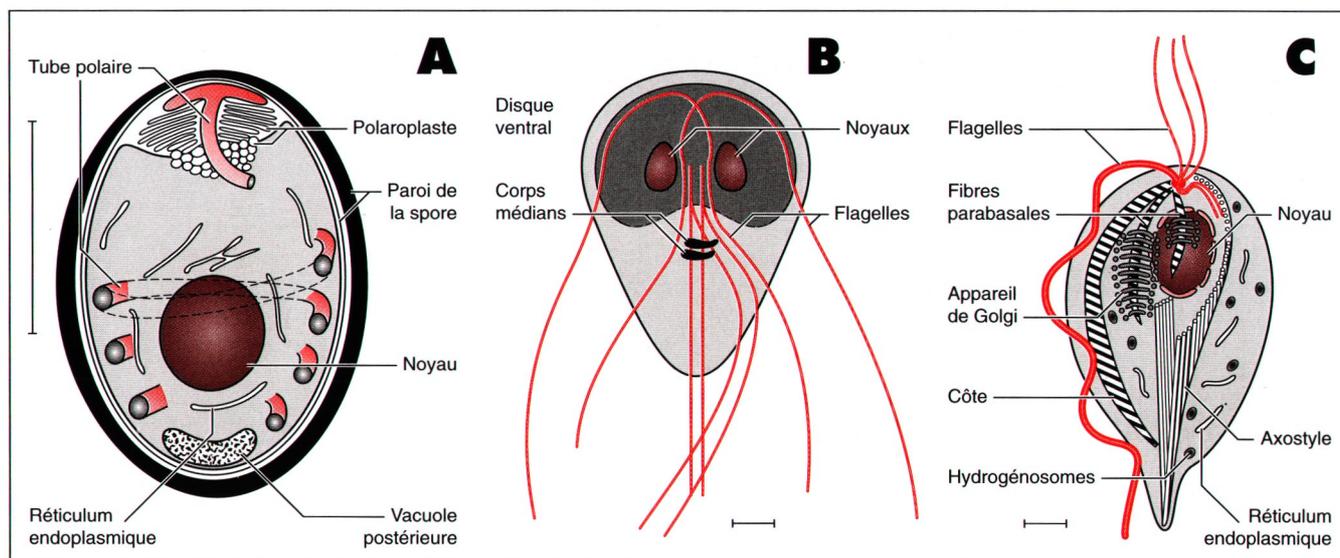


Figure 5. **Les protistes du « bas de l'arbre ».** Un représentant de chacun des trois groupes émergeant à la base de l'arbre des Eucaryotes a été figuré. **A. Schéma d'une spore de Microsporidie.** Le tube polaire enroulé à l'intérieur de la spore se dévagine lors de l'infection de la cellule hôte (barre = 1 μ m). **B. Schéma de Giardia, une Diplomonadine.** La cellule ne possède pas de mitochondries. Son disque ventral lui permet de se fixer sur l'épithélium intestinal de l'hôte. **C. Schéma de Tritrichomonas, une Trichomonadine.** Un appareil de Golgi est associé aux fibres parabasales et le cytoplasme contient des organites particuliers, les hydrogénosomes.

absence de résolution ne traduisait pas un véritable processus évolutif, plus précisément l'existence de radiations rapides.

En effet, dans plusieurs cas, les problèmes de résolution se posent pour des groupes que les paléontologues avaient déjà longuement étudiés, et qui présentent un phénomène d'explosion au niveau de leurs enregistrements fossiles. Avant une date précise, ces organismes ne sont jamais retrouvés fossilisés ; ils apparaissent ensuite avec un haut degré de diversification morphologique, et cela de manière brutale, du moins à l'échelle des temps géologiques. Un tel phénomène, appelé « radiation évolutive », correspondrait à l'apparition quasi simultanée, à l'intérieur d'un taxon, de différentes lignées. Après de telles radiations, des changements morphologiques importants peuvent survenir ; ils caractérisent bien les différents phylums, mais ne peuvent aider à préciser leur ordre d'émergences.

L'absence de résolution des phylogénies moléculaires pourrait donc être vue de manière positive, et correspondre à de telles radiations. Nous avons montré (voir *figure 4* de [1]) que plus les cladogénèses sont proches, plus le nombre de nucléotides à séquencer pour obtenir une topologie robuste croît, et ceci de manière hyperbolique. Si la quantité de séquences utilisées est suffisante, il y a coïncidence entre absence de résolution et radiations décelées par les paléontologues.

L'une des plus célèbres radiations correspond aux fossiles cambriens des schistes de Burgess (Canada). Il semble que, il y a environ 540 millions d'années, les grands groupes de Métazoaires triploblastiques (c'est-à-dire les animaux possédant trois feuillettes embryonnaires, l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme) soient apparus en moins de 20 millions d'années [33-35]. Or, pour la période cambrienne, et en utilisant l'ARNr 18S, la limite de résolution actuelle des phylogénies moléculaires est de l'ordre de 40 millions d'années [36]. On peut simplement dire que les analyses moléculaire et paléontologique ne se contredisent pas, et que l'hypothèse

d'une radiation sur 20 millions d'années semble donc plausible. A cela, plusieurs causes sont avancées. Par exemple, l'apparition du complexe de gènes homéotiques a vraisemblablement contribué à la diversification des plans d'organisation des Métazoaires cœlomates, à l'époque précédant la date du gisement de Burgess, il y a 540 millions d'années. On comprend qu'une acquisition décisive comme celle du complexe de gènes homéotiques soit suivie d'un brusque accroissement de la diversité biologique, et on peut alors la considérer comme une « *key evolutionary innovation* » [37, 38]. Mais un changement de l'environnement peut aussi avoir permis une meilleure exploitation de l'espace ou avoir facilité la multicellularité. On avance [39] qu'une augmentation de la teneur en oxygène de l'atmosphère terrestre serait concomitante de la radiation cambrienne. Cela expliquerait le temps long qui sépare l'apparition des Eucaryotes de la diversification des Métazoaires. On peut enfin avancer l'hypothèse que ces premiers Métazoaires complexes peuvent se diversifier sans compétition, simplement en occupant des niches écologiques qui sont alors vides.

On retrouve des radiations évolutives à tous les niveaux hiérarchiques : les Gnathostomes (Vertébrés à mâchoires) au Dévonien, les Rongeurs et les Passereaux au Miocène. Souvent, les radiations suivent une période d'extinction massive, comme par exemple à la limite Crétacé-Tertiaire. En effet, il y a 65 millions d'années, la radiation des principaux ordres de Mammifères et d'Oiseaux est bien connue, ainsi que la diversification extraordinaire des plantes à fleurs, qui coïncide avec celle de certains ordres d'insectes (Lépidoptères et Hyménoptères, en particulier).

De manière générale, il semble que le rythme de l'évolution, vu par les phylogénies moléculaires, corresponde à celui postulé par les paléontologues. L'évolution, au moins pour une part, ne paraît pas s'être seulement produite de manière graduelle, comme Darwin l'avait postulé, mais aussi par des à-coups corres-

pondant à des « bouffées radiatives ». Cela n'est pas sans rappeler le schéma des « équilibres ponctués » d'Eldredge et Gould [40] même si ceux-ci faisaient intervenir le processus à un niveau taxonomique inférieur, celui de la spéciation, et non à celui de l'apparition des grands groupes.

Les phylogénies moléculaires ont mis en évidence une grande radiation, correspondant à la zone 3, au cours de laquelle tous les phylums importants (tant en terme de nombre d'espèces que de biomasse), comme les Champignons, les Chlorobiontes ou les Métazoaires, sont apparus. Pour la couronne terminale, certains auteurs avancent que la symbiose chloroplastique ait pu entraîner l'apparition de potentialités exceptionnelles [39].

En dépit de ces épisodes mal résolus, les phylogénies moléculaires permettent de distinguer quelques grandes phases distinctes dans l'histoire des Eucaryotes. Nous allons y revenir en détail.

La base de l'arbre des Eucaryotes : des cellules primitivement sans mitochondries ?

• **Les trois taxons à la base de l'arbre.** Nous avons vu que trois taxons relativement différents au point de vue cellulaire se partagent la base de l'arbre. Il s'agit des Microsporidies, des Métamonadines (uniquement représentées dans l'arbre par des espèces de Diplomonadines) et des *Parabasala* (représentées par les Trichomonadines).

Les Microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires qui infectent un large spectre d'hôtes, allant des Protozoaires aux Vertébrés. Surtout connues pour les dégâts qu'elles occasionnent aux élevages piscicoles et séricicoles, elles le sont désormais comme parasites opportunistes dans le cas du SIDA. Leur dissémination se fait par des spores qui présentent un système de pénétration et de transmission particulier (*figure 5A*). Les Microsporidies ne possèdent ni mitochondries, ni appareil flagellaire, ni appareil de Golgi

structuré [41]. On observe un réticulum endoplasmique, et des microtubules sont identifiables au moment de la mitose (dite fermée, car il n'y a pas disparition de l'enveloppe nucléaire, et le fuseau est intranucléaire). A ces différentes caractéristiques d'organisation cellulaire, il faut ajouter que l'analyse d'une espèce de Microsporidie révèle la présence du plus petit génome eucaryote actuellement connu [42].

La position « basale » de ce groupe suggère que toutes ces caractéristiques d'organisation cellulaire « simple » pourraient être primitives. Mais il faut demeurer prudent; toutes les espèces connues du groupe étant parasites, il est difficile de rejeter l'hypothèse de simplifications secondaires. Il est intéressant de noter que les Microsporidies semblent passer par un stade méiotique avec réduction chromatique au tout début de la sporulation [43] ce qui signifierait que la méiose est une acquisition extrêmement ancienne des Eucaryotes.

Les Diplomonadines sont regroupées dans le phylum des Métamonadines avec les Rétortamonadines et les Oxymonadines. Les organismes de ces trois taxons, dépourvus également de mitochondries, de péroxisomes et d'appareil de Golgi, présentent des systèmes cytosquelettique et flagellaire élaborés [44]. Les Diplomonadines – de loin les mieux connues et pour lesquelles nous disposons de données moléculaires – comprennent des espèces vivant soit à l'état libre, dans les eaux douces chargées de matière organique, soit comme parasites du tube digestif de certains animaux (Sangsues, Vertébrés). Un organisme pathogène comme *Giardia* présente une structure élaborée, le disque ventral, permettant l'attachement de la cellule à l'épithélium du tube digestif de l'hôte (*figure 5B*).

Les Trichomonadines (*Parabasala*) sont aussi des organismes flagellés [44] qui, pour la majorité d'entre eux, sont des symbiontes ou des parasites du tube digestif d'invertébrés ainsi que du tube digestif et du tractus urogénital des Vertébrés. L'appareil parabasal qui les caractérise est une structure cytosquelettique associée à un appareil de Gol-

gi (*figure 5C*). Les Trichomonadines n'ont ni péroxisomes ni mitochondries, mais possèdent dans leur cytoplasme des organites sphériques ou en bâtonnet entourés d'une double membrane, appelés hydrogénosomes [45, 46]. Ceux-ci, apparemment dépourvus d'ADN, contiennent des enzymes permettant la décarboxylation oxydative du pyruvate ou du malate en acétate. Les électrons libérés réduisent des protons grâce à une enzyme spécifique de ces organites, l'hydrogénase, et l'hydrogène moléculaire ainsi formé est libéré. Les hydrogénosomes permettent comme les mitochondries la phosphorylation de l'ADP en ATP.

Ces trois taxons possèdent plusieurs caractéristiques procaryotiques, en accord avec leur position phylogénétique. Par exemple, leurs ribosomes sont plutôt de type 70S (comme ceux de tous les Procaryotes) à la différence de ceux des Eucaryotes qui sont de type 80S [47-49]. De plus, l'organisation des gènes codant pour des protéines, quand ils ont été étudiés, s'apparente à celle des Procaryotes plus qu'à celle des Eucaryotes: jusqu'ici, aucun intron n'y a été découvert, les séquences en 5' et en 3' sont courtes, les séquences non codantes semblent très réduites [50].

Nous avons vu que les trois taxons de la base de l'arbre des Eucaryotes présentent des similitudes mais aussi des originalités du point de vue de leur organisation cellulaire, et il est évidemment tentant de les considérer comme des reliques de stades particuliers correspondant à la construction de la cellule eucaryote. On peut néanmoins s'interroger sur une telle vision des choses. Peut-on, en particulier, affirmer que ces groupes sont primitivement sans mitochondries et que penser de la nature des hydrogénosomes?

• L'acquisition des mitochondries.

Pour savoir à quel moment a eu lieu l'endosymbiose d'origine bactérienne qui a donné naissance aux mitochondries et si ces trois groupes en sont primitivement dépourvus, on pourrait tenter de mettre en évidence des « marqueurs d'endosymbiose »

[51]. Il est en effet démontré qu'après la symbiose mitochondriale, il y a eu exportation de gènes du génome de l'organite vers le génome nucléaire. On pourrait alors s'attendre à rencontrer des cas où des gènes à caractéristique mitochondriale sont trouvés dans le génome nucléaire, malgré l'absence de mitochondries dans le cytoplasme. Ce serait l'indice exemplaire d'une perte secondaire du symbionte.

Recherche dans le génome nucléaire de gènes mitochondriaux. Cette approche a été appliquée au cas d'*Entamoeba*, qui émerge tardivement dans tous les arbres phylogénétiques, bien après des protistes pourvus de mitochondries. Une telle position suggérerait donc fortement une perte secondaire de mitochondrie. La conclusion [52] a été très claire: deux gènes de type mitochondrial, la chaperonine cpn60 et la pyrimidine nucléotide transhydrogénase, y ont été trouvés, indiquant sans ambiguïté que cette lignée avait secondairement perdu ses mitochondries.

Parmi les marqueurs utilisables figurent les gènes de protéines de choc thermique (*heat shock protein*), en particulier celles du groupe HSP70 qui sont très conservées dans l'ensemble du vivant. Elles sont présentes chez les Eucaryotes dans le cytosol, dans le réticulum et dans les organites (mitochondries et chloroplastes). Ces deux dernières catégories ont leur origine dans des gènes du symbionte bactérien transférés au noyau. Leur mise en évidence, chez un organisme sans mitochondries, serait un indice qu'une symbiose bactérienne s'est néanmoins produite dans l'histoire de la lignée. Des recherches de ce type ont déjà été conduites chez les Diplomonadines: deux gènes correspondant à une HSP70 cytoplasmique et une HSP70 réticulaire ont été séquencés chez *Giardia lamblia* [53] mais aucune séquence susceptible d'être le marqueur d'une éventuelle endosymbiose n'a été retrouvée. Par contre, il existe des protéines reconnues par un anticorps spécifique des chaperonines cpn60, ce qui suggérerait l'existence d'une telle symbiose [54]. Nous avons recherché chez les Trichomonadines les gènes d'HSP70

et avons trouvé que des HSP70 de type eubactérien (qui s'apparentent plutôt à celles des mitochondries) existent dans le génome nucléaire de *Trichomonas vaginalis* (AG, non publié). Il semble donc que les Trichomonadines aient connu le passage d'un symbiote bactérien. Mais s'agissait-il d'une symbiose mitochondriale? Le tout est de savoir si les hydrogénosomes sont ou non des mitochondries modifiées.

Place des hydrogénosomes: ces organites possèdent en effet beaucoup de points communs avec les mitochondries (rôle, enzymes, structure) même s'ils ne réalisent pas la fonction la plus importante de celles-ci, la phosphorylation oxydative. Des organismes avec hydrogénosomes se rencontrent régulièrement dans l'arbre des Eucaryotes: dans la première zone, avec les Trichomonadines, mais aussi dans la troisième zone, avec certains Ciliés et certains Champignons secondairement adaptés à l'anaérobiose. Il est donc tout à fait clair que des organismes initialement aérobies à mitochondries peuvent dériver vers l'anaérobiose et acquérir des hydrogénosomes. De plus, dans le cas des Ciliés, il vient d'être démontré que cette transformation s'était produite plusieurs fois de manière indépendante [55]. Ceux-ci dérivent-ils des mitochondries ou correspondent-ils à autant de symbioses indépendantes? La première hypothèse est évidemment plus parcimonieuse mais la facilité avec laquelle des symbioses bactériennes s'installent et deviennent obligatoires chez les protistes ne permet pas d'exclure la seconde. L'analyse comparée de séquences d'enzymes d'hydrogénosomes pourrait permettre de trancher. Malheureusement, les résultats de ces analyses sont encore incertains [56].

• **Les Microsporidies semblent occuper seules la base de l'arbre.** En résumé, un groupe de protistes apparaît solidement positionné au bas de l'arbre, celui des Microsporidies, et ce groupe est dépourvu de mitochondries. On ne sait pas encore s'il est également dépourvu de marqueurs de symbiose mais, en l'état, on peut admettre qu'il est bien primitivement

amitochondrial. Dans le cas des Diplomonadines, la situation reste ouverte, puisque, pour l'instant, seules des preuves immunologiques sont disponibles. Enfin, pour les Trichomonadines, les séquences d'HSP70 de type procaryotique que nous venons de découvrir suggèrent que leurs hydrogénosomes seraient des mitochondries modifiées et de toute façon indiquent clairement que ce groupe a connu une symbiose eubactérienne. On voit donc que l'étude plus approfondie de ces protistes du bas de l'arbre amène à nuancer la conclusion selon laquelle ils étaient tous primitivement amitochondriaux. On peut néanmoins se demander s'il n'y a eu qu'une seule symbiose mitochondriale dans toute l'histoire des eucaryotes. L'idée largement admise était que la symbiose mitochondriale avait été unique [57]. Les résultats de Gray *et al.* [58] suggérant une biphylie des mitochondries ont donc causé une grande surprise. En reconstruisant des phylogénies à partir de l'ARNr mitochondrial, ces auteurs arrivaient à la conclusion qu'une deuxième symbiose s'était produite dans le segment menant des algues vertes aux Métaphytes. On s'est aperçu depuis que ce résultat est dû très vraisemblablement à des différences extrêmes de vitesses d'évolution des séquences mitochondriales dans l'échantillon étudié. Cela aurait conduit au phénomène «d'attraction des longues branches» que nous avons évoqué dans le premier article. L'hypothèse la plus couramment admise actuellement est donc celle de la monophylie des mitochondries [59].

Une zone intermédiaire dans l'arbre des Eucaryotes

Dans la zone intermédiaire de l'arbre des Eucaryotes, les organismes, dans leur majorité, sont unicellulaires, et à mitochondries. On y trouve, par exemple, le phylum bien individualisé des Euglenozoa [60], ou le groupe polyphylétique des Rhizopodes, qui regroupait des organismes à forme amiboïde se déplaçant par pseudopodes et se nourrissant par phagocytose [61-63]. On y remarque égale-

ment quelques cas de tendance vers la pluricellularité, avec les représentants de l'ancien groupe des Myxomycètes, qui a maintenant complètement éclaté. En effet, malgré des similitudes de cycle, *Physarum* et *Dicystostelium* semblent phylogénétiquement très éloignés.

Enfin, on peut remarquer que les groupes du bas de l'arbre des eucaryotes qui sont dépourvus de mitochondries, ne possèdent pas non plus d'introns. En effet, les données sur la structure des gènes des trois groupes, Microsporidies, Trichomonadines et Diplomonadines, commencent à s'accumuler et, pour l'instant, sur un total d'une cinquantaine de gènes, aucun intron n'a été trouvé. Par contre, des introns à splicéosomes sont détectés chez les groupes, tous à mitochondries, situés plus haut dans l'arbre. Ces résultats permettent de conforter l'hypothèse d'une origine tardive des introns, qui auraient été amenés chez les Eucaryotes lors de la symbiose mitochondriale [64-70].

La «couronne terminale» des Eucaryotes

Cette «couronne» apparaît comme groupe-frère de *Dicystostelium*. Elle nous intéresse particulièrement, car, contenant la totalité des animaux, des végétaux et des champignons, elle correspond en fait à l'essentiel de la biodiversité, telle qu'on l'entend habituellement.

La caractéristique la plus frappante de ce vaste ensemble (figure 6) est qu'on y reconnaît aisément un grand nombre de sous-ensembles monophylétiques, algues rouges, algues vertes et plantes, algues brunes et dorées, champignons, métazoaires, mais que l'ordre d'émergence des différents groupes est indéfinissable: tous prennent racine dans une grande radiation non résolue. De plus, divers groupes d'unicellulaires émergent aussi dans cette radiation, Ciliés, Dinoflagellés, Sporozoaires, Amibes *stricto sensu*. La «couronne terminale» n'est donc pas définie uniquement par la multicellularité. Ces dernières années, de nombreux efforts ont été réalisés pour tenter d'amélio-

rer la résolution au sein de cet ensemble et on a effectivement vu émerger quelques sous-ensembles solides, dont certains étaient imprévus, comme celui des Alvéolobiontes, qui rassemble les Ciliés, les Dinoflagellés et les Sporozoaires. En effet, la seule synapomorphie claire au niveau cellulaire entre ces trois groupes est la possession de compartiments membranaires situés sous la membrane plasmique, connus sous le nom d'alvéoles corticales, et constituant un compartiment de stockage du calcium [71-74].

• Combien de symbioses chloroplastiques à l'origine des groupes photosynthétiques ?

C'est au sein de cette couronne que l'on trouve presque tous les grands groupes photosynthétiques. C'est donc ici que l'on va pouvoir aborder la question du moment et du nombre des symbioses qui ont conduit aux chloroplastes. Parmi les organismes photosynthétiques, on distingue plusieurs sous-groupes monophylétiques.

Les Straménopiles, dénomination nouvelle [75], englobent toutes les algues à chlorophylles a et c (Chromophytes à l'exception des Dinoflagellés c'est-à-dire algues jaunes, dorées mais aussi brunes, telles que les Diatomées, les Chrysophytes, les Synurophytes, les Xanthophytes, les Phaeophytes, etc.) ainsi que des groupes non photosynthétiques tels que les Oomycètes et les Hyphochytridiomycètes qui possèdent au moins à un stade de leur cycle les flagelles hétérokontes (figure 3).

Les algues vertes comme les algues rouges forment chacune également des groupes monophylétiques, les algues vertes étant de plus sans ambiguïté le groupe-frère des Métaphytes. La question se pose donc immédiatement de savoir si les trois grandes lignées photosynthétiques, Rhodophytes, Chlorophytes et Chromophytes, se regroupent en un superensemble monophylétique. Si tel était le cas, cela s'interpréterait comme résultant d'une symbiose primordiale unique d'une bactérie photosynthétique dans un hôte eucaryote suivie de la différenciation ultérieure des chloroplastes en trois

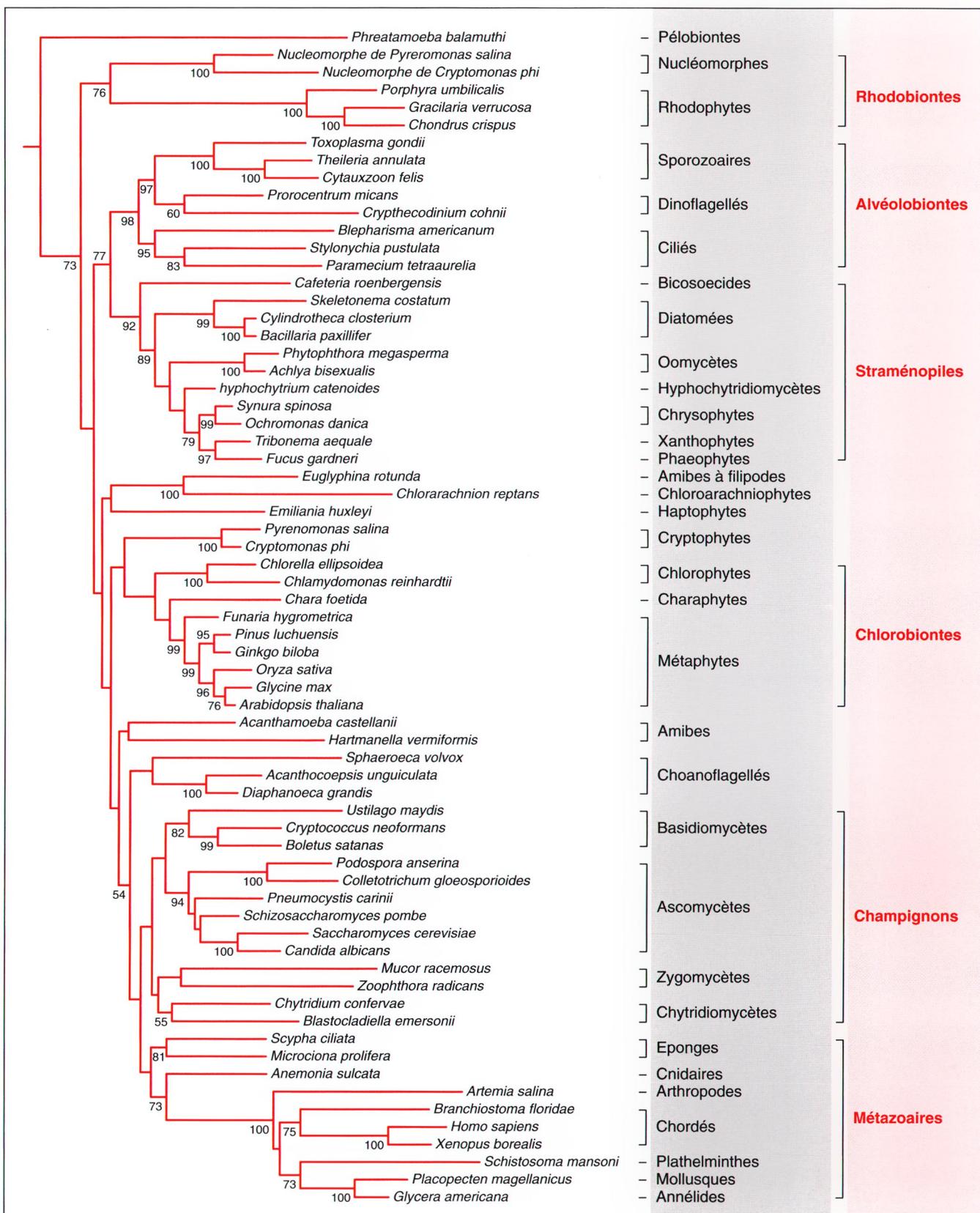
grands types pigmentaires au sein même des hôtes eucaryotes successifs. Alternativement, cela pourrait s'interpréter comme le résultat de symbioses multiples et indépendantes. Compte tenu de l'existence des Cyanobactéries dont le système photosynthétique est très proche de celui des algues rouges eucaryotes (chlorophylle a et phycobiline) et des Prochlorophytes, bactéries à chlorophylles a et b, comme les algues vertes, on pourrait imaginer qu'au moins deux événements symbiotiques distincts, l'un donnant naissance aux algues rouges par ingestion d'une Cyanobactérie, l'autre aux algues vertes par ingestion d'un Prochlorophyte, se seraient produits, l'origine des Chromophytes demeurant ouverte.

Monophylie « rouge-vert ». La question a été abordée par deux voies complémentaires : le séquençage de gènes nucléaires et l'analyse des génomes chloroplastiques et mitochondriaux. Dans le cas d'un événement symbiotique unique, on s'attend en effet à ce qu'il y ait superposition entre les arbres obtenus à partir de marqueurs nucléaires et ceux obtenus à partir de marqueurs d'organites. Si des symbioses multiples se sont produites, par contre, l'arbre établi à partir d'un marqueur nucléaire ne se superposera pas nécessairement à celui établi à partir d'un marqueur d'organite [76].

L'analyse de gènes nucléaires n'a pas permis d'apparenter fermement les trois grandes catégories d'organismes photosynthétiques ; tous (à l'exception des Eugléniens) émergent dans la « couronne terminale » mais les séquences d'ARNr ou de protéines ne permettent pas d'en faire un groupe monophylétique solide. L'analyse de séquences chloroplastiques [76, 77] a fourni des résultats plus clairs : toutes les séquences d'ARNr chloroplastiques viennent se positionner en groupe-frère des Cyanobactéries ; si cela était attendu pour les chloroplastes « rouges » dont les parentés avec les Cyanobactéries avaient été notées de longue date, le résultat était plus significatif pour les chloroplastes « verts » dont on pouvait se demander s'ils ne dériveraient pas plutôt d'une bactérie « verte » Prochloro-

phyte. La seconde hypothèse a pu être rejetée et les résultats étaient donc compatibles avec une origine monophylétique des chloroplastes rouges et verts. On en déduit que les hôtes sont aussi vraisemblablement monophylétiques. Une seule complication est apparue dans ces analyses, quand on a étudié des séquences protéiques chloroplastiques : si la majorité d'entre elles confortent le résultat obtenu avec l'ARNr, celles des deux sous-unités de la ribulose diphosphate carboxylase (rbcL et rbcS) des algues rouges se regroupent clairement avec des séquences de Protéobactéries du groupe α/β plutôt qu'avec des Cyanobactéries. Ce résultat a été interprété comme un transfert latéral de ces gènes dans le chloroplaste ancestral des algues rouges, après l'installation de la Cyanobactérie et la divergence de la lignée allant vers les algues vertes. Des travaux récents sur les génomes mitochondriaux des algues rouges [78] ainsi qu'une réanalyse des données de gènes nucléaires [79], viennent conforter l'hypothèse de la monophylie « rouge-vert ».

Les chromophytes : symbiose primaire et symbiose secondaire. La parenté rouge-vert étant suggérée, qu'en est-il des jaunes-bruns (Chromophytes) ? Il convient de distinguer à ce niveau symbiose primaire et symbiose secondaire. Nous avons en effet souligné au début de cet article la présence d'une structure très particulière dans le groupe des Chromophytes, le *chloroplast endoplasmic reticulum*, ou CER (figure 3). L'interprétation de cette structure est venue de l'étude d'un groupe de protistes flagellés, les Cryptophytes, qui possèdent un chloroplaste de type « rouge » également entouré d'un CER mais avec, en plus, entre l'enveloppe chloroplastique et les membranes du CER, un noyau de petite taille (le nucléomorphe) à caractéristiques eucaryotes : enveloppe nucléaire à deux membranes percée par des pores nucléaires typiques, présence de chromosomes. Cela a suggéré qu'on avait affaire chez les Cryptophytes à la symbiose d'un eucaryote « rouge » (Rhodophyte) dans un hôte eucaryote [80]. C'est bien ce qui a été démontré par un élégant



travail de Douglas *et al.* [81] qui, en séquençant les divers types d'ARNr de type eucaryote présents chez une Cryptophyte, ont montré que l'un des gènes se regroupe sans ambiguïté avec ceux des Rhodophytes (celui du symbionte) tandis que l'autre (celui de l'hôte) se place ailleurs dans la couronne terminale, se regroupant avec un flagellé, *Goniomonas* [82]. Le nucléomorphe est donc le noyau résiduel d'une algue rouge englobée par un autre protiste et les deux membranes du CER s'interprètent alors comme correspondant à la membrane plasmique de l'algue rouge et la membrane de phagocytose de l'hôte [83]. Par extrapolation, on peut penser que le CER des Chromophytes a une origine analogue, à ceci près que dans leur cas il n'y aurait plus aucune trace du noyau résiduel. C'est par une hypothèse analogue de symbiose secondaire relativement récente que l'on explique la présence de chloroplastes à trois membranes chez certains Eugléniens, ce qui résulte par la même occasion la contradiction apportée par la position assez basse de ce groupe dans l'arbre général des Eucaryotes.

En résumé, l'histoire de la machinerie photosynthétique des eucaryotes semble avoir correspondu à une symbiose primaire unique et relativement

tardive d'une Cyanobactérie chez un protiste avec un apport latéral de certains gènes (*rbcL* et *rbcS*) d'une Protéobactérie chez les Rhodophytes et les Chromophytes, suivis, vraisemblablement, de plusieurs événements de symbiose secondaire donnant naissance de manière indépendante aux Cryptophytes, aux Chromophytes et aux Eugléniens [84-86].

• Origine des Métazoaires

La recherche des plus proches parents des Métazoaires a récemment été abordée. Rappelons que cette question a été longuement débattue depuis le XIX^e siècle et que toutes sortes de propositions ont été faites. Celle qui revient avec le plus de régularité dans les traités de zoologie consiste à apparenter de petits protistes, dont le flagelle est entouré d'une collerette, les Choanoflagellés, aux éponges dont les cellules de l'endoderme, appelées choanocytes, présentent une structure très similaire. Puis on apparente les Éponges au reste des Métazoaires en raison, en particulier, de l'existence du collagène. La phylogénie moléculaire semble conforter cette vieille hypothèse [87]. Il reste à identifier le groupe-frère de l'ensemble Choanoflagellés-Éponges-Métazoaires. Les phylogénies moléculaires laissent penser qu'il s'agit des Champignons [87-89]. Cavalier-Smith [90] avait déjà proposé une telle idée, en se basant sur des caractères métaboliques et cellulaires. En effet, les Champignons et les Métazoaires partagent divers caractères comme : un exosquelette chitineux, du glycogène mais pas d'amidon, des mitochondries dont le code génétique utilise UGA pour le tryptophane, à la différence des mitochondries de plantes vertes. De plus, les Chytridiomycètes, qui sont à la base des Champignons, et les Choanoflagellés, qui sont à la base des Métazoaires, possèdent tous deux des mitochondries à crêtes aplaties, non discoïdes, et un flagelle simple postérieur.

Une telle situation phylogénétique des Champignons est encore sujet de débats [91, 92], mais, si elle était confirmée, elle pourrait avoir une grande importance. En effet, le génome de *Saccharomyces cerevisiae* est en

voie d'être séquencé dans son entier. Il pourrait alors réaliser un groupe extérieur idéal pour étudier l'évolution du génome des animaux.

Congruence et contradictions avec les arbres protéiques

Une base de données substantielle commence à être disponible pour divers gènes codant pour des protéines à large distribution phylogénétique. Ce sont les : tubulines, actine, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et, surtout, facteurs d'élongation de la synthèse protéique (EF-1 α en particulier) et protéines de choc thermique (HSP70) dont la vitesse d'évolution paraît bien adaptée aux grandes distances évolutives. Plusieurs arbres couvrant l'ensemble des eucaryotes ont été construits avec ces marqueurs et, si on constate une certaine congruence avec ceux fondés sur les ARNr, mais aussi quelques contradictions.

• La meilleure congruence entre protéines et ARNr est obtenue pour les taxons de la zone I (Microsporidies, Diplomonadines et Trichomonadines).

En effet, pour la plupart des gènes séquencés (EF-1 α , EF2, HSP70, tubuline β , Ile et Val ARNt synthétases et actine), les représentants de ces groupes se situent à la base de l'arbre des Eucaryotes, comme avec les ARNr (*figure 4*). Néanmoins, pour quelques gènes (GAPDH, glutamate déshydrogénase et triosephosphate isomérase), ils émergent très tardivement, près des organismes multicellulaires. Cependant, il faut noter que ces gènes fournissent une image évolutive très confuse, où de nombreux groupes indiscutablement monophylétiques ne sont pas retrouvés. Ils ne sont donc probablement pas de bons marqueurs phylogénétiques [93, 94].

• Des contradictions plus importantes concernent la zone II de l'arbre des Eucaryotes.

Par exemple, les Rhizopodes, qui sont polyphylétiques avec les ARNr, apparaissent monophylétiques avec l'actine (tout au moins pour *Acanthamoeba*, *Dictyostelium* et *Physarum*). De plus, les contradictions apparaissent aussi entre protéines

◀ **Figure 6. La « couronne terminale » des Eucaryotes.** Cet arbre constitue une portion de la figure 4 reprise ici de façon détaillée; il a été construit avec la même méthode (neighbor-joining) mais en utilisant tous les types de substitutions, transitions et transversions. On y voit émerger de grands ensembles monophylétiques (Rhodophytes, Alvéolobiontes, Stramenopiles, Chlorophytes-Métaphytes, Champignons, Métazoaires triploblastes), à l'intérieur desquels des « phylums » monophylétiques sont à nouveau décelables (par exemple, Sporozoaires et Ciliés à l'intérieur des Alvéolobiontes). En revanche, l'ordre relatif d'émergence de ces grands ensembles est très difficile à établir; les valeurs de bootstrap, toutes inférieures à 50 % dans ces cas, n'ont pas été figurées.

elles-mêmes. Le consensus que l'on pourrait tirer de toutes ces comparaisons est celui d'une fusion des zones 2 et 3 de l'arbre de la *figure 4*. Néanmoins, la quantité de séquences disponibles est encore insuffisante pour discuter ce problème en détail. Nous allons nous contenter d'aborder le cas d'une espèce, *Dictyostelium*, et d'un gène, EF-1 α .

En effet, la position de *Dictyostelium* est actuellement très controversée. Avec les ARNr (*figure 4*), il constitue le groupe-frère de la couronne terminale des eucaryotes. C'est pourquoi il est très souvent utilisé comme groupe extérieur pour l'étude de cette région de l'arbre. Dès 1990, Loomis et Smith [95] ont contesté ce résultat, en remarquant que l'ARNr de *Dictyostelium* est pauvre en GC (40 %) et que cela pourrait biaiser l'analyse phylogénétique. Récemment, en utilisant une vingtaine de gènes différents, il a été proposé que *Dictyostelium* forme le groupe-frère de l'ensemble Champignons/Métazoaires, à l'exclusion des Chlorobiontes [96]. Mais, si cette analyse est représentative au niveau génomique, elle ne l'est pas au niveau taxonomique, puisque seulement 5 espèces ont été utilisées. Or nous avons vu dans le premier article l'importance qu'avait l'échantillonnage taxonomique. De plus, pour l'instant, *Dictyostelium* est le seul représentant des Acrasiomycètes à avoir été séquencé, ce qui est clairement insuffisant. En définitive, *Dictyostelium* pourrait bien appartenir à la couronne terminale, ainsi que la plupart des groupes de la zone II.

Le facteur d'élongation EF-1 α a été abondamment séquencé et fournit donc une image assez complète de la phylogénie des Eucaryotes (*figure 7*). On remarque l'émergence précoce des Microsporidies et des Diplomonadines, la monophylie d'un ensemble Métazoaires/Champignons mais surtout le mélange des zones 2 et 3. Par exemple, *Dictyostelium* est le groupe-frère des Rhodobiontes, et ce groupe est situé entre les Chlorobiontes et les Métazoaires. Un résultat frappant est la non-monophylie des Ciliés (*Euplotes*, *Tetrahymena* et

Stylonychia) – et par voie de conséquence des Alvéolobiontes – et leur émergence très précoce (avant les Euglenozoa, voire avant *Entamoeba*).

• La zone II est-elle un artefact?

Nous avons vu dans l'article précédent que la vitesse d'évolution était un paramètre primordial et que plus un gène évoluait vite à l'intérieur d'une lignée évolutive, plus cette lignée émergeait de manière précoce dans la phylogénie construite à partir de ce gène, à cause du phénomène d'attraction des longues branches [97]. On peut comparer les vitesses d'évolution à l'intérieur des Euglenozoa (estimée par la distance entre *Euglena* et *Trypanosoma*) et à l'intérieur des Ciliés (estimée par la distance entre *Stylonychia* et *Tetrahymena*). Pour l'ARNr, le rapport des vitesses est de 0,4 alors que pour EF-1 α , il est de 1,4. En d'autres termes, l'ARNr des Euglenozoa évolue vite et ceux-ci émergent alors de manière précoce (*figure 4*) alors que leur facteur d'élongation évolue lentement et ils émergent tardivement (*figure 7*). On a bien sûr le résultat exactement complémentaire pour les Ciliés. Ainsi, la zone II observée dans les phylogénies construites avec les ARNr pourrait n'être qu'un artefact dû à l'accélération de la vitesse d'évolution des ARN ribosomiques, en particulier chez les Rhizopodes et les Euglenozoa. L'histoire des Eucaryotes se résumerait alors à l'émergence précoce de quelques groupes (Microsporidies, Diplomonadines et Trichomonadines) suivie d'une gigantesque radiation au sein de laquelle presque tous les phylums eucaryotes se seraient différenciés en un temps très court.

De l'intérêt d'une vision historique

Au terme de ces deux articles, deux points principaux se dégagent. Le premier concerne la structure de l'arbre phylogénétique des Eucaryotes et les perspectives d'amélioration de sa résolution.

• La structure de l'arbre phylogénétique des Eucaryotes.

Une armature relativement solide a été obtenue ces dernières années, principalement en ce qui concerne l'existence de deux

épisodes évolutifs majeurs, l'apparition des premières lignées eucaryotes d'une part et la grande radiation des Eucaryotes et le passage à la multicellularité de manière indépendante dans plusieurs lignées d'autre part. Ces deux phases peuvent être considérées comme bien établies. Toutefois, les détails des ordres de branchement, tout particulièrement dans la « couronne terminale », se révèlent très difficiles à établir avec les méthodes habituelles de la phylogénie moléculaire.

L'avenir consistera vraisemblablement en l'exploitation de deux voies nouvelles. D'abord l'utilisation d'autres types de caractères moléculaires que la simple succession des nucléotides. Il apparaît de plus en plus clairement que des caractères de type qualitatif tel que l'ordre relatif des gènes, la présence de singularités telles que des introns, des insertions et d'autres caractéristiques génomiques structurales sont d'un très grand intérêt phylogénétique. L'un des beaux exemples récents est l'utilisation de l'ordre dans lequel les gènes sont disposés sur le génome mitochondrial comme caractère phylogénétique pour reconstruire l'histoire des eucaryotes [98]. Ensuite, on peut attendre des progrès dans les méthodes de traitement des données elles-mêmes. Jusqu'ici, par exemple, les différentes substitutions nucléotidiques observées entre séquences homologues ont été traitées de manière identique. Or, on sait que les différents sites d'un gène fixent les mutations à des taux extraordinairement différents. De nombreuses équipes sont à la recherche de méthodes objectives pour réaliser une pondération tenant compte de cette réalité.

• **La perspective phylogénétique.** Le second point concerne l'intérêt à replacer les organismes dans leur cadre historique (ou « généalogique »), autrement dit à disposer d'une perspective phylogénétique. Fondamentalement, c'est à la lumière de la trajectoire évolutive des êtres vivants que leurs caractéristiques moléculaires ou morphologiques prennent tout leur sens. Cela s'explique de deux façons.

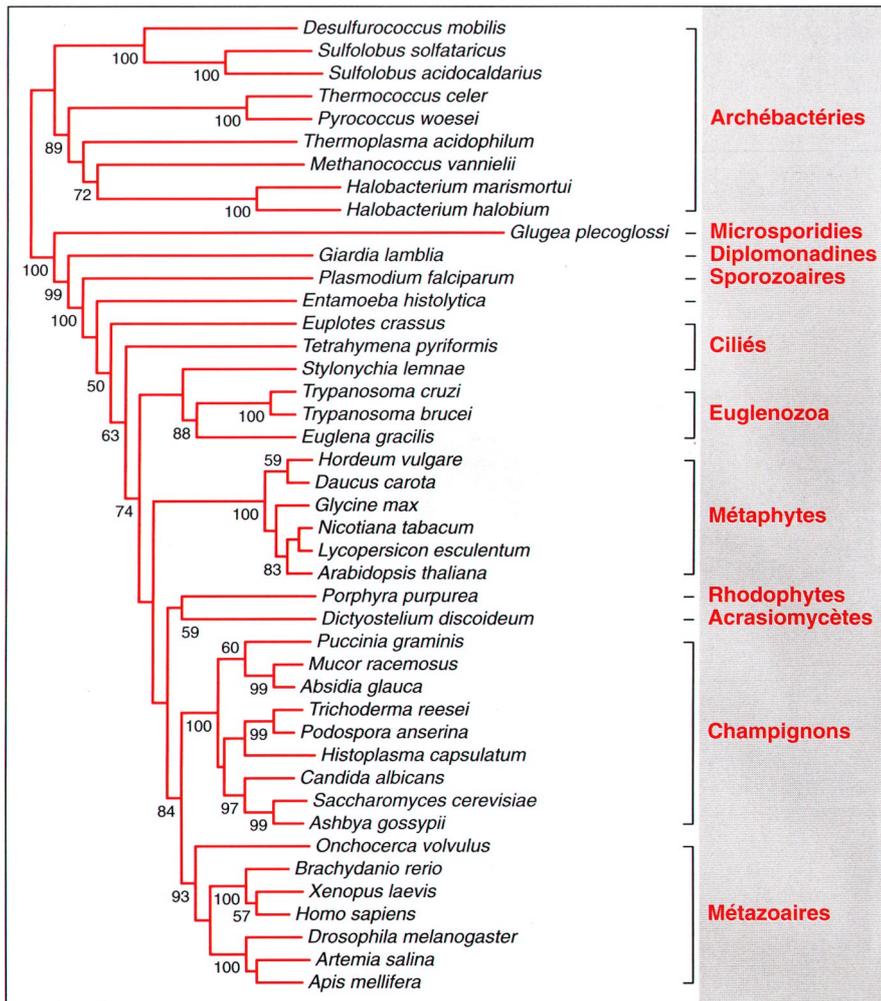


Figure 7. **Arbre phylogénétique du facteur d'élongation EF1- α .** Cet arbre montre de nombreuses congruences avec celui issu des ARNr. Par exemple, Microsporidies et Diplomonadines se placent à la base de la partie « eucaryote » de l'arbre, les Euglenozoa sont retrouvés, les Champignons sont bien monophylétiques, etc. Noter cependant que les Ciliés et les Alvéolobiontes ne sont pas monophylétiques, et qu'ils émergent avant les Euglenozoa.

D'abord, la structure de l'arbre indique rapidement les proximités qui existent entre grands groupes biologiques ; elle peut donc guider le choix des organismes sur lesquels on fait porter un effort expérimental particulier. La position vraisemblable des Champignons comme groupe-frère des Métazoaires est, à cet égard, frappante. Elle fournit un argument supplé-

mentaire justifiant *a posteriori* l'important effort réalisé pour le séquençage du génome complet de *Saccharomyces* en montrant que cet organisme n'est, en définitive, pas si éloigné des animaux qu'on aurait pu le penser. Il serait objectif d'ailleurs que l'on cesse de qualifier la levure de *lower eukaryote*, en tenant compte des résultats de phylogénie moléculaire.

En deuxième lieu, et de manière plus profonde, la connaissance de la phylogénie d'un ensemble d'organismes permet d'interpréter avec beaucoup plus de confiance les divers caractères phénotypiques de chacun de ces organismes comme étant « ancestraux » ou « dérivés ». Par exemple, en observant que les Champignons et les Métazoaires émergent dans la couronne terminale, on peut comprendre les similitudes frappantes constatées actuellement dans la réalisation de tous leurs processus cellulaires « de base ». Qu'il s'agisse des modalités du transit intracellulaire des protéines, de l'exocytose, de l'endocytose, de la mitose, ou de la régulation du cycle cellulaire, on est frappé des homologues décrites quotidiennement entre gènes de levure et gènes de Mammifères. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces deux groupes dérivent d'ancêtres ayant sans doute connu une longue phase préalable d'histoire à l'état unicellulaire. C'est au cours de cette phase qu'auraient été mises en place toutes les fonctions fondamentales de la cellule eucaryote. Nous avons discuté dans un autre article de tous les acquis des protistes et de ce qui restait à « inventer » pour passer au stade multicellulaire [99]. De la même manière, c'est en sachant que l'*Amphioxus* (Céphalocordé) émerge comme groupe-frère de l'ensemble des Crâniates que l'on peut interpréter l'évolution du nombre de complexes de gènes homéotiques [100], 1 chez l'*Amphioxus* et 4 chez les Vertébrés : 2 duplications se sont très vraisemblablement produites à la base de l'arbre des Vertébrés (*m/s* n° 11, vol. 10, p. 1178).

En résumé, l'exercice consiste en une opération de superposition : en utilisant l'arbre phylogénétique des espèces comme structure de référence, on replace dessus les caractéristiques biologiques que l'on étudie. Ainsi s'éclairent leur origine et les modalités de leur diversification. C'est ce que Dobzhansky a voulu dire par son célèbre aphorisme : « *Nothing in biology makes sense except in the light of evolution* » (Rien n'a de sens en biologie qu'à la lumière de l'évolution) ■

Références

1. Philippe H, Germot A, Le Guyader H, Adoutte A. Que savons-nous de l'histoire évolutive des Eucaryotes? 1. L'arbre universel du vivant et les difficultés de la reconstruction phylogénétique. *médecine/sciences* 1995; 11: I-XIV.
2. Linné C von. *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*. Editio decima, reformata; Tom. I, Halmiae: Laurentiae Salvii, 1758.
3. Haeckel E. *Das protistenreich. Eine populäre Uebersicht über das Formengebiet der niedersten Lebewesen. Mit einem wissenschaftlichen Anhang: System der Protisten*, Leipzig: Günther, 1878.
4. Copeland HF. *The classification of lower organisms*. Palo Alto CA: Pacific Books, 1956.
5. Whittaker RH. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 1969; 163: 150-60.
6. de Puytorac P, Grain J, Mignot JP. *Précis de Protistologie*. Paris: Soc. Nouvelle Ed. Bou-bée, 1987.
7. Lee JJ, Hutner SH, Bovee EC. *An illustrated guide to the protozoa*. Lawrence, Kansas: Society of Protozoologists, 1985.
8. Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ. *Handbook of Protoctista*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1990.
9. Bütschli O. Protozoa. In: *Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs, Vol. 1*. Leipzig: Winter'sche Verlag, 1880-9.
10. Corliss JO. The kingdom Protista and its 45 phyla. *BioSystems* 1984; 17: 87-126.
11. Patterson DJ. Protozoa: Evolution and Systematics. In: Hausmann K, Hülsmann N, eds. *Progress in Protistology*. Stuttgart-Jena: Gustav Fischer Verlag, 1994: 1-14.
12. Taylor FJR. Problems in the development of an explicit hypothetical phylogeny of the lower eukaryotes. *BioSystems* 1978; 10: 67-89.
13. Hori H, Osawa S. Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 445-72.
14. Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1383-7.
15. Baroin A, Perasso R, Qu LH, Brugerolle G, Bachelier JP, Adoutte A. Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3474-8.
16. Vossbrinck CR, Maddox JV, Friedman S, Debrunner-Vossbrinck BA, Woese CR. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 1987; 326: 411-4.
17. Vossbrinck CR, Woese CR. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* 1986; 320: 287-8.
18. Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA. Phylogenetic significance of the kingdom concept: an unusual eukaryotic 16S-like ribosomal RNA from *Giardia Lamblia*. *Science* 1989; 243: 75-7.
19. Cavalier-Smith T. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 1987; 326: 332-3.
20. Cavalier-Smith T. Archamoebae: the ancestral eukaryotes? *BioSystems* 1991; 25: 25-38.
21. Qu LH, Nicoloso M, Bachelier JP. Phylogenetic calibration of the 5' terminal domain of large rRNA achieved by determining twenty eucaryotic sequences. *J Mol Evol* 1988; 28: 113-24.
22. Caron F, Meyer E. Does *Paramecium primaurelia* use a different genetic code in its macronucleus? *Nature* 1985; 314: 185-8.
23. Lenaers G, Maroteaux L, Michot B, Herzog M. Dinoflagellates in Evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. *J Mol Evol* 1989; 29: 40-51.
24. Sogin ML. The phylogenetic significance of sequence diversity and length variations in Eukaryotic small subunit ribosomal RNA coding regions. In: Warren L, Koprowski H, eds. *New perspectives on evolution*. New York: Wiley-Liss Inc., 1991: 175-88.
25. Perasso R, Baroin A, Qu LH, Bachelier JP, Adoutte A. Origin of the algae. *Nature* 1989; 339: 1-3.
26. Sogin ML. The origin of eukaryotes and evolution into major kingdoms. In: Bengtson S, ed. *Early life on earth*. Nobel Symposium N° 84, New York: Columbia UP, 1994: 181-92.
27. Schlegel M. Molecular phylogeny of eukaryotes. *Trend Ecol Evol* 1994; 9: 330-5.
28. Cavalier-Smith T. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* 1993; 953-94.
29. Cedergren R, Gray MW, Abel Y, Sankoff D. The evolutionary relationships among know life forms. *J Mol Evol* 1988; 28: 98-112.
30. Hasegawa M, Hashimoto T. Ribosomal RNA trees misleading? *Nature* 1993; 361: 23.
31. Leippe DD, Gunderson JH, Nerad TA, Sogin ML. Small subunit ribosomal RNA of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 59: 41-8.
32. Philippe H. Microsporidia as the earliest eukaryotic lineage: evidence from a new method testing phylogenetic tree reliability. Soumis.
33. Gould SJ. *La vie est belle. Les surprises de l'évolution*. Paris: Ed. du Seuil, 1991.
34. Conway Morris S. The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature* 1993; 361: 219-25.
35. Briggs DEG, Erwin DH, Collier FJ. *The fossils of the Burgess Shale*. Washington: Smithsonian Institution Press, 1994.
36. Philippe H, Chenuil A, Adoutte A. Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? *Development* 1994; supplement: 15-25.
37. Hall BK. *Evolutionary developmental biology*. London: Chapman and Hall, 1992.
38. Liem KL. Key evolutionary innovations, differential diversity, and symecomorphosis. In: Nitecki MH, ed. *Evolutionary innovations*. Chicago: The University Press, 1990; 147-70.
39. Knoll AH. The early evolution of eukaryotes. A geological perspective. *Science* 1992; 256: 622-7.
40. Eldredge N, Gould SJ. Punctuated equilibria: an alternative in phyletic gradualism. In: Schopf TJM, ed. *Models in paleobiology*. San Francisco: Freeman, Cooper and Company, 1972: 82-115.
41. Takvorian P, Cali A. Enzyme histochemical identification of the Golgi apparatus in the microsporidian, *Glugea stephani*. *J Euk Microbiol* 1994; 41: 63S-4S.
42. Biderre C, Pages M, Metenier G, David D, Bata J, Prensier G, Vivares CP. On small genomes in eukaryotic organisms: molecular karyotypes of two microsporidian species (Protozoa) parasites of vertebrates. *C R Acad Sci Paris* 1994; 317: 399-404.
43. Chen WJ, Barr AR. Chromosomal evidence on the sporogony of *Ambryospora californica* (Microspora: Ambryosporidae) in *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Euk Microbiol* 1995; 42: 103-8.
44. Brugerolle G. Evolution and diversity of amitochondrial zooflagellates. *J Euk Microbiol* 1993; 40: 616-8.
45. Müller M. The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 2879-89.
46. Müller M. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Ann Rev Microbiol* 1988; 42: 465-88.
47. Cury JJ, Vavra J, Vivares C. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol Cellulaire* 1980; 38: 49-52.
48. Boothroyd JC, Wang A, Campbell DA, Wang CC. An unusually compact ribosomal DNA repeat in the protozoan *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 4065-85.
49. Champney WS, Chittum HS, Samuels R. Ribosomes from trichomonad protozoa have prokaryotic characteristics. *Int J Biochem* 1992; 24: 1125-33.
50. Katiyar SK, Vivesvara GS, Edlind TD. Comparisons of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing, mRNA binding and paromycin susceptibility. *Gene* 1995; 152: 27-33.
51. Viale AM, Arakaki AK. The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles. *FEBS Letters* 1994; 341: 146-51.
52. Clark CG, Roger AJ. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6518-21.
53. Gupta RS, Aitken K, Falah M, Singh B. Cloning of *Giardia lamblia* heat shock protein HSP70 homologs: Implications regarding origin of eukaryotic cells and of endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2895-9.
54. Soltys BJ, Gupta RS. Presence and cellular distribution of a 60-kDa protein related to mitochondrial HSP 60 in *Giardia lamblia*. *J Parasitol* 1994; 80: 580-90.
55. Embley TM, Finlay BJ, Dyal PL, Hirt RP, Wilkinson M, Williams AG. Multiple origins of anaerobic ciliate with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1995; 262: 87-93.
56. Hrdy I, Müller M. Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate: ferredoxin oxidoreductase of the amitochondrial eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol* 1996 (sous presse).
57. Saccone C. The evolution of mitochondrial DNA. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 875-81.
58. Gray MW, Cedergren R, Abel Y, Sankoff D. On the evolutionary origin of the plant mitochondrion and its genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2267-71.
59. Gray MW. The endosymbiont hypothesis revisited. In: Wolstenholme DR, Jeon KW, eds. *Mitochondrial genomes*. San Diego, California: Academic Press Inc, 1992.
60. Kivic PA, Walne PL. An evaluation of a possible phylogenetic relationship between the Euglenophyta and Kinetoplastida. *Origins of Life* 1984; 13: 269-88.

61. Hinkle G, Sogin ML. The evolution of the *Vahlkampfiidae* as deduced from 16S-like ribosomal RNA analysis. *Euk Microbiol* 1993; 40: 599-603.
62. Merle C, Moullade M, Lima O, Perasso R. Essai de caractérisation phylogénétique de Foraminifères planctoniques à partir de séquences partielles d'ARNr 28S. *C R Acad Sci Paris* 1994; 319: 149-53.
63. Pawlowski J, Bolivar I, Guiard-Maffia J, Gouy M. Phylogenetic position of Foraminifera inferred from LSU rRNA gene sequences. *Mol Biol Evol* 1994; 11: 929-38.
64. Gilbert W, Glynias M. On the ancient nature of introns. *Gene* 1993; 137-44.
65. Kersanach R, Brinkmann H, Liaud M-F, Zhang DX, Martin W, Cerff R. Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. *Nature* 1994; 367: 387-9.
66. Logsdon JM Jr, Palmer JD. Origin of introns - early or late? *Nature* 1994; 369: 526.
67. Lambowitz A, Belford M. Introns as mobile genetic elements. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 587-622.
68. Cavalier-Smith T. Intron phylogeny: a new hypothesis. *Trends Genet* 1991; 7: 145-8.
69. Ferat JL, Michel F. Group II self-splicing introns in bacteria. *Nature* 1993; 364: 358-61.
70. Mattick JS. Introns: evolution and function. *Curr Opin Gen Dev* 1994; 4: 823-31.
71. Stelly N, Halpern S, Nicolas G, Fragu P, Adoutte A. Direct visualization of a vast cortical calcium compartment in paramoecium by secondary ion mass spectrometry (SIMS) microscopy: possible involvement in exocytosis. *J Cell Sci* 1995; 108: 1895-909.
72. Gardner MJ, Goldman N, Barnett P, Moore PW, Rangachari K, Strath M, Whyte A, Williamson DH, Wilson RJ. Phylogenetic analysis of the *rpoB* gene from the plastid-like DNA of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 66: 221-31.
73. Eisler K. Somatic kinetics or paroral membrane. Which came first in ciliate evolution? *BioSystems* 1992; 239-54.
74. Fleury A, Delgado P, Ifode F, Adoutte A. Molecular phylogeny of ciliates: What does tell us about the evolution of the cytoskeleton and of developmental strategies? *Dev Genetics* 1992; 247-54.
75. Leipe DD, Wainright PO, Gunderson JH, Porter D, Patterson DJ, Valois F, Himmerich S, Sogin ML. The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia* 1994; 33: 369-77.
76. Loiseaux-de Goër S. Plastid lineages. In: Round FE, Chapman DJ, eds. *Progress in Phycological Research, Volume 10*. Biopress Ltd, 1994: 137-77.
77. Bhattacharya D, Medlin L. The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J Phycol* 1995; 31: 489-98.
78. Leblanc C, Boyen C, Richard O, Bonnard G, Grienemberger JM, Kloareg B. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the rhodophyte alga *Chondrus crispus* (Gigartinales). Gene content and genome organization. *J Mol Biol* 1995; 484-95.
79. Ragan MA, Gutell RR. Are red algae plants? *Bot J Linn Soc* 1995; 117 (sous presse).
80. Gibbs S. The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 361: 193-207.
81. Douglas SE, Murphy CA, Spencer DF, Gray MW. Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. *Nature* 1991; 350: 148-51.
82. McFadden GI, Gilson PR, Hill DRA. *Goniomonas*: rRNA sequences indicate that this phagotrophic flagellate is a close relative of the host component of cryptomonads. *Eur J Phycol* 1994; 29: 29-32.
83. Cavalier-Smith T. The kingdom chromista. In: Green JC, Leadbeater BSC, Diver WC, eds. *The chromophyte algae: problems and perspectives*. Oxford: Clarendon Press, 1989: 379-405.
84. Cavalier-Smith T, Allsopp MTEP, Chao EE. Chimeric conundra: are nucleomorphs and chromists monophyletic or polyphyletic? *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11368-72.
85. McFadden GI, Gilson PR, Hofmann CJ, Adcock GJ, Maier UG. Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic algae. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3690-4.
86. Gantt JS, Baldauf SL, Calie PJ, Weeden NF, Palmer JD. Transfer of *rpl22* to the nucleus greatly preceded its loss from the chloroplast and involved the gain of an intron. *EMBO J* 1991; 10: 3073-8.
87. Wainright PO, Hinkle G, Sogin ML, Stickle SK. Monophyletic origins of the Metazoa: an evolutionary link with fungi. *Science* 1993; 260: 340-2.
88. Baldauf SL, Palmer JD. Animals and fungi are each other's closest relatives: Congruent evidence from multiple proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11558-62.
89. Nikoh N, Hayase N, Iwabe N, Kuma KI, Miyata T. Phylogenetic relationship of the kingdoms Animalia, Plantae, and Fungi, inferred from 23 different protein species. *Mol Biol Evol* 1994; 11: 762-8.
90. Cavalier-Smith T. The origin of Fungi and pseudofungi. In *Evolutionary Biology of the Fungi (British Mycological Society Symposium 12)*. Rayner ADM, Brasier CM, Moore D, eds. Cambridge, University Press, 1987: 339-53.
91. Rodrigo AG, Bergquist PR, Bergquist PL. Inadequate support for an evolutionary link between the Metazoa and the Fungi. *Syst Biol* 1994; 43: 578-84.
92. Van der Auwera G, De Baere R, Van de Peer Y, De Rijk P, Van den Broeck I, De Wachter R. The phylogeny of the Hyphochytriomycota as deduced from ribosomal RNA sequences of *Hyphochytrium catenoides*. *Mol Biol Evol* 1995; 12: 671-8.
93. Markos A, Miretsky A, Muller M. A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with eubacterial features in the amitochondriate eukaryote, *Trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol* 1993; 37: 631-43.
94. Forterre P, Benachenhou-Lahfa N, Confalonieri F, Duguet M, Elie C, Labedan B. The nature of the last universal ancestor and the root of the tree of life, still open questions. *BioSystems* 1993; 28: 15-32.
95. Loomis WF, Smith DW. Molecular phylogeny of *Dictyostelium discoideum* by protein sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9093-7.
96. Kuma KI, Nikoh N, Iwabe N, Miyata T. Phylogenetic position of *Dictyostelium* inferred from multiple protein data sets. *J Mol Evol* 1995; 41: 238-46.
97. Felsenstein J. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst Zool* 1978; 27: 401-10.
98. Sankoff D, Leduc G, Antoine N, Paguin B, Lang BF, Cedergren R. Gene order comparisons for phylogenetic inference: evolution of the mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6575-9.
99. Adoutte A. From unicellular to multicellular organisms: Can we trace the evolution of the tools and mechanisms of morphogenesis? In: Beysens D, Forgacs G, Gaill F, eds. *Interplay of genetic and physical processes in the development of biological form*. Singapore: World Scientific, 1995: 168-84.
100. Garcia-Fernandez J, Holland PWH. Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* 1994; 370: 563-6.

André Adoutte
Hervé Le Guyader
Hervé Philippe

Laboratoire de biologie cellulaire 4, Ura 1134 Cnrs, bâtiment 444, université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.

Agnès Germot

Laboratoire de biologie comparée des protoistes Ura 1944 Cnrs, université de Clermont-Ferrand 2, Les Cézeaux, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.

Remerciements

Nous remercions vivement les membres du Comité de rédaction de la SFG, en particulier Alain Nicolas, Jean Générumont et Pierre Thuriaux pour leur lecture critique et leurs nombreuses suggestions. Nous avons également profité des commentaires pertinents de Guy Brugerolle. Un grand merci à Cécile Couanon pour son aide précieuse lors de la préparation du manuscrit et pour la gestion de la bibliographie.

TIRÉS À PART

A. Adoutte.