



HAL
open science

Identification de nouvelles protéines du tube polaire et de la paroi sporale chez différentes espèces microsporidiennes. Essais de transfection d'*Encephalitozoon cuniculi*

Valérie Polonais

► **To cite this version:**

Valérie Polonais. Identification de nouvelles protéines du tube polaire et de la paroi sporale chez différentes espèces microsporidiennes. Essais de transfection d'*Encephalitozoon cuniculi*. Microbiologie et Parasitologie. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006. Français. NNT : 2006CLF21671 . tel-00695273

HAL Id: tel-00695273

<https://theses.hal.science/tel-00695273>

Submitted on 7 May 2012

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D.U. : 1671

UNIVERSITE D'AUVERGNE

**Ecole doctorale
des Sciences de la Vie et de la Santé**
N° Ordre : 441

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Parasitologie Moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

Valérie POLONAIIS

le 19 septembre 2006

**Identification de nouvelles protéines du tube polaire
et de la paroi sporale chez différentes espèces
microsporidiennes.
Essais de transfection d'*Encephalitozoon cuniculi***

JURY

Président : Pr. Gérard PRENSIER, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Rapporteurs : Pr. Catherine BRAUN-BRETON, Université Montpellier II
Pr. Dominique SOLDATI, Université Genève

Examineur : Dr. Frédéric DELBAC, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Directeur de thèse : Pr. Christian VIVARES, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Laboratoire Biologie des Protistes UMR CNRS 6023, Parasitologie Moléculaire et Cellulaire,
Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D.U. : 1671

UNIVERSITE D'AUVERGNE

**Ecole doctorale
des Sciences de la Vie et de la Santé**
N° Ordre : 441

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Parasitologie Moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

Valérie POLONAIIS

le 19 septembre 2006

**Identification de nouvelles protéines du tube polaire
et de la paroi sporale chez différentes espèces
microsporidiennes.
Essais de transfection d'*Encephalitozoon cuniculi***

JURY

Président : Pr. Gérard PRENSIER, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

**Rapporteurs : Pr. Catherine BRAUN-BRETON, Université Montpellier II
Pr. Dominique SOLDATI, Université Genève**

Examineur : Dr. Frédéric DELBAC, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Directeur de thèse : Pr. Christian VIVARES, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Laboratoire Biologie des Protistes UMR CNRS 6023, Parasitologie Moléculaire et Cellulaire,
Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023 de l'Université Blaise Pascal. Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Christian Amblard, Directeur du laboratoire, pour m'avoir accueillie dans son unité.

Mes plus sincères remerciements vont également au Professeur Christian Vivarès, responsable de l'équipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, pour avoir participé à la direction de ce travail et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche.

Que Frédéric Delbac trouve ici l'expression de toute ma gratitude et ma reconnaissance pour son encadrement, ses conseils avisés, son soutien et sa disponibilité, et le plaisir que j'ai eu à partager ces 4 années avec quelqu'un qui a su me transmettre sa passion. Merci Fred pour toute la confiance que tu m'as témoigné, pour ton aide précieuse et pour ton amitié.

Je souhaite exprimer mes remerciements les plus sincères à Mesdames Catherine Braun-Breton et Dominique Soldati-Favre pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail malgré leurs nombreuses responsabilités.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Catherine Texier pour sa disponibilité et l'aide qu'elle m'a apportée durant ce travail ainsi que pour le bien-fondé de ses remarques lors de la correction de ce manuscrit. Merci à Hicham El-Alaoui pour l'intérêt porté à ce travail et à Emmanuel Cornillot qui a su trouver du temps pour discuter et me conseiller. Je remercie également Gérard Prensier qui a accepté de présider ce jury et m'a fait profiter de son expérience en microscopie électronique. Merci encore à Guy Méténier pour ses discussions et ses conseils.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire et plus particulièrement ceux des équipes « parasito » et G2IM, permanent, de passage et retraités, qui ont contribué à ce travail et permis qu'il se déroule dans une ambiance chaleureuse et amicale.

A Abdel, toujours présent,
à mes parents, Matthieu et mes amis, pour leur confiance et leur soutien tout au long
de ces années.

ABREVIATIONS

INTRODUCTION 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 3

I. Les microsporidies	3
I.1. Origine phylogénétique des microsporidies	4
I.2. Structure de la spore microsporidienne	6
I.2.1. Le sporoplasme : élément infectieux	6
I.2.2. L'appareil invasif	7
I.2.2.1. Le disque d'ancrage	8
I.2.2.2. Le polaroplaste	8
I.2.2.3. La vacuole postérieure	8
I.2.2.4. Le tube polaire ou filament polaire	9
I.2.3. La paroi	10
I.2.3.1. L'exospore	10
I.2.3.2. L'endospore	11
I.3. Cycle de développement	11
I.4. Transmission	13
I.4.1. La transmission horizontale	13
I.4.2. La transmission verticale	14
I.5. Les microsporidioses humaines	14
I.5.1. Diagnostic	15
I.5.1.1. Les colorations	15
I.5.1.2. L'immunofluorescence indirecte	15
I.5.1.3. Les techniques moléculaires	15
I.5.1.4. Le sérodiagnostic	16
I.5.2. Thérapie	16
I.5.2.1. Albendazole	17
I.5.2.2. Fumagilline	17
I.5.2.3. Les autres traitements	17
I.6. Génome des microsporidies	18
I.7. Données de protéomique	20
I.7.1. Le protéome d' <i>E. cuniculi</i>	20
I.7.2. Les protéines pariétales	21
I.7.3. Biogenèse de la paroi	23
II. Tube polaire et invasion	24
II.1. Les différents modes d'infestation	24
II.2. La germination	26

II.2.1. Activation de la germination	26
II.2.2. Extrusion du tube polaire	27
II.3. Le tube polaire : un complexe multiprotéique	28
II.3.1. Hétérogénéité	28
II.3.2. Les protéines du tube polaire	28
II.3.3. Les interactions entre les protéines du tube polaire	31
II.3.4. Morphogenèse du tube polaire	32
II.4. Les systèmes d'extrusion chez d'autres organismes	32
II.4.1. Filaments polaires et capsules polaires chez les myxosporidies	32
II.4.2. Les nématocystes ou cnidocystes des cnidaires	34
III. Transfection et génétique inverse	36
III.1. Signaux de transcription et de traduction	37
III.1.1. La transcription des ARNm	37
III.1.1.1. Chez les eucaryotes	37
III.1.1.2. Chez les protozoaires	38
III.1.1.3. Chez les microsporidies	39
III.1.2. La traduction	41
III.2. Les principales techniques de transfection	42
III.2.1. Lipofection et magnétofection	42
III.2.2. L'électroporation (ou électroperméabilisation)	44
III.2.3. La biolistique (ou balistique biologique)	45
III.2.4. Les autres techniques de transfection	45
III.3. Les principaux gènes rapporteurs utilisés	46
III.3.1. La GFP (Green Fluorescent Protein)	46
III.3.2. La chloramphénicol acétyltransférase, CAT	47
III.3.2. La luciférase, LUC	47
III.3.2. La β -galactosidase	47
III.3.2. La fusion avec des épitopes	48
III.4. Transfection transitoire et transfection stable	48
III.4.1. Les stratégies de sélection	49
III.4.1.1. Les antibiotiques	49
III.4.1.2. DHFR-TS (Dihydrofolate réductase Thymidylate synthase) et résistance à la pyriméthamine	50
III.4.1.3. HXGPRT ou Hypoxanthine-xanthine-guanine- phosphoribosyltransférase et résistance à l'acide mycophénolique	51
III.4.1.4. Les marqueurs de sélection négative	51
III.4.1.4. La complémentation de l'auxotrophie au tryptophane	52

III.4.2. Intégration dans le génome	53
III.4.2.1. Chez les Trypanosomatidae	53
III.4.2.2. Chez <i>Toxoplasma gondii</i>	54
III.4.2.3. Chez <i>Plasmodium falciparum</i>	55
III.4.3. Stratégies alternatives à l'intégration dans le génome	56
III.5. Quelques exemples d'application de la génétique inverse chez les parasites	57
III.5.1. L'inactivation de gènes (knock-out) par simple ou double crossing-over	57
III.5.2. La trans-complémentation	58
III.5.2. L'inactivation de gènes par knock-down	59
III.5.2.1. Systèmes inductibles et knock-out conditionnels	59
III.5.2.2. L'ARN interférence ou RNAi chez les protozoaires	61
MATERIELS ET METHODES	64
I. Les espèces microsporidiennes étudiées	64
I.1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	64
I.2. <i>Encephalitozoon hellem</i>	64
I.3. <i>Antonosporea locustae</i>	64
I.4. <i>Paranosema grylli</i>	65
II. Production et purification des parasites	65
III. Extraction d'ADN et PCR	66
IV. Séquençage des vecteurs recombinants et analyses bio-informatiques	67
IV.1. Séquençage	67
IV.2. Analyses bioinformatiques	67
V. Analyse des ADNc par RT-PCR	68
VI. Expression de protéines recombinantes chez <i>Escherichia coli</i>	68
VII. Electrophorèse de protéines, Western blot et production d'anticorps	69
VII.1. SDS-PAGE	69
VII.2. Production des anticorps polyclonaux	70
VII.3. Western blot	70
VIII. Immunolocalisation	71
VIII.1. Immunofluorescence indirecte	71
VIII.2. Microscopie électronique à transmission	72
IX. Détection des protéines glycosylées	72
IX.1. Par utilisation de lectines	72
IX.2. Purification sur colonne de Concanavaleine A	73
X. Co-expression chez <i>Escherichia coli</i> BL21-DE3	74
X.1. Clonage des gènes d'intérêt, transformation des bactéries par électroporation	74

X.2. Co-expression des protéines recombinantes	74
X.3. Purification des protéines par chromatographie d'affinité	75
XI. Essais de transfection de la microsporidie <i>E. cuniculi</i>	76
XI.1. Réalisation des constructions plasmidiques	76
XI.2. Stratégies pour les essais de transfusions stables	77
XI.2.1. Création d'une β -tubuline « mutante » résistante à l'albendazole	77
XI.2.2. Résistance à la fumagilline	78
XI.2.3. Complémentation de l'auxotrophie au tryptophane	78
XI.3. Les différentes techniques utilisées	79
XI.3.1. La magnétofection	79
XI.3.2. L'électroporation	79
XI.3.3. La biolistique	80
XI.3.3.1. Liaison de l'ADN aux billes de tungstène	80
XI.3.3.2. Bombardement à l'aide du canon à particules	80
XI.4. Détection des transformants	81
XII. Digestion trypsique et analyse en MALDI-TOF	81
RESULTATS	84
<hr/>	
I. Identification de nouvelles protéines du tube polaire chez différentes espèces microsporidiennes	84
I.1. Protéines de type PTP1, PTP2 et PTP3 chez <i>Antonospora locustae</i> et <i>Paranosema grylli</i> , deux microsporidies parasites d'insectes	84
I.1.1. Mise en évidence de 2 ORFs sur un contig d' <i>A. locustae</i> pouvant correspondre à des gènes de type <i>ptp1</i> et <i>ptp2</i>	84
I.1.2. Les produits des ORF-A et ORF-B sont localisés au niveau du tube polaire d' <i>A. locustae</i>	86
I.1.3. AIPTP1 et AIPTP2 ne sont solubles qu'en présence de fortes concentrations d'agents réducteurs	87
I.1.4. Conservation de la synténie des gènes <i>ptp1</i> et <i>ptp2</i> chez l'espèce microsporidienne <i>Paranosema grylli</i>	88
I.1.5. Analyse comparative des protéines PTP1 et PTP2 chez <i>A. locustae</i> et <i>P. grylli</i>	89
I.1.5.1. PTP1s : des protéines O-mannosylées riches en proline	89
I.1.5.2. PTP2s : des protéines riches en lysine	90
I.1.6. Plusieurs gènes <i>ptp2</i> existent chez <i>A. locustae</i>	91
I.1.7. Mise en évidence de séquences partielles de protéines de type PTP3 chez <i>A. locustae</i>	93

I.2. PTP4 et PTP5, deux nouvelles protéines du tube polaire	95
I.2.1. Identification chez <i>E. cuniculi</i>	95
I.2.1.1. Immunodétection des protéines codées par 07_1090 (EcPTP4) et 07_1080 (EcPTP5)	95
I.2.1.2. Description des protéines EcPTP4 et EcPTP5	96
I.2.2. Identification chez <i>A. locustae</i> et <i>P. grylli</i>	97
I.2.2.1. Immunodétection des protéines AIPTP4 et AIPTP5	97
I.2.2.2. Caractéristiques des protéines AIPTP4 et AIPTP5	98
I.2.2.3. Identification de protéines de type PTP4 et PTP5 chez <i>P. grylli</i>	98
II. Etudes des interactions PTP1-PTP2 et PTP4-PTP5 par co-expression chez <i>E. coli</i>	99
II.1. Les différentes interactions testées	100
II.2. Identification des premières interactions	101
III. Identification de deux protéines de type SWP1 dans la paroi sporale d'<i>Encephalitozoon hellem</i>	103
III.1. Stratégie d'identification des gènes <i>swp</i> chez <i>Encephalitozoon hellem</i>	103
III.2. Principales caractéristiques des protéines SWP1s d' <i>E. hellem</i>	104
III.3. Immunolocalisation des protéines SWP1s	106
III.3.1. Expression de protéines recombinantes chez <i>E. coli</i> et production d'anticorps	106
III.3.2. EhSWP1a et EhSWP1b sont solubles en présence de DTT	106
III.3.3. EhSWP1a et EhSWP1b sont localisées au niveau de l'exospore	107
III.4. Variabilité inter-isolat de la région C-terminale de EhSWP1a et EhSWP1b	108
III.5. Utilisation des protéines SWP1s recombinantes pour des études de diagnostic sérologique	109
IV. Essais de mise au point d'une technique de transfection de la microsporidie <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	109
IV.1. Constructions réalisées pour des essais de transfection transitoire	109
IV.2. Stratégies utilisées pour la mise au point d'une transfection stable	111
IV.2.1. Création une β -tubuline « résistante » à l'albendazole	111
IV.2.2. Résistance à la fumagilline par complémentation avec la MetAP1 d' <i>E. coli</i>	112
IV.2.3. Complémentation de l'auxotrophie au tryptophane	112
IV.3 Les différents essais réalisés	113
IV.3.1. Par électroporation	113
IV.4.1.1. Les différentes conditions testées	114
IV.4.1.2. Analyse des transformants	113
IV.3.2. Par magnétofection	115

DISCUSSION **117****I. Conservation de la synténie entre génomes microsporidiens : un outil pour l'identification de protéines orthologues dont les séquences ont fortement divergées** **117**I.1. Cas des gènes *ptp1* et *ptp2* **117**I.2. La synténie chez les procaryotes et les eucaryotes **118**I.3. Les origines de la conservation de la synténie **119****II. Le tube polaire et ses constituants : analyses comparatives des PTPs et étude des interactions** **122**II.1. Analyse comparative des protéines de type PTP1, PTP2 et PTP3 **123**II.2. PTP4 et PTP4 : deux nouveaux antigènes du tube polaires **125**II.3. Interactions entre les protéines du tube polaire **127**II. 4. Biogenèse du tube polaire **129****III. Rôles potentiels de protéines de paroi et/ou du tube polaire et de résidus glucidiques dans les interactions avec l'hôte et dans la réponse immune** **130**III.1. Les antigènes de l'exospore **131**III.2. Rôle de la glycosylation dans les interactions avec l'hôte **134****IV. Difficultés rencontrées dans la mise au point de la transfection d'*Encephalitozoon cuniculi*** **136**IV.1. Stratégies de transfection utilisées **137**IV.2. Régions génomiques et signaux de transcription **138**IV.3. Stratégies de sélections pour une transfection stable **140**IV.3.1. Résistance à l'albendazole par mutagenèse de la β -tubuline **141**IV.3.2. Résistance à la fumagilline par complémentation avec une MetAP1 **141**IV.3.3. Complémentation à l'auxotrophie au tryptophane **143****CONCLUSION ET PERSPECTIVES** **144****RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES** **148****ANNEXE**

Publication Microsporidian polar tube proteins: highly divergent but closely linked genes encode PTP1 and PTP2 in members of the evolutionarily distant *Antonosporea* and *Encephalitozoon* groups. V. Polonais, G. Prensier, G. Méténier, C.P. Vivarès and F. Delbac. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42 (9), 791-803.

ABREVIATIONS

a : adénine

aa : acides aminés

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

BCIP : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BSA : Bovine Serum Albumine

c : cytosine

CDS : Coding DNA Sequence

dNTP : Désoxynucléotide Triphosphate

DTT : Dithiothréitol

DAPI : 4',6-Diamidino-2-phenylindole

ECL : Electrochemiluminescence

EnP : Endospore Protein

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

g: guanine

GST : Glutathion-S-Transférase

HFF : Human Foreskin Fibroblast

His : histidine

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HSP 70 : Heat shock protein 70

IFA : Immunofluorescent Assay

IPTG : Iso Propyl- β -D Thio-Galactopyranoside

ITS : Intergenic transcribed Spacer

kb : kilobase

kDa : kiloDalton

Mb : mégabase

Mpb : mega paire de base

MDCK : Madin-Darby Canine Kidney

MEM : Milieu Minimum Essentiel

ORF : Open Reading Frame

NBT : Nitro Blue Tetrazolium

Pb : paire de bases

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PTP : Polar Tube Protein

PVDF : Polyvinylidène Difluoride

RT : Reverse Transcripase

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

SVF : Sérum de Veau Foetal

SWP : Spore Wall Protein

t : thymine

TBS : Tris Buffer Saline

TRITC : tetramethylrhodamine isothiocyanate

Introduction

Introduction

Parasites intracellulaires obligatoires, les microsporidies sont des microorganismes apparentés aux champignons capables d'infester un spectre d'hôtes très large allant des invertébrés aux vertébrés et incluant l'Homme. Leur importance médicale a été révélée avec la pandémie du SIDA, ces organismes étant reconnus comme des pathogènes opportunistes majeurs responsables de nombreuses infections chez les individus immunodéprimés. Le nombre croissant de cas de microsporidioses chez des personnes immunocompétentes, suggère que ces pathogènes pourraient être à l'origine de maladies émergentes.

Les microsporidies existent dans l'environnement sous la forme d'une spore qui est caractérisée par la présence d'un appareil invasif original constitué principalement d'une structure tubulaire enroulée dans le cytoplasme, le tube polaire. Sous l'influence de certains stimuli, le tube polaire est capable de se dévagner assurant ainsi le transfert du contenu infectieux, appelé sporoplasme, à l'intérieur de la cellule hôte. La spore est délimitée par une paroi épaisse, riche en chitine et en protéines, qui joue un rôle prépondérant dans la résistance dans l'environnement et qui permet l'augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de la spore à l'origine de la dévagination du tube polaire. Il est également suggéré que l'invasion nécessite des étapes initiales de reconnaissance et d'attachement entre des composants de la paroi et/ou du tube polaire et des récepteurs de l'hôte.

Les données concernant l'organisation moléculaire du tube polaire et de la paroi sporale sont encore très limitées. Au début de ce travail, trois protéines du tube polaire (PTP1, PTP2 et PTP3) avaient été mises en évidence chez *Encephalitozoon cuniculi* et seuls deux antigènes de la paroi étaient décrits. Nos travaux visaient donc à améliorer les connaissances sur la composition moléculaire de ces deux structures impliquées dans l'invasion.

Le travail présenté sera tout d'abord consacré à la mise en évidence de composants du tube polaire : la conservation de la synténie des gènes entre génomes microsporidiens nous a

permis d'identifier des orthologues des gènes *ptp1* et *ptp2* chez *Antonospora locustae*, microsporidie parasite de criquets. Les séquences complètes de ces gènes ont également été caractérisées chez *Paranosema grylli*, une autre microsporidie parasite d'insectes.

L'exploitation des données du protéome d'*E. cuniculi* a ensuite permis d'identifier deux nouvelles protéines du tube polaire, nommées PTP4 et PTP5, dont les gènes sont organisés en tandem sur le chromosome VII. Cette organisation des gènes est conservée chez les deux microsporidies parasites d'insectes *A. locustae* et *P. grylli*. Enfin, dans le but d'apporter des informations sur l'architecture du tube polaire, des études d'interactions entre certaines PTPs ont été réalisées par des approches de co-expression chez *E. coli*.

SWP1 est la seule protéine de l'exospore décrite chez *E. cuniculi*. Deux protéines de la même famille ont également été identifiées chez *E. intestinalis*. Nous présenterons la stratégie utilisée pour la mise en évidence de deux orthologues de SWP1 chez *E. hellem*, la troisième espèce du genre *Encephalitozoon*. Nous montrerons que la variabilité des extrémités C-terminales de ces protéines est d'intérêt dans le cadre d'études épidémiologiques.

Le dernier volet de ce travail sera consacré à la description des stratégies utilisées pour la mise au point d'une technique de transfection d'*E. cuniculi* qui pourrait permettre, dans l'avenir, des études fonctionnelles par génétique inverse.

Etude bibliographique

Etude bibliographique

I. Les microsporidies

Le Phylum Microspora regroupe de petits eucaryotes unicellulaires dont plus de 1200 espèces réparties en 143 genres ont été répertoriées (**Vavra et Larsson, 1999**). Ces parasites intracellulaires obligatoires, capables de former des spores très résistantes, ont été découverts au XIXème en tant qu'agents étiologiques de la pébrine, épizootie qui dévasta les élevages de vers à soie en Europe. L'agent pathogène incriminé, *Nosema bombycis*, fut identifié par Nägeli en 1857 mais assimilé dans un premier temps à une levure.

Ces parasites ubiquitaires infectent de très nombreux eucaryotes allant des protistes à l'Homme avec une préférence non négligeable pour les invertébrés. Bien que les microsporidies soient retrouvées de façon courante chez les arthropodes et les poissons, à l'origine de pertes économiques importantes en apiculture et en aquaculture, certaines espèces infectant l'Homme et les animaux présentent une importance médicale et vétérinaire significative (**Didier, 2005**). La première microsporidie parasite de mammifères fut isolée en 1922 au niveau du cerveau d'un lapin présentant une encéphalite granulomateuse : elle fut nommée *Encephalitozoon cuniculi* (**Levaditi et al., 1923**). Cette espèce a depuis été décrite chez des rongeurs et de nombreux mammifères dont l'Homme (**Didier, 2005**).

Le premier cas de microsporidiose humaine a été rapporté en 1959 chez un enfant japonais de 9 ans souffrant de désordres neurologiques (**Matsubayashi et al., 1959**). Les microsporidies furent cependant très peu étudiées avant 1985 et la pandémie de SIDA. Ces parasites sont en effet désormais reconnus comme des agents responsables d'infections opportunistes chez les patients immunodéprimés (**Desportes, 1985 ; Didier, 1998**). Cependant, des études sérologiques montrent, au sein d'une population européenne, une prévalence de 8% chez des sujets immunocompétents et de 5% chez des femmes enceintes (**van Gool et al., 1997**) suggérant que les microsporidioses sont communes dans la population

humaine bien qu'elles soient la plupart du temps asymptomatiques. La question de l'existence d'un réservoir animal et de porteurs sains reste posée.

Malgré leur très grande diversité (large spectre d'hôtes, morphologie, cycle de développement...), les microsporidies possèdent un mécanisme d'invasion unique dans le monde vivant faisant intervenir une structure très spécialisée appelée le tube polaire. Un autre intérêt d'étude de ces microorganismes est la présence, pour certaines espèces, d'un génome nucléaire de taille extrêmement réduite. C'est le cas d'*Encephalitozoon cuniculi* dont le génome de 2,9 Mpb a été entièrement séquencé (**Katinka et al., 2001**).

I.1. Origine phylogénétique

Les microsporidies sont des pathogènes intracellulaires obligatoires dont l'origine phylogénétique a été longtemps controversée. Plusieurs éléments suggéraient une origine primitive de ces microorganismes parmi les Archezoa (**Cavalier-Smith, 1987**) :

✓ l'absence d'organites quasi universels chez les eucaryotes comme les mitochondries ou les peroxyosomes.

✓ les caractéristiques procaryotiques des ribosomes : d'une taille de 70S, ils sont formés d'ARNr 16S et 23S (**Ishihara et Hayashi, 1968 ; Curgy et al., 1980**).

✓ la présence d'un appareil de golgi atypique sans dictyosomes.

Cette émergence à la base de l'arbre phylogénétique des eucaryotes a été appuyée par les premières études de phylogénie moléculaire basées sur les gènes codant les ARNr et les facteurs d'élongation de la traduction EF-1 α et EF-2 (**Vossbrinck et Woese, 1986 ; Vossbrinck et al., 1987 ; Kamaishi et al., 1996**). Cependant, l'identification dans le génome nucléaire de plusieurs espèces microsporidiennes de gènes codant pour des protéines HSP 70 mitochondriales permet d'envisager une perte secondaire des mitochondries (**Germot et al., 1997 ; Hirt et al., 1997 ; Peyretailade et al., 1998**). De plus, l'analyse phylogénétique de

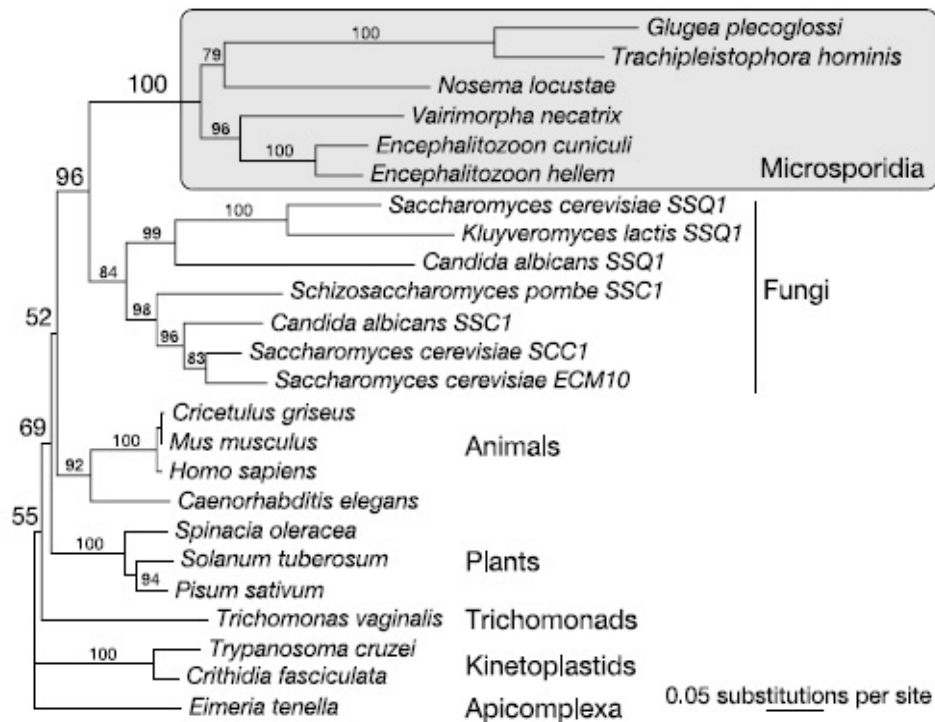


Figure 1. Phylogénie basée sur la séquence du gène codant pour une protéine HSP70 mitochondriale. Ces données montrent une apparition tardive des microsporidies après l'endosymbiose mitochondriale et suggère que ces micro-organismes sont apparentés aux champignons (d'après Williams *et al.*, 2002).

gènes codant pour les tubulines α et β , la grande sous-unité de l'ARN polymérase II ou une HSP 70 mitochondriale laisse supposer une apparition plus tardive (**Fig. 1, Hirt et al., 1999 ; Fast et al., 1999 ; Keeling et Fast, 2002, Williams et al., 2002**). Ces différentes données, complétées par le séquençage du génome d'*Encephalitozoon cuniculi* (**Katinka et al., 2001**), permettent désormais de considérer les microsporidies comme des organismes apparentés aux champignons (**Thomarat et al., 2004**). Une autre caractéristique rapprochant les microsporidies des champignons est l'existence de deux gènes indépendants codant la thymidilate synthase (TS) et la dihydrofolate réductase (DHFR, **Duffieux et al., 1998**). Ces analyses phylogénétiques sont aussi en accord avec des caractères physiologiques retrouvés chez les champignons : présence de tréhalose et de chitine dans la spore (**van Gool et al., 1993 ; Undeen et Van der Meer, 1994**), appariement des noyaux en diplocaryons chez certains genres microsporidiens, mitoses fermées avec présence de plaques polaires (**Vivarès et al., 1977**). Enfin, l'identification récente d'une catalase, marqueur enzymatique des peroxyosomes, chez *Antonospora locustae* (**Fast et al., 2003**) et la mise en évidence d'un organelle cryptique appelé mitosome chez *Trachipleistophora hominis* (**Williams et al., 2002**) confirment l'hypothèse d'une apparition tardive des microsporidies après l'endosymbiose mitochondriale.

Les phylogénies moléculaires contradictoires obtenues chez les microsporidies peuvent s'expliquer par une rapide évolution des gènes codant les ARNr créant un phénomène d'attraction des longues branches, à l'origine d'un arbre phylogénétique artéfactuel (**van de Peer et al., 2000**). La relation exacte entre les microsporidies et les champignons mérite maintenant d'être clarifiée. Alors que l'analyse des gènes codant les tubulines α et β montre une émergence parmi les Zygomycètes, une étude récente de 8 gènes place les microsporidies dans le cluster des champignons en tant qu'organismes apparentés aux Ascomycètes et Basidiomycètes (**Keeling, 2003 ; Gill et Fast, 2006**).

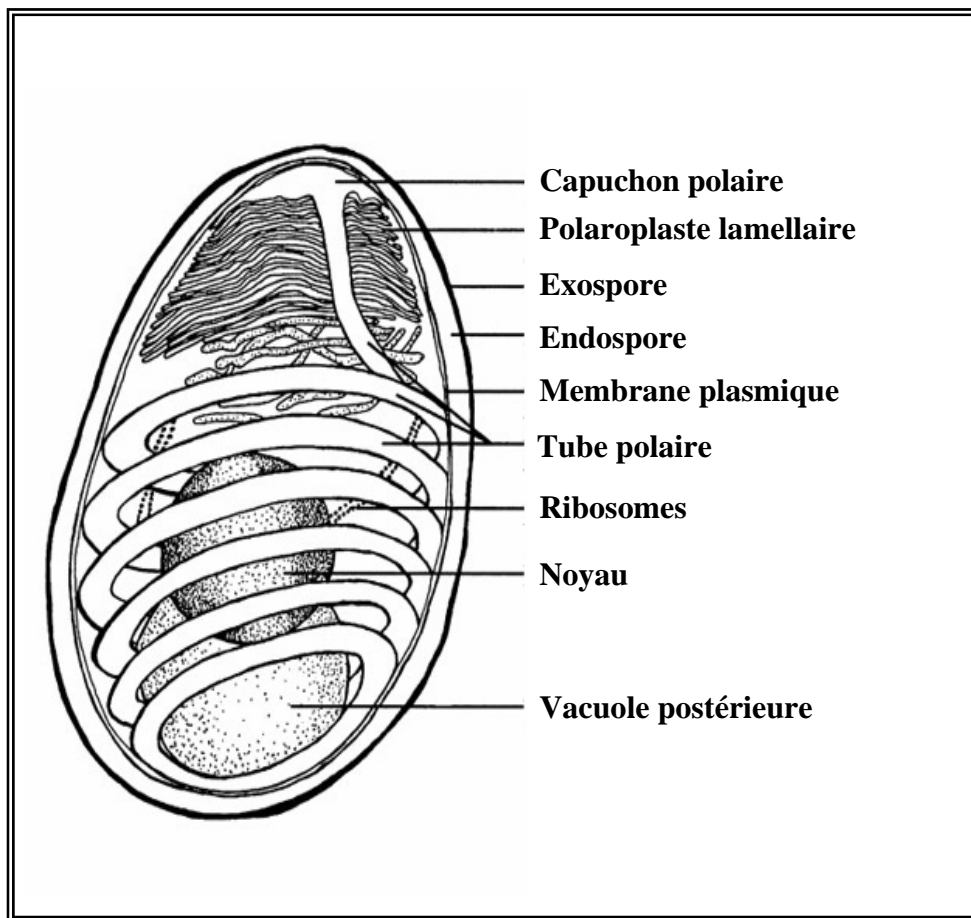


Figure 2. Représentation schématique de la structure d'une spore microsporidienne (d'après Franzen et Müller, 1999).

I.2. Structure de la spore microsporidienne

Le stade extracellulaire infectieux des microsporidies est une spore de petite taille (1 à 20 μm selon les espèces) délimitée par une paroi épaisse. Elle renferme le contenu de la spore qui peut être divisé en deux parties distinctes: le sporoplasme et l'appareil invasif (**Fig. 2**).

I.2.1. Le sporoplasme : élément infectieux

Le contenu de la spore est défini sous le terme de sporoplasme. On parle aussi d'élément infectieux car c'est lui qui sera déversé dans le cytoplasme de la cellule hôte lors de l'invasion. Le sporoplasme renferme l'appareil nucléaire, de nombreux ribosomes et du réticulum endoplasmique (RE). Chez les microsporidies, deux types de conformations nucléaires existent selon les espèces : monocaryotique (un seul noyau) ou diplocaryotique avec deux noyaux accolés qui se divisent de façon synchrone pour former un diplocaryon (**Vavra, 1976**).

Les ribosomes présentent les caractéristiques des ribosomes procaryotes à savoir un coefficient de sédimentation de 70S (**Ishihara et Hayashi, 1968**), des ARNr 16S et 23S (**Curgy et al., 1980**) et une association des séquences des ARNr 23S et 5,8S (**Vossbrinck et Woese, 1986**). Composant majoritaire du cytoplasme microsporidien, leur présence met en évidence un niveau important de synthèse protéique. Dans les premiers stades de développement, les ribosomes sont libres dans le cytoplasme. Au cours de la sporogonie, ils sont majoritairement retrouvés attachés aux membranes du RE. Des vésicules entourées d'une simple membrane et dépourvues de ribosomes sont également identifiées : elles pourraient correspondre à du RE lisse ou à des vésicules d'endocytose ou d'exocytose (**Vavra et Larsson, 1999**).

La présence de nombreuses vésicules opaques aux électrons, entourées d'une seule membrane et organisées en réseau dans le cytoplasme de stades pré-sporaux laisse penser à un

appareil de Golgi de structure atypique sans saccules (**Vavra, 1965**). Des études cytochimiques révèlent en effet, au niveau de structures vésiculaires et tubulaires, la présence de marqueurs des compartiments *cis* et *trans*-golgien : dépôt d'osmium, activités thiamine pyrophosphatase et nucléoside diphosphatase (**Takvorian et Cali, 1994 et 1996 ; Sokolova et al., 2001**). Cependant, la présence de dictyosomes chez les microsporidies n'a pas encore été décrite.

Bien que le cytoplasme des microsporidies soit dépourvu de mitochondries et de peroxyosomes, une étude récente a permis d'identifier chez *Trachipleistophora hominis* des organelles entourés d'une double membrane (mitosomes) à l'aide d'anticorps dirigés contre une protéine HSP70 de type mitochondrial (**Williams et al., 2002**). De plus, chez *Antonospora locustae*, le gène codant une catalase, marqueur enzymatique des peroxyosomes, a été caractérisé et serait issu d'un transfert latéral entre une α -protéobactérie et *A. locustae* (**Fast et al., 2003**). La localisation de cette catalase n'a cependant pas été réalisée.

I.2.2. L'appareil invasif

Bien que les microsporidies présentent des spécificités d'hôtes très différentes, elles sont caractérisées par un même mécanisme d'invasion. Ce processus, unique dans le monde vivant, implique l'extrusion brutale du tube polaire qui reste attaché au pôle antérieur de la spore et peut aller « transpercer » la membrane de la cellule hôte pour délivrer le sporoplasme infectieux dans le cytoplasme de cette cellule (**Franzen, 2005**). Cet appareil d'invasion original est constitué de quatre éléments : le disque d'ancrage ou capuchon polaire, le polaroplaste lamellaire et vésiculaire, le tube polaire et une vacuole postérieure (**Fig. 2**).

1.2.2.1. Le disque d'ancrage

Le disque d'ancrage ou capuchon polaire est situé au pôle apical de la spore au niveau d'un amincissement l'endospore d'où le tube polaire sera éjecté. Il est constitué de deux éléments : le sac polaire, structure vésiculaire dense aux électrons dans laquelle le tube polaire entre et le disque d'ancrage situé au centre du sac polaire au niveau duquel le tube polaire est connecté.

1.2.2.2. Le polaroplaste

Ce système membranaire situé dans la partie antérieure de la spore est très volumineux et peut occuper jusqu'aux 2/3 du volume sporal. On distingue généralement une région antérieure appelée polaroplaste lamellaire et une région postérieure, le polaroplaste vésiculaire. Le polaroplaste lamellaire est caractérisé par un empilement régulier de saccules très aplatis parallèles les uns aux autres entourant le manubrium, partie rectiligne du tube polaire dont l'extrémité est connectée au disque d'ancrage. Lors de la germination (extrusion du tube polaire) et du passage du sporoplasme dans le tube polaire, le polaroplaste lamellaire serait transféré pour former la membrane limitante du sporoplasme libéré à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte (**Weidner *et al.*, 1984**). Le polaroplaste vésiculaire est marqué par des tubules au contenu dense. Son origine (différenciation terminale de l'appareil de Golgi) ainsi que sa mise en place restent à étudier.

1.2.2.3. La vacuole postérieure

Une vacuole délimitée par une membrane et présentant un contenu clair aux électrons est localisée au pôle basal de la spore (**Vinckier *et al.*, 1993**). La taille de cette vacuole postérieure est variable selon les espèces et peut être absente dans certains cas. Sa formation à partir de vésicules golgiennes a lieu tardivement après la mise en place du tube polaire au cours de la sporogonie (**Canning et Lom, 1986**). Son gonflement interviendrait dans les processus d'extrusion du tube polaire et de transfert du sporoplasme.

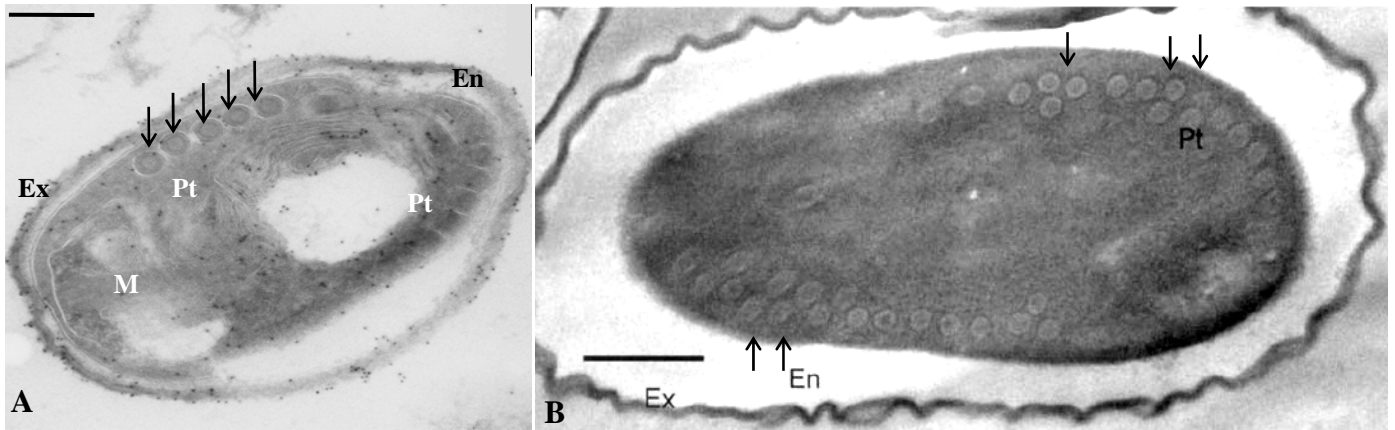


Figure 3. La partie postérieure du tube polaire peut être enroulée en une ou deux couches à l'intérieur de la spore. (A) Chez *Encephalitozoon hellem*, le tube polaire est enroulé en 5 spires organisées en une seule couche (flèches). Echelle : 0,2 μm (cliché personnel). (B) Coupe d'une spore d'*Antonospora locustae* montrant les spires du tube polaire organisées en deux couches (flèches). Echelle : 0,5 μm . (C) Image montrant une organisation en deux couches du tube polaire d'*A. locustae*. Echelle 100 nm (d'après Slamovits *et al.*, 2004). Pt : tube polaire; M : manubrium; Ex : exospore; En : endospore.

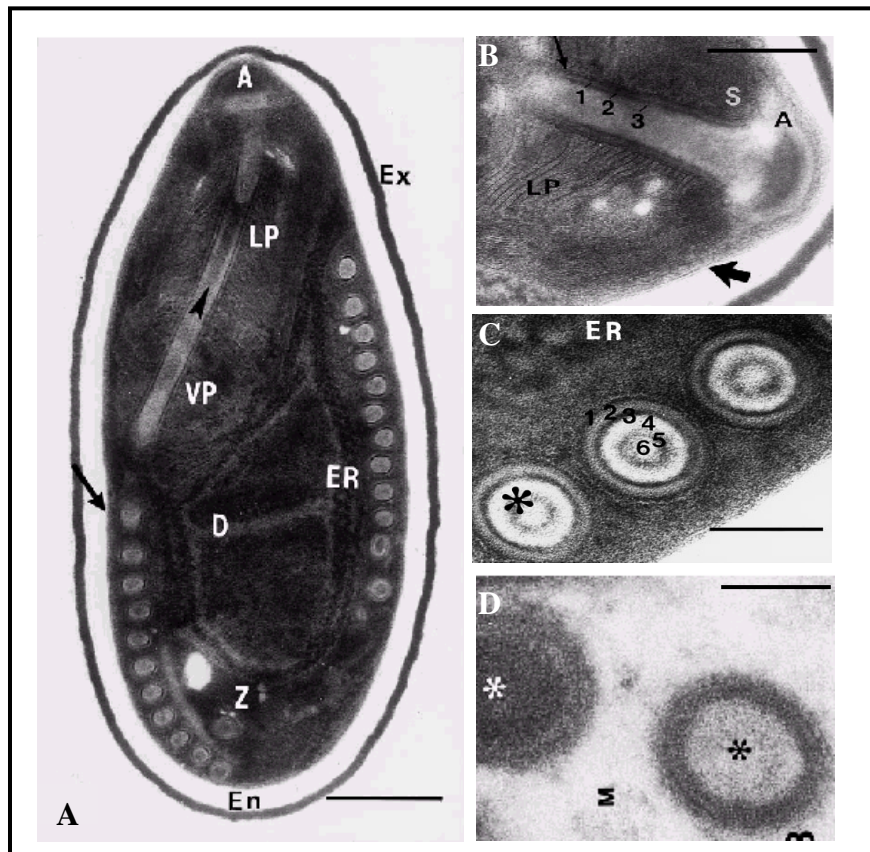


Figure 4. Changements morphologiques du tube polaire chez *Brachiola algerae* au cours du processus de dévagination. (A) Coupe longitudinale d'une spore de *B. algerae* montrant le disque d'ancrage (A), le diplocaryon (D), l'endospore (En), l'exospore (Ex), le réticulum endoplasmique (ER), le polaroplaste lamellaire (LP), le polaroplaste vésiculaire (VP), la membrane plasmique (flèche), le tube polaire (flèche épaisse) et une zone dense postérieure (Z). Echelle : 0,4 μm . (B). Section longitudinale du manubrium ne présentant que 3 couches. S : accumulation de membranes du polaroplaste. Echelle : 0,18 μm . (C) Sections du tube polaire enroulé dans la spore (astérisque) montrant les six couches concentriques. Echelle : 0,18 μm . (D). Sections de tube polaire après dévagination dans le milieu extérieur (M) où trois couches peuvent être distinguées. Echelle : 0,04 μm (d'après Chioralia *et al.*, 1998).

1.2.2.4. Le tube polaire ou filament polaire

Elément principal de l'appareil d'invasion, le tube polaire intervient dans le transfert du sporoplasme infectieux vers la cellule hôte au cours d'un processus appelé dévagination ou extrusion. Deux parties peuvent être distinguées :

- ✓ une partie antérieure rectiligne ou manubrium entourée par le polaroplaste lamellaire et connectée au disque d'ancrage au pôle antérieur de la spore.
- ✓ une partie postérieure enroulée à la périphérie de la spore autour du sporoplasme dont le nombre de tours de spires variable (de 4 à 30) est un critère de taxonomie. Chez *Encephalitozoon*, 5 à 7 tours de spires sont observés (**Fig. 3A**). Chez *Antonospora locustae* et *Paranosema grylli*, le tube polaire, organisé en une ou deux couches, présente respectivement 15 à 18 et 18 à 20 tours de spires (**Fig. 3B, Slamovits et al., 2003 ; Sokolova et al., 2003**).

Le tube polaire enroulé à l'intérieur de la spore est délimité par une membrane et semble être constitué de plusieurs couches concentriques denses ou claires aux électrons organisées autour d'un corps central (**Canning et al., 1992 ; Chioralia et al., 1998**). Chez l'espèce *Brachiola algerae*, des changements ultrastructuraux du tube polaire ont été mis en évidence avant, pendant et après dévagination (**Fig. 4**) : trois couches de densités différentes aux électrons sont en effet observées au niveau des tubes polaires dévaginés et du manubrium (**Fig. 4B-D**) alors que la partie enroulée en spirale présente six couches concentriques (**Fig. 4C, Chioralia et al., 1998**). La présence de six couches concentriques pourrait être due à un repliement du tube polaire sur lui-même dans la partie postérieure enroulée en accord avec le fait que la longueur du tube polaire, variable selon l'espèce considérée (de 50 μm à 100 μm), peut atteindre 3 à 4 fois la longueur intrasporale après extrusion (**Weidner, 1972**). Une incorporation de protéines à l'extrémité croissante du tube polaire lors de la germination pourrait aussi expliquer la différence de taille entre le tube intrasporal et le tube dévaginé (**Weidner, 1982**).

Le diamètre du tube polaire est aussi fonction de l'espèce (de 0,1 à 0,15 μm), celui de la section enroulée étant constant et inférieur à celui du manubrium. Le tube polaire présente une certaine élasticité, son diamètre pouvant varier de 0,1 à 0,25 μm lors de la dévagination et atteindre 0,4 μm lors du passage du sporoplasme (**Frixione et al., 1992**).

I.2.3. La paroi

Epaisse et rigide, la paroi est mise en place très tôt au cours du cycle de développement. Elle protège le sporoplasme contre les stress environnementaux permettant notamment la survie des parasites après leur libération des cellules hôtes. La rigidité de la paroi permet également de maintenir une pression hydrostatique élevée et sa perméabilité aqueuse joue un rôle dans l'extrusion du tube polaire (**Frixione et al., 1997**). Certains constituants localisés à la surface de la paroi sporale pourraient aussi être impliqués dans le processus d'initiation de l'invasion, en interagissant avec des récepteurs cellulaires (**Bohne et al., 2000**).

De nature protéo-chitineuse, la paroi est constituée de deux couches intimement liées recouvrant une membrane plasmique : la couche la plus externe est appelée exospore, la plus interne étant l'endospore. L'endospore repose sur une membrane plasmique qui délimite le sporoplasme et reste dans la spore après dévagination. En effet, le réseau de l'endospore rend la membrane plasmique solidaire de la paroi ce qui explique qu'elle reste associée à la paroi de la spore « vide », après dévagination et expulsion du sporoplasme. Le sporoplasme libéré possède alors une nouvelle membrane plasmique probablement dérivée des membranes du polaroplaste lamellaire (**Weidner et al., 1984**).

I.2.3.1. L'exospore

D'épaisseur variable (15 à 100 nm), l'exospore est une région dense aux électrons constituée principalement de glycoprotéines (**Vavra, 1976 ; Vivarès et al., 1976**). Une analyse fine de la paroi d'*E. hellem* en cryodécoupage montre que l'exospore peut être

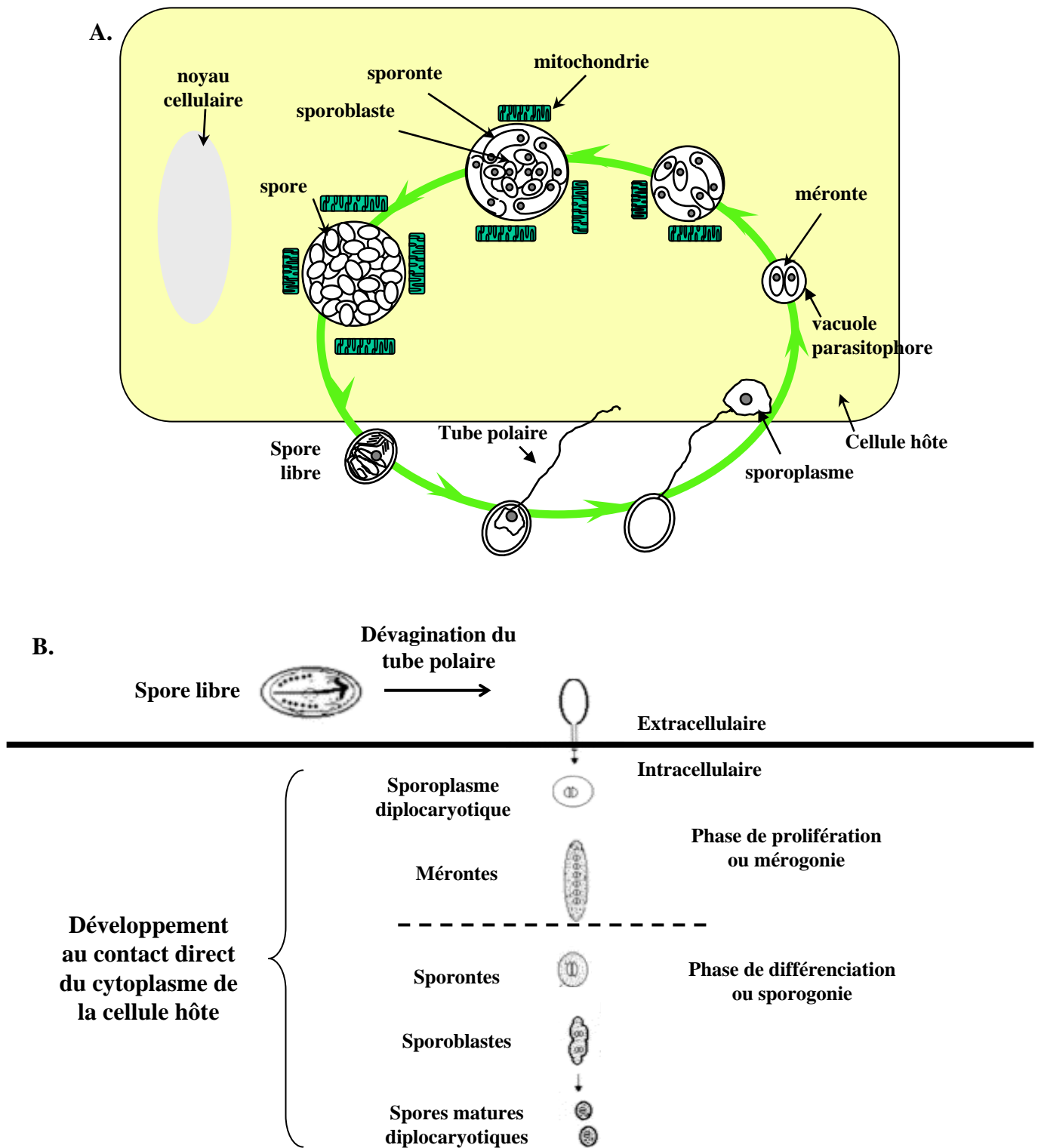


Figure 5. Cycle de développement des microsporidies. (A) Cycle de développement du genre *Encephalitozoon*. La spore extracellulaire libère son sporoplasme infectieux dans le cytoplasme de la cellule hôte *via* le tube polaire « dévaginé » pour initier un nouveau cycle. Ce cycle se déroule au sein d'une vacuole parasitophore à proximité des mitochondries de l'hôte. (B) Cycle de développement des microsporidies des genres *Antonospora* et *Paranoosema*. Après extrusion du tube polaire, le sporoplasme se développe directement au contact du cytoplasme sans vacuole parasitophore. Les mérontes se divisent par fissions binaires puis les sporontes subissent une division binaire pour donner deux sporoblastes (modifié d'après Weiss, 2001).

subdivisée en trois couches de nature, de structure et de densité différentes qui sont intimement liées (**Bigliardi et al., 1996**). La couche la plus interne présente un enchevêtrement de fibres sur lesquelles repose une lamina intermédiaire claire aux électrons constituée de fibrilles agencées parallèlement et formant une couche d'aspect strié. Enfin, la couche la plus externe est composée de blocs épineux.

1.2.3.2. L'endospore

L'endospore, plus épaisse, est une couche claire aux électrons sans organisation apparente constituée de chitine et de protéines (**Bigliardi et Sacchi, 2001**). Elle recouvre la spore avec une épaisseur constante de 100 nm mais présente une épaisseur réduite au pôle antérieur de la spore au niveau duquel aura lieu l'extrusion du tube polaire (**Chioralia et al., 1998**). Elle est riche en polysaccharides et la chitine est l'un des composants majeurs (**Vavra, 1976 ; van Gool et al., 1993**). Une analyse de l'endospore d'*E. hellem* par cryofracture et cryodécapage montre qu'elle est en réalité un espace parcouru par des ponts ou des connections de fibrilles s'étendant entre l'exospore et la membrane plasmique (**Bigliardi et al., 1996**). Ces filaments seraient des molécules d' α -chitine interconnectées entre eux *via* des résidus de β -chitine ou d'autres protéines permettant de former un réseau.

I.3. Cycle de développement :

Il existe une grande diversité des cycles de développement chez les microsporidies. Dans tous les cas, trois grandes phases caractéristiques peuvent être distinguées (**Fig. 5A et 5B**) : une phase d'invasion, une phase de multiplication intensive ou mérogonie et une phase de différenciation comprenant la sporogonie et la sporogénèse.

✓ la phase **d'invasion** débute par l'extrusion brutale du tube polaire (moins de 2 s) sous l'influence de stimuli encore mal définis, qui permet le transfert du sporoplasme vers le cytoplasme de la cellule hôte (**Lom et Vavra, 1963**).

✓ La seconde partie du cycle intracellulaire correspond à une phase de **multiplication** ou **mérogonie**. De forme allongée, les mérontes sont délimités par une membrane plasmique, et comportent, selon l'espèce considérée, un ou deux noyaux. Leur cytoplasme contient de nombreux ribosomes et des structures membranaires assimilées au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi. Ils se divisent soit par fission binaire (*Encephalitozoon*, *Nosema*) soit par scissions multiples au sein d'un plasmode végétatif plurinucléé (*Pleistophora*, *Enterocytozoon*) (Cali et Takvorian, 1999). Les microsporidies du genre *Encephalitozoon* réalisent leur cycle de développement au sein d'une vacuole parasitophore dont l'origine semble être la membrane plasmique de la cellule hôte (Fig. 5A, Magaud *et al.*, 1997 ; Foucault et Drancourt, 2000). Pour les autres genres microsporidiens, le cycle de développement a lieu au contact direct du cytoplasme de la cellule hôte (Fig. 5B).

✓ La troisième phase est une phase de **différenciation** comprenant la **sporogonie** et la **sporogénèse**. La **sporogonie** commence lorsque les mérontes se transforment en sporontes. Les sporontes sont caractérisés par le dépôt de matériel dense aux électrons sur la membrane plasmique évoquant la future exospore. Ils subissent alors soit une division binaire pour donner directement deux sporoblastes (*Encephalitozoon*, *Nosema*), soit deux divisions successives conduisant à quatre sporoblastes (*Septata*), soit une série de divisions multiples à l'origine de l'élargissement de la cellule appelée alors plasmode sporogonial (*Pleistophora*). A partir de cette cellule multinucléée, plus de 100 spores pourront être produites.

La **sporogénèse**, maturation des sporoblastes en spores, est associée à la formation de la paroi sporale et à la différenciation de l'appareil invasif (tube polaire, capuchon polaire, polaroplaste et vacuole postérieure). Les sporoblastes diminuent en taille. Leur cytoplasme devient plus dense aux électrons et plus complexe en raison d'une production importante de ribosomes, de l'élargissement de l'appareil de Golgi mais aussi en raison de la présence de nombreux corps denses aux électrons impliqués dans la construction du tube polaire. Après

maturation des sporoblastes en spores, celles-ci sont libérées dans l'environnement par éclatement des cellules hôtes.

I.4. Transmission

Malgré l'absence de données épidémiologiques concernant la source de contamination, deux modes de transmission des microsporidies ont été démontrés : (i), une transmission horizontale par ingestion directe de spores présentes dans l'environnement et (ii), une transmission verticale, définie comme étant le transfert direct de l'infection des parents à leur progéniture.

I.4.1. La transmission horizontale

Ce mode de transmission est le plus fréquent. La contamination de l'environnement se fait par libération des spores *via* les fèces, les produits d'excrétions ou la mort de l'hôte. L'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés donne alors lieu à une contamination. Des études ont révélé la présence de spores d'*Enterocytozoon bienewisi* dans différents échantillons d'eau montrant qu'il existe un réservoir environnemental (**Dowd *et al.*, 1998**). Une étude récente montre que des oiseaux aquatiques (cygnes, canards sauvages, ...) constituent un réservoir d'espèces microsporidiennes (*E. hellem*, *E. intestinalis*) capables d'infester l'Homme (**Slodkiewicz-Kowalska *et al.*, 2006**).

L'inoculation par voie orale de spores d'*E. cuniculi* d'origine humaine à des lapins provoque le développement d'une infection, suggérant une possible transmission orale du parasite entre différents hôtes et une possibilité d'infection croisée entre l'Homme et le lapin (**Mathis *et al.*, 1997**). Une transmission zoonotique d'*E. hellem* est également évoquée (**Mathis *et al.*, 1999**). Enfin, une transmission horizontale est également suggérée au sein des

Espèces microsporidiennes	Manifestations cliniques
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Diarrhées, cholangites, cholécystites, pneumonies, bronchites, sinusites, rhinites
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Diarrhées, cholangites, cholécystites, néphrites, infections urinaires, pneumonies, sinusites, rhinites, kératoconjonctivites, infections disséminées
<i>Encephalitozoon hellem</i> ⁽¹⁾	Kératoconjonctivites, pneumonies, sinusites, rhinites, bronchites, néphrites, urétrites, prostatites, cystites, infections disséminées
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Hépatites, péritonites, encéphalites, infections intestinales, infections urinaires, kératoconjonctivites, sinusites, rhinites, infections disséminées.
<i>Trachipleistophora hominis</i> ⁽¹⁾	Infections musculaires, kératoconjonctivites, sinusites, rhinites
<i>Trachipleistophora anthropophthera</i> ⁽¹⁾	Encéphalites, infections musculaires, infections disséminées
<i>Pleistophora</i> spp.	Infections musculaires
<i>Vittaforma cornae</i> ⁽²⁾	Kératites, infections urinaires
<i>Nosema ocularum</i> ⁽²⁾	Kératoconjonctivites
<i>Brachiola connori</i> ⁽²⁾	Infections disséminées
<i>Brachiola vesicularum</i> ⁽¹⁾	Infections musculaires
<i>Brachiola algerae</i>	Kératoconjonctivites
<i>Microsporidium africanum</i> ⁽²⁾	Infections oculaires
<i>Microsporidium ceylonensis</i> ⁽²⁾	Infections oculaires

Tableau 1. Microsporidioses humaines et manifestations cliniques (d'après Franzen et Müller, 2001). Les espèces (1) n'ont été mises en évidence que chez des patients atteints de SIDA et les espèces (2) n'ont été identifiées que chez des individus immunocompétents.

systèmes hôte-parasites-hyperparasites dans lesquels les spores infectant les hyperparasites peuvent rejoindre d'autres parasites par l'intermédiaire de l'hôte (**Vivarès, 2001**).

De plus, la transmission directe d'insecte à insecte par voie orale est mise en évidence dans des phénomènes de cannibalisme d'insectes infestés faibles et moribonds ou de cadavres infestés. C'est le premier mode de transmission d'*Antonospora locustae* dans les populations de criquets et de sauterelles : il a été mis à profit pour réduire l'invasion des criquets aux Etats-Unis en mélangeant de la nourriture avec des spores d'*A. locustae* (**Lomer et al., 2001**).

I.4.2. La transmission verticale

Ce mode de transmission est principalement décrit chez les invertébrés. La contamination des œufs peut avoir lieu soit à leur surface, soit en raison d'ovaires contaminés, les parasites étant alors présents directement dans le cytoplasme de l'œuf. Ce mode de transmission permet d'assurer une propagation de génération en génération mais nécessite des adaptations du parasite lui permettant d'assurer sa survie en minimisant les effets pathogènes sur son hôte (**Dunn et al., 2001**). Une transmission transplacentaire d'*E. cuniculi* a été décrite provoquant une forte mortalité chez certains mammifères (**Hunt et al., 1972 ; Snowden et Shadduck, 1999**).

I.5. Les microsporidioses humaines

La majorité des cas de microsporidioses recensés concernent des sujets immunodéprimés. Sept genres de microsporidies sont pathogènes chez l'Homme et provoquent des pathologies diverses pouvant conduire à la mort (**Tableau 1**). Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Enterocytozoon bienewisi* et celles appartenant au genre *Encephalitozoon*.

I.5.1. Diagnostic

Les microsporidioses humaines sont mises en évidence par la présence de spores dans des échantillons cliniques (fèces, biopsies...) en utilisant des techniques de coloration, d'immunomarquages ou par des approches moléculaires. Des méthodes de sérodiagnostic ont également été mises au point.

I.5.1.1. Les colorations

Les colorations sont des techniques simples, rapides mais qui ne permettent pas d'identifier précisément l'espèce microsporidienne. De plus, il est difficile de discriminer de façon certaine les spores microsporidiennes des bactéries ou des levures. Les colorations les plus fréquemment utilisées sont le Trichrome modifié (**Weber *et al.*, 1992**), le Calcofluor White M2R (**Vavra *et al.*, 1993**) ou l'Unitex 2B (**van Gool *et al.*, 1993**), ces deux derniers réactifs étant des fluorochromes spécifiques de la chitine, composant de la paroi sporale.

I.5.1.2. L'immunofluorescence indirecte

Cette méthode de diagnostic s'est développée du fait de l'obtention de nombreux anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre différentes espèces microsporidiennes. Certains anticorps sont spécifiques du genre (cas du genre *Encephalitozoon*, **Enriquez *et al.*, 1997**) mais une identification plus précise de l'espèce peut être obtenue grâce à l'utilisation d'anticorps spécifique d'une espèce donnée (**Moura *et al.*, 1999**).

I.5.1.3. Les techniques moléculaires

Plus sensibles et plus spécifiques, ces techniques reposent principalement sur l'amplification du gène d'ADNr de la petite sous-unité ribosomique. L'utilisation d'amorces situées dans des régions conservées de l'ADNr 16S permet l'amplification de différentes espèces microsporidiennes. L'identification précise de l'espèce nécessite souvent l'utilisation d'une enzyme de restriction après amplification PCR (**Delbac et Vivarès, 1997**). Une

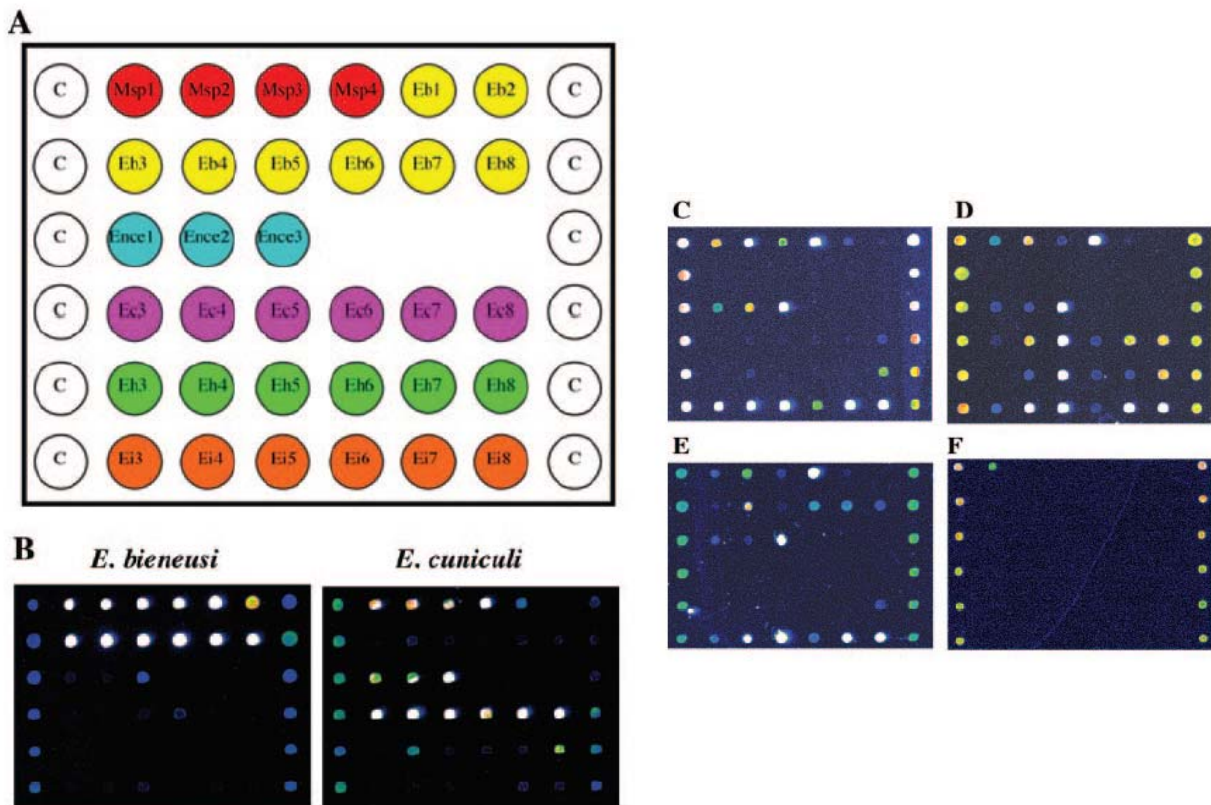


Figure 6. Diagnostic des microsporidioses humaines par la technique des biopuces à ADN. (A) Schéma de la puce utilisée. Les sondes notées Msp sont des sondes ADNr 16S universelles. Sont ensuite déposées des sondes spécifiques de *E. bienewisi* (Eb1 à Eb8), des sondes génériques du genre *Encephalitozoon* (Ence1 à Ence3) et enfin des sondes spécifiques de chaque espèce du genre *Encephalitozoon* (Ec, Ei, Eh). Les spots situés aux extrémités gauches et droites (C) sont des contrôles internes positifs. (B) Validation de la spécificité des sondes en utilisant de l'ADN des souches de référence d'*Enterocytozoon bienewisi* et *E. cuniculi*. C à F : échantillons d'ADN extraits de selles de patients hybridés sur la puce après amplification du gène de la petite sous unité d'ADNr. (C) Patient infecté par *E. intestinalis*. (D) Echantillon de patient infecté par les trois espèces du genre *Encephalitozoon* : *E. cuniculi*, *E. intestinalis* et *E. hellem*. (E) Co-infestation par *E. bienewisi* et *E. intestinalis*. (F) Patient négatif (d'après Wang *et al.*, 2005).

amplification avec des amorces spécifiques d'espèces peut également être envisagée (**Franzen et al., 1995; da Silva et al., 1996**).

L'amplification de l'espaceur interne transcrit (ITS1) localisé entre le 16S et le 5,8S (**Didier et al., 1995**) ou de séquences de gènes codant pour des protéines de la paroi ou du tube polaire (**Xiao et al., 2001 ; Peuvel et al., 2000**) peut aussi être utile pour identifier précisément différents isolats appartenant à une même espèce microsporidienne.

Récemment, le développement d'une biopuce ADN a permis, de façon simultanée, la détection et l'identification des quatre espèces microsporidiennes (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*). Sur la puce sont fixés des oligonucléotides génériques de microsporidies ainsi que des oligonucléotides spécifiques de genre et d'espèce d'une taille de 25 mers (**Fig. 6**). Des amplifications PCR à l'aide d'amorces universelles de l'ADNr 16S sont réalisées à partir des échantillons de patients. La mise en évidence d'une hybridation avec les oligonucléotides cibles permet de caractériser la présence de microsporidies dans les échantillons de patients (**Wang et al., 2005**).

I.5.1.4. Le sérodiagnostic

Cette technique de diagnostic indirect consiste non pas à mettre en évidence le parasite mais la présence dans le sérum d'anticorps dirigés contre le parasite. Ces analyses sérologiques sont réalisées par immunofluorescence, Western blot ou ELISA et ont été développées pour des microsporidies cultivables *in vitro* (**Hollister et al., 1991 ; van Gool et al., 1997 et 2004**). Cependant, comme les patients atteints de HIV présentent de faibles taux d'anticorps, ce diagnostic s'adresse préférentiellement à des patients immunocompétents.

I.5.2. Thérapie

La recherche de substances anti-microsporidiennes se heurte à de nombreuses difficultés en raison de la localisation intracellulaire du parasite, de la résistance de leur paroi sporale

épaisse et de la faible connaissance de leur métabolisme. Actuellement, deux principales molécules sont utilisées en traitement.

1.5.2.1. L'albendazole

Ce benzimidazole se lie aux sites sensibles à la colchicine de la β -tubuline inhibant ainsi la polymérisation des microtubules (**MacDonald et al., 2004**). Possédant une activité contre les helminthes et les champignons, l'albendazole entraîne une inhibition importante de la division des microsporidies appartenant au genre *Encephalitozoon* (**Didier, 1997 ; Ridoux et Drancourt, 1998**) mais présente un effet limité contre *Enterocytozoon bieneusi*.

1.5.2.2. La fumagilline

La fumagilline, antibiotique produit par *Aspergillus fumigatus*, a pour principale cible la méthionine aminopeptidase de type II (**Bontems et al., 2003 ; Zhang et al., 2005**). Elle bloque la multiplication d'*E. cuniculi* en culture (**Shaddock, 1980**). Lors d'infections oculaires dues à *E. hellem*, cette molécule est efficace mais sa toxicité limite son utilisation. Des analogues de synthèse tels que le TNP-470 ont donc été développés : celui-ci, moins toxique est actif *in vitro* contre *E. cuniculi* et *E. hellem* (**Didier, 1997 ; Coyle et al., 1998**).

1.5.2.3. Les autres traitements

La nikkomycine Z (NIK-Z), présentant une structure proche de l'UDP-N-acétylglucosamine, est un inhibiteur compétitif de la chitine synthase des champignons et des insectes. *In vitro*, NIK-Z provoque d'importants défauts morphologiques des stades parasites d'*E. hellem* (désorganisation du cytoplasme, du tube polaire, de la paroi sporale...) ainsi qu'une diminution du pouvoir infectieux des spores. La chitine étant absente des cellules de mammifères, NIK-Z semble être une cible thérapeutique spécifique des microsporidies (**Bigliardi et al., 2000**). Les fluoroquinolones, inhibant les topoisomérases et l'ADN gyrase, montrent une activité *in vitro* et *in vivo* contre *Vittaforma cornea* et *E. intestinalis* (**Didier et al., 2005**). L'addition d'agents bloquant les canaux calciques comme la

nifédépine ou encore la production d'oxyde nitrique par des donneurs de NO, inhibent la germination d'*E. hellem* et *E. intestinalis* (**He et al., 1996**).

Ces traitements alternatifs, moins efficaces, peuvent être utilisés en association avec l'albendazole ou la fumagilline (**Menotti et al., 2005**). Toutes les molécules anti-microsporidiennes utilisées n'ont qu'un effet parasitostatique. La recherche de nouvelles molécules empêchant notamment la germination s'avère donc nécessaire.

Il est important de souligner que la thérapie antirétrovirale utilisée lors du traitement de patients atteints de SIDA entraîne une augmentation du nombre de cellules CD4⁺ et a pour conséquence une réduction des cas d'infections opportunistes telles que les microsporidioses (**Goguel et al., 1997 ; Conteas et al., 1998**).

I.6. Génome des microsporidies

Le génome des microsporidies est de petite taille comparativement aux autres eucaryotes. Cette taille varie selon l'espèce microsporidienne de 2,3 Mpb pour *E. intestinalis* à 19,6 Mpb pour *Glugea atherinae* (**Méténier et Vivarès, 2001**). Le séquençage du génome nucléaire d'*E. cuniculi* a permis de mettre en évidence cette extrême réduction de taille. *E. cuniculi* présente en effet un génome de 2,9 Mb répartis sur 11 chromosomes linéaires de 217 à 314 kb (**Biderre et al., 1995, Katinka et al., 2001**). Cette taille est nettement inférieure à celle des génomes de bactéries (*E. coli* : 4,6 Mb) ou de levures (*S. cerevisiae* : 12,5 Mb). La compaction du génome se traduit par une simplification de la structure du génome : diminution de taille des espaces intergéniques (129 pb en moyenne) et des séquences codantes, absence d'éléments transposables et de minisatellites ainsi que peu de séquences répétées et de familles multigéniques. De plus, l'annotation du génome a mis en évidence un nombre réduit de gènes codant potentiellement des protéines (environ 2000 CDS), 56% n'ayant pas de fonction prédite. Les gènes de classe II sont en grande majorité à copie unique

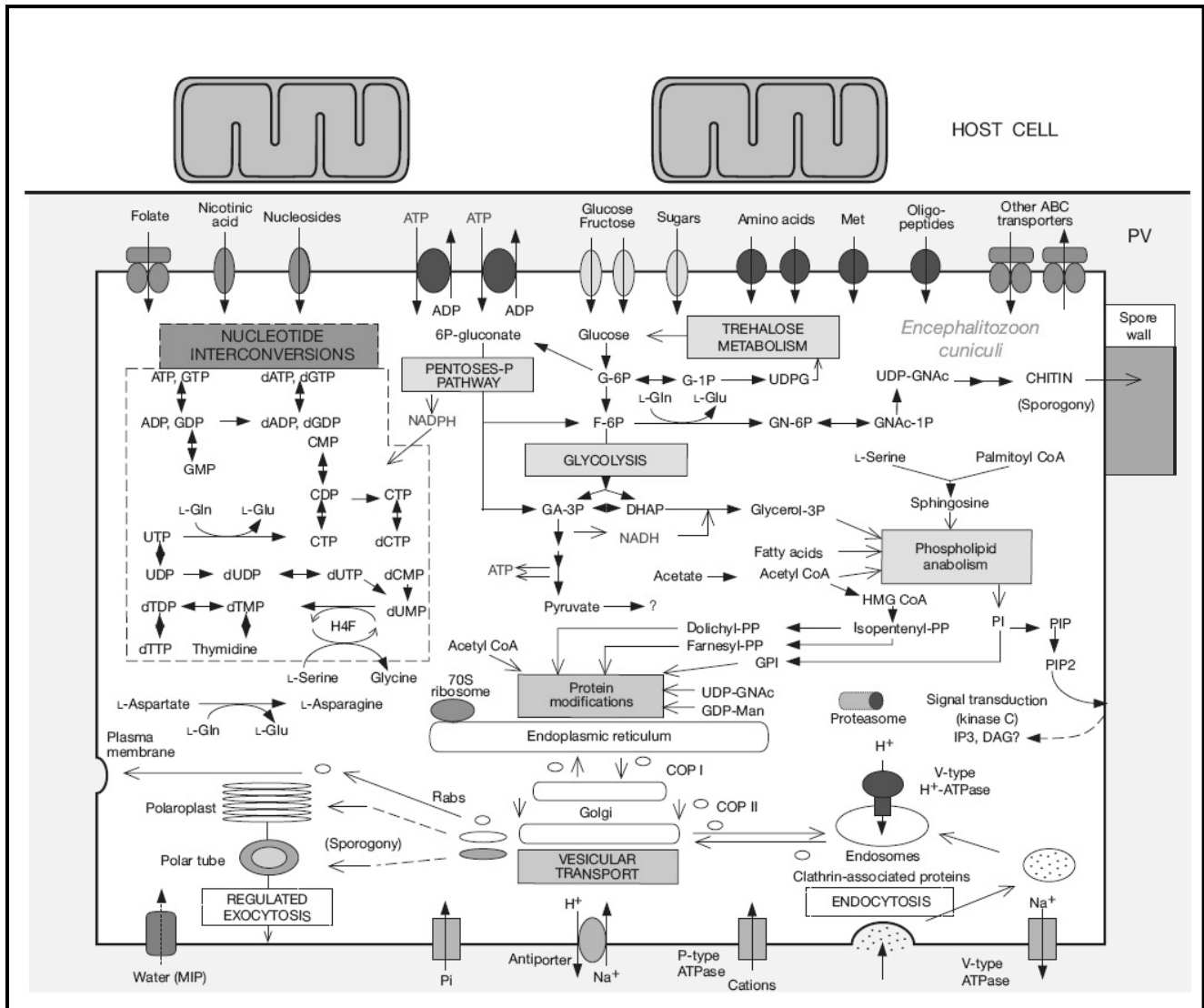


Figure 7. Reconstitution du métabolisme et des voies de transport d'*E. cuniculi* déduits de l'analyse du génome. Les voies de biosynthèse des nucléotides et de production d'énergie, sont indiquées. Le tréhalose semble être la source majeure de glucose. Le métabolisme de la chitine nécessaire à la différenciation de la paroi sporale au cours de la sporogénèse est représenté. Les transporteurs potentiels associés à la membrane plasmique sont indiqués ainsi que leur substrat. Les voies d'endocytose et de transport vésiculaire impliquant l'appareil de Golgi polarisé *cis-trans* sont indiquées. Les points d'interrogation signalent les incertitudes majeures concernant le pyruvate et la nature des messagers secondaires des voies du transduction de signaux. Le parasite est représenté au sein d'une vacuole parasitophore (PV) dans le cytoplasme de la cellule hôte avec un recrutement de mitochondries près de la membrane de la vacuole parasitophore (d'après Katinka *et al.*, 2001).

et dépourvus d'introns. Une réduction de taille de la plupart des protéines identifiées par rapport à leurs orthologues eucaryotes est également observée (chaîne lourde de dynéine, sous-unités A et B de la polymérase α ...). L'examen des gènes assignés à des catégories fonctionnelles montre une simplification ou une disparition de certaines voies métaboliques : biosynthèse des acides aminés limitée, absence de chaîne respiratoire, absence de la voie de biosynthèse des acides gras (**Fig. 7**). Katinka *et al.* (2001) suggèrent que la forte dépendance des parasites intracellulaires pour les métabolites de l'hôte est illustrée par l'absence de gènes impliqués dans de nombreuses voies métaboliques comme par exemple le cycle des acides tricarboxyliques.

Une vingtaine de gènes codant pour des protéines mitochondriales ont été identifiés dans le génome nucléaire : l'hypothèse de la persistance d'un organite vestigial appelé mitosome a donc été proposée (**Katinka *et al.*, 2001**). Un tel organite pourrait avoir conservé la fonction de genèse des centres Fer-Soufre. Récemment, de petite vésicules entourées de deux membranes et réagissant avec un anticorps dirigé contre une HSP70 de type mitochondrial ont été mises en évidence chez la microsporidie *T. hominis* (**Williams *et al.*, 2002**).

L'élimination de gènes conduit à un génome codant un nombre réduit de protéines. Le protéome simplifié d'*E. cuniculi* constitue ainsi un bon outil pour la caractérisation des réseaux d'interaction minimums (**Brosson *et al.*, 2006**). La réduction de taille des protéines peut aussi permettre de caractériser les régions essentielles de protéines orthologues (**Hausmann *et al.*, 2002**) et la cristallisation de protéines d'importance majeures chez les eucaryotes comme les facteurs de transcription.

Le séquençage du génome d'une autre microsporidie parasite d'insectes, *Antonospora locustae* dont la taille est estimée à 5,4 Mb (**Street, 1994**) est en cours de réalisation (*Antonospora locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272). 2600 CDS sont actuellement répertoriés dans une

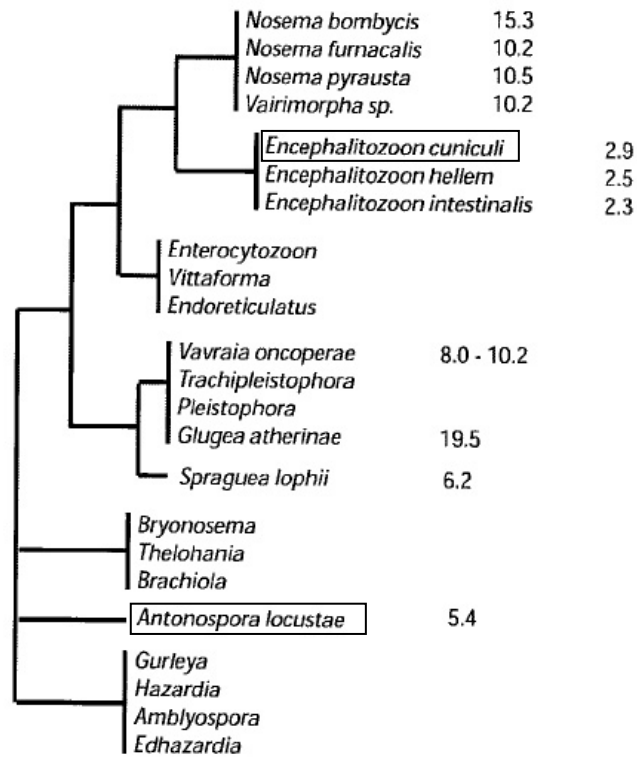


Figure 8. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse de la petite sous-unité d'ADNr montrant que les espèces *Encephalitozoon cuniculi* et *Antonospora locustae* sont phylogénétiquement éloignées. Les chiffres à droite représente la taille des génomes estimée en méga paires de bases qui varie de 19,5 Mpb pour *Glugea atherinae* à 2,3 Mpb pour *Encephalitozoon intestinalis*, plus petit génome eucaryote connu (d'après Keeling et Slamovits, 2004).

base de données (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01?>). Une étude récente portant sur 183 gènes a montré une forte compaction du génome d'*A. locustae* ainsi que la présence d'espaces intergéniques courts (216 pb). Parmi les 183 gènes identifiés, 175 gènes présentent des homologies avec *E. cuniculi*, 4 semblent être spécifiques d'*A. locustae* et 3 présentent des homologies avec des séquences identifiées chez d'autres organismes. De plus, malgré une divergence importante des séquences entre les 2 génomes, leur niveau de réorganisation reste faible : 13% des 183 gènes étudiés se trouvent en effet dans le même contexte génétique, 43% sur le même chromosome et 17% dans un environnement proche. Cette conservation de l'organisation des gènes ou synténie est un outil de choix pour l'annotation de séquences ne présentant aucune similarité mais reste surprenante du fait de l'éloignement phylogénétique de ces deux espèces, de leurs hôtes et de leurs cycles différents (**Fig. 8, Slamovits et al., 2003 ; 2004 ; Keeling et Slamovits, 2004**).

Enfin, trois autres génomes microsporidiens sont également en cours de séquençage : *Brachiola algerae*, microsporidie parasite d'insectes et pathogène chez l'Homme, *Nosema bombycis*, parasite du ver à soie et *Enterocytozoon bieneusi*, pathogène chez l'Homme et chez d'autres mammifères.

I.7. Données de protéomique

Ce chapitre sera consacré à la description du protéome d'*E. cuniculi* et des protéines de la paroi sporale. Les protéines du tube polaire seront décrites ultérieurement.

I.7.1. Le protéome d'*E. cuniculi*

L'étude du protéome des « stades tardifs » de la sporogénèse (sporoblastes à spores matures) a été entreprise à l'aide de différentes stratégies d'extraction protéique couplées à des séparations des protéines en électrophorèse mono ou bi-dimensionnelle. Une carte de

référence comprenant environ 350 spots protéiques a ainsi pu être établie. L'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, a permis d'identifier 177 protéines uniques dont 25,6% à fonction inconnue (**Brosson et al., 2006**). Parmi les protéines à fonction connue, 20% sont impliquées dans la synthèse protéique et les modifications post-traductionnelles (glycosylation, acétylation, prénylation), ces dernières jouant un rôle important dans un contexte de génome réduit puisqu'elles permettent d'accroître la diversité des protéines. Des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire et la survie dans l'environnement après libération des stades parasites dans l'environnement ont également été caractérisées (HSP, protéines de détoxification, réparation de l'ADN). De plus, plusieurs éléments de la machinerie de traduction, du contrôle du cycle cellulaire et du métabolisme énergétique ont été mis en évidence ce qui peut paraître paradoxal, le stade sporal étant présenté comme un stade latent présentant un ralentissement des activités cellulaires. Ces données peuvent cependant s'expliquer par des synthèses protéiques tardives ou par la mise en réserve d'éléments qui permettront d'initier rapidement un nouveau cycle de développement après invasion.

I.7.2. Les protéines pariétales

De nombreuses études cytochimiques ont permis de localiser des antigènes au niveau de la paroi sporale de différentes espèces microsporidiennes (**Beckers et al., 1996, Lujan et al., 1998, Delbac et al., 1998, Prigneau et al., 2000**). Cependant, jusqu'à présent peu de protéines pariétales ont été identifiées au niveau moléculaire. Chez *E. cuniculi*, le criblage d'une banque d'ADNc à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'exospore a permis d'identifier une protéine de 50 kDa appelée SWP1. Cette protéine possède un domaine N-terminal hydrophobe (aa 19 à 150) et une partie C-terminale constituée de 5 répétitions de 17 résidus riches en glycine et sérine (**Fig. 9**). Malgré un grand nombre de sites potentiels de O-

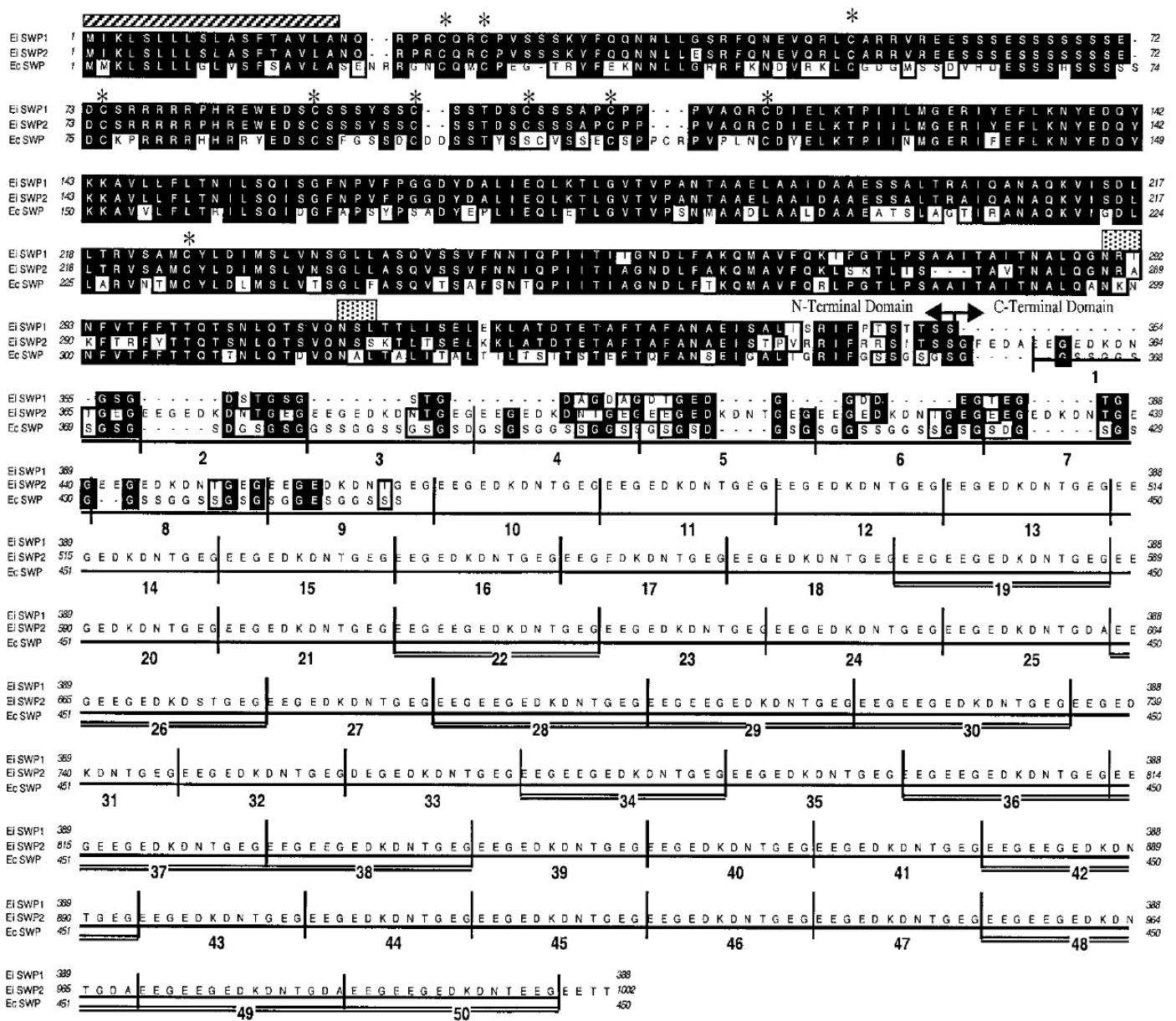


Figure 9. Alignement entre les séquences protéiques des protéines SWPs identifiées chez *E. coli* (EcSWP) et *E. intestinalis* (EiSWP1 et EiSWP2). Les aa identiques sont surlignés en noir, ceux similaires sont encadrés. Les résidus cystéine en positions conservées sont indiqués par des astérisques. Les flèches indiquent la séparation entre le domaine N-terminal conservé et le domaine C-terminal divergent. Le rectangle hachuré désigne les peptides signaux prédits. Les deux rectangles pointillés signalent les sites potentiels de N-glycosylation. L'extrémité C-terminale de EiSWP2 est composée de 50 répétitions de 12 à 15 aa qui sont numérotées. Les positions en aa sont indiquées à droite. aa : acides aminés (d'après Hayman *et al.*, 2001).

glycosylation, des traitements chimiques (NaOH) ou enzymatiques (héparinases) n'ont pas permis de mettre en évidence une modification post-traductionnelle (**Bohne et al., 2000**). Deux protéines de type SWP1 (EiSWP1, 388 aa et EiSWP2, 1002 aa) ont ensuite été caractérisées chez *E. intestinalis* par criblage d'une banque d'expression (**Hayman et al., 2001**). Ces protéines sont glycosylées et présentent un domaine N-terminal conservé entre elles et avec la protéine SWP1 d'*E. cuniculi* (65% d'identité, **Fig. 9**). Les différences les plus importantes concernent leurs extrémités C-terminales constituées de 34 aa pour EiSWP1 et de cinquante répétitions de 12 à 15 aa riches en glutamate pour EiSWP2 (**Fig. 9**). Des expériences d'immunoprécipitation semblent montrer des interactions entre ces deux glycoprotéines. Ces protéines présentent un peptide signal potentiellement clivable suggérant leur sécrétion à partir du réticulum endoplasmique. De plus, la présence d'un domaine C-terminal contenant des résidus hydrophiles laisse penser que ces domaines C-terminaux variables sont exposés à l'extérieur et interviendraient pour masquer la réponse immunitaire. Enfin, ces protéines sont immunogènes puisqu'elles suscitent la production d'anticorps spécifiques chez la souris (**Hayman et al., 2001**). Ces résultats sont confirmés par des tests sérologiques réalisés à partir du sérum d'un patient infesté par *E. cuniculi* montrant une reconnaissance de la protéine SWP1 d'*E. cuniculi* exprimée chez *E. coli* (**van Gool et al., 2004**).

Certaines protéines de l'exospore pourraient aussi jouer un rôle prépondérant dans la reconnaissance et la liaison aux cellules cibles. Des anticorps dirigés contre certaines de ces protéines entraînent en effet une inhibition de l'invasion (**Enriquez et al., 1998**). La présence de glycoconjugués pourrait jouer un rôle important dans l'adhésion à des récepteurs de la cellule hôte (**Hayman et al., 2001**).

Récemment trois protéines ont été mises en évidence au niveau de l'endospore chez *E. cuniculi*. Une chitine déacétylase putative, EcCDA, localisée à l'interface membrane

plasmique-endospore, interviendrait dans la déacétylation de la chitine en chitosan permettant une meilleure résistance aux stress environnementaux (**Brosson et al., 2005**). Deux autres protéines de l'endospore, EnP1 et EnP2, ont été identifiées chez *E. cuniculi* et ne présentent aucune homologie avec les protéines des bases de données. La protéine EnP1, caractérisée par criblage d'une banque d'ADNc, est riche en cystéine et en lysine. EnP2, protéine riche en sérine, a été identifiée par spectrométrie de masse au sein d'une fraction de protéines solubles en présence de fortes concentrations de DTT (200 mM). Elle possède un site potentiel d'ancrage GPI ainsi que de nombreux sites de O-glycosylation (**Peuvel-Fanget et al., 2006 ; Xu et al., 2006**).

Une recherche de nouvelles protéines de paroi a été initiée à partir des protéines à fonction inconnue mises en évidence dans l'étude du protéome d'*E. cuniculi*. Elle est basée sur la prédiction d'un peptide signal N-terminal, d'hélice(s) transmembranaire(s), d'un ancrage GPI ainsi que de la localisation cellulaire. Ainsi, il a été montré que le CDS ECU02_0150 code pour une protéine localisée au niveau de l'exospore (**Brosson et al., 2006**).

I.7.3. Biogenèse de la paroi

La morphogenèse de la paroi débute très tôt au cours du cycle de développement lors de la transition méronte-sporonte, par des dépôts de matériel dense aux électrons sous forme de lamelles à la périphérie du parasite, sur la membrane plasmique. Les stades présentant ce matériel dense sont appelés sporontes et traduisent le début de la phase de différenciation ou sporogonie. L'endospore fait son apparition plus tardivement chez le sporoblaste entre la membrane plasmique et les dépôts denses qui correspondent à la future exospore. L'endospore s'épaissit et atteint son épaisseur finale à la fin de la maturation des spores (**Vavra et Larsson, 1999**). Ce modèle est confirmé par les études de localisation des

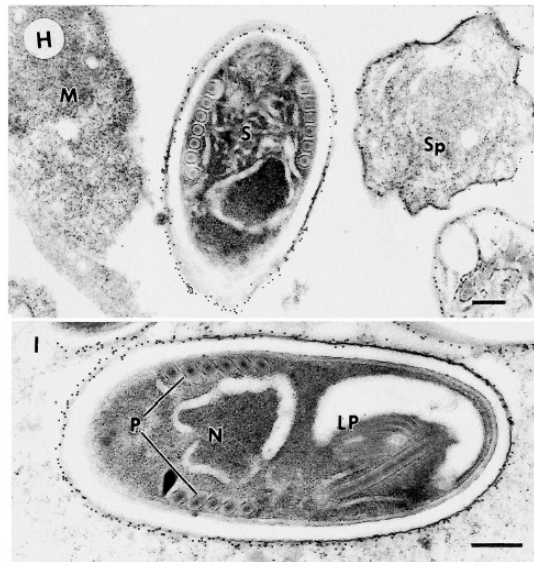


Figure 10. Immunomarquages en microscopie électronique des stades de développement d'*E. cuniculi* à l'aide des anticorps anti-EcSWP1 (Mab11A1) dirigés contre SWP1, protéine de l'exospore. Aucun marquage n'est observé chez les stades mérontes (M). La protéine SWP1 est détectée à la surface des parasites dès le stade sporonte puis au niveau de la couche externe dans les spore matures. M : méronte, Sp : sporonte, S : spore, N: noyau, P: tube polaire, LP : polaroplaste lamellaire. Echelle : 200 nm (d'après Bohne *et al.*, 2000).

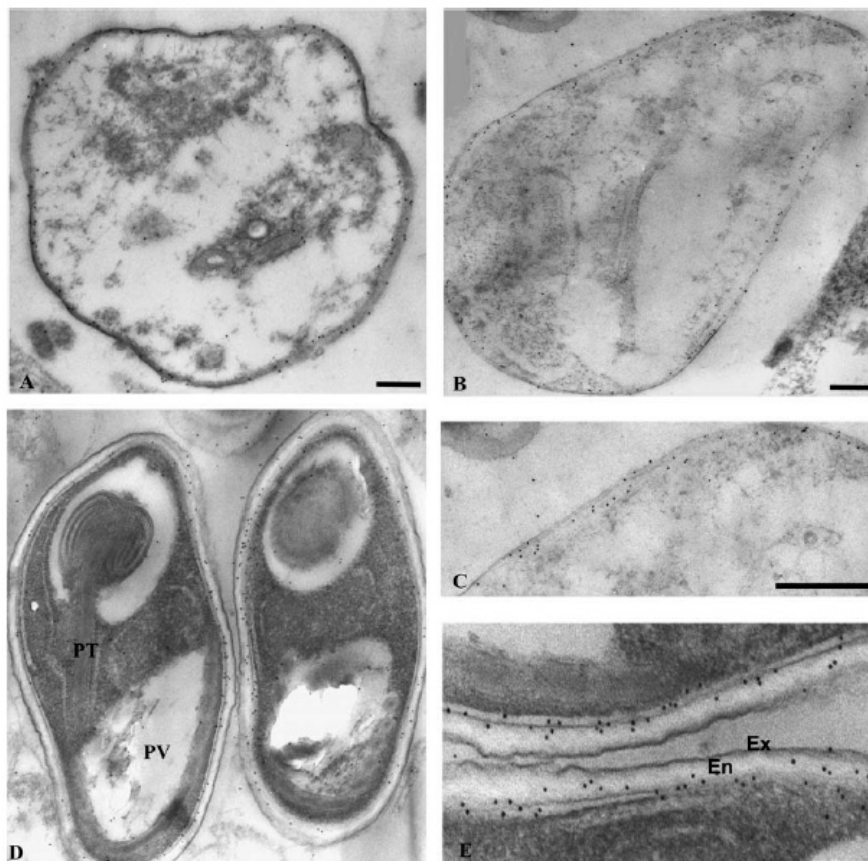


Figure 11. Immunomarquages en microscopie électronique des stades de développement d'*E. cuniculi* à l'aide des anticorps dirigés contre Enp2, une protéine de l'endospore. La protéine Enp2 est détectée à la surface des parasites dès le stade sporonte (A-C) puis au niveau de la couche interne riche en chitine dans les spore matures (D-E). Le même type de marquage est obtenu avec des anticorps anti-Enp1. C et E correspondent à un agrandissement de B et D. Ex : exospore, En : endospore, PT : tube polaire, PV : vacuole postérieure. Echelle : 200 nm (d'après Peuvél-Fanget *et al.*, 2006).

protéines pariétales au cours du cycle de développement. Ainsi, la protéine de l'exospore SWP1, absente des stades mérontes, est localisée au niveau de dépôts de matériel denses aux électrons à partir des stades sporontes. Elle est ensuite retrouvée tout au long du cycle de développement à la surface des sporoblastes et des spores matures (**Fig. 10, Bohne *et al.*, 2000 ; Hayman *et al.*, 2001**). Chez *E. intestinalis*, la protéine SWP2 est mise en place plus tardivement lorsque le sporonte est entièrement formé et semble plus abondante que SWP1 dans la spore mature (**Hayman *et al.*, 2001**). Les protéines de l'endospore EnP1, EnP2 et la protéine EcCDA, sont détectées dans le cytoplasme des mérontes et sont présentes à la surface des parasites dès le stade sporonte. Les protéines Enp1 et Enp2 migrent pour se retrouver au niveau de l'endospore dans les spores matures (**Fig. 11, Peuvél-Fanget *et al.*, 2006 ; Xu *et al.* 2006**) alors que la protéine EcCDA reste localisée à la jonction entre la membrane plasmique et l'endospore (**Brosson *et al.*, 2005**).

II. Tube polaire et invasion

II.1. Les différents modes d'infestation

Deux principales hypothèses sont proposées pour expliquer le mécanisme par lequel les microsporidies envahissent leur cellule hôte (**Fig. 12**). Le premier mécanisme est un processus actif au cours duquel le tube polaire semble être capable de percer la membrane de la cellule hôte agissant ainsi comme l'aiguille d'une seringue (**Fig. 12B**). La dévagination du tube polaire permet alors de créer un pont à travers lequel le sporoplasme infectieux va être transféré directement vers le cytoplasme de la cellule hôte. L'adhésion des spores microsporidiennes à la surface des cellules cibles pourrait être l'événement initial nécessaire à la dévagination du tube polaire. Des observations en microscopie électronique montrent en effet que les spores microsporidiennes s'attachent à la membrane de la cellule hôte avant l'invasion (**Fig. 13A et B**). De plus, il a été récemment démontré que des

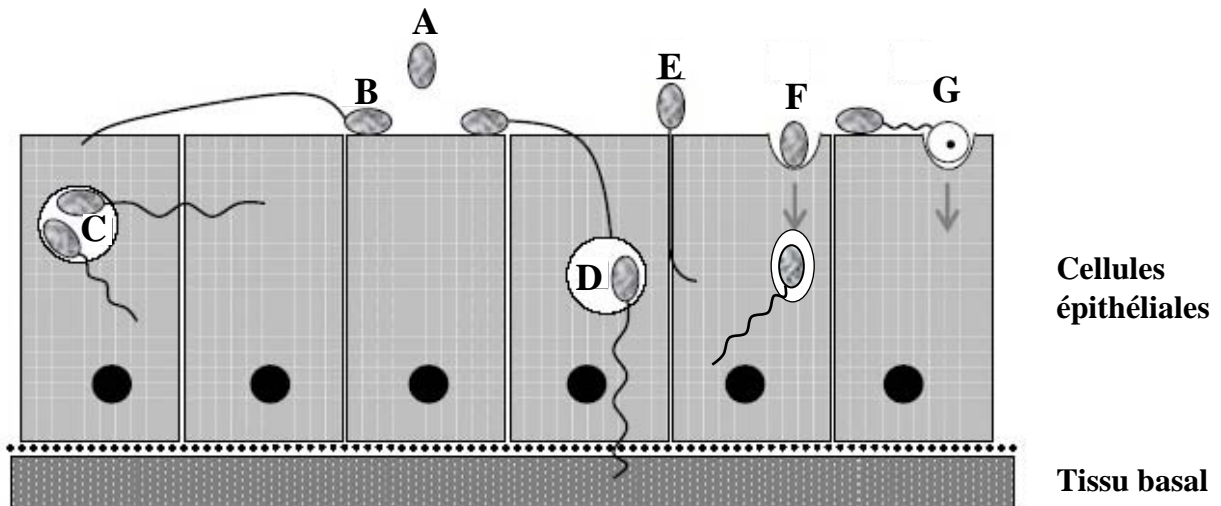


Figure 12. Les différentes voies hypothétiques d'entrée d'*E. cuniculi* dans les cellules épithéliales. (A) Spore mature libre. (B) Adhésion de la spore à la surface de la cellule hôte suivie de la dévagination du tube polaire qui traverse la membrane de la cellule hôte et libère le sporoplasme dans le cytoplasme de la cellule cible. (C) Infestation secondaire de la même cellule ou d'une cellule adjacente par dévagination du tube polaire de spores encore contenues dans une vacuole parasitophore. (D) Infestation secondaire d'une cellule sous jacente voire d'autre tissu. (E) Pénétration basolatérale par insinuation des tubes polaires dévaginés au niveau de jonctions intercellulaires. F et G. Internalisation par endocytose directe de la spore (F) ou du sporoplasme (G) (modifié d'après Vivarès et Méténier, 2001 et Franzen, 2005).

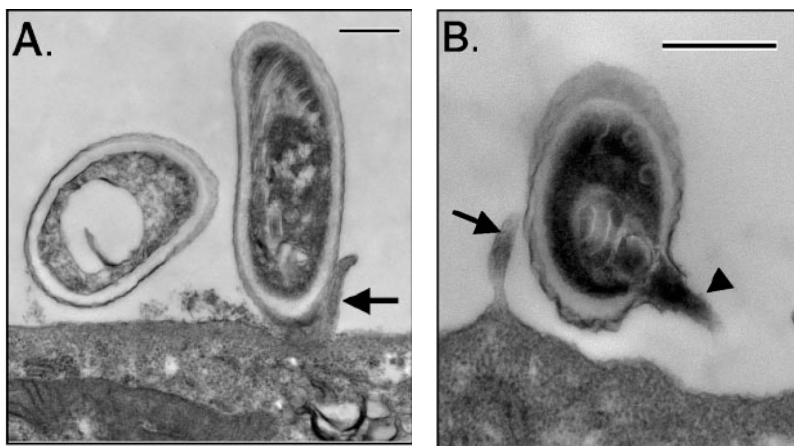


Figure 13. L'attachement des spores à la surface des cellules hôtes pourrait être le précurseur de la dévagination. Images en microscopie électronique à transmission de spores d'*E. intestinalis* attachées à la surface de cellules Caco-2. Les spores attachées semblent être en contact direct avec la surface de la cellule hôte ou des microvillosités : ces spores présentent un tube polaire intact non dévaginé, encore enroulé à l'intérieur de la spore (A), d'autres présentent un tube polaire dévaginé (B). Les flèches montrent les microvillosités de la cellule hôte, l'extrémité de la flèche indique le tube polaire dévaginé d'*E. intestinalis*. Echelle : 500 nm (d'après Hayman *et al.*, 2005).

glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs) présents à la surface de la cellule hôte jouent un rôle important dans l'attachement des spores d'*E. intestinalis* (Hayman *et al.*, 2005). Les molécules présentes à la surface de la spore et impliquées dans l'interaction avec les résidus GAGs cellulaires restent à déterminer.

Le second mécanisme décrit est un mécanisme d'invasion par phagocytose ou endocytose des spores microsporidiennes ou de leur sporoplasme par des cellules phagocytaires « professionnelles » ou « non professionnelles » (Fig. 12F et G). L'inhibition de l'invasion par la cytochalasine D indique que ce processus est dépendant de l'actine (Magaud *et al.*, 1997 ; Couzinet *et al.*, 2000 ; Foucault et Drancourt, 2000 ; Takvorian *et al.*, 2005). Les microsporidies, comme d'autres parasites intracellulaires, sont donc capables d'entraîner des remaniements du cytosquelette de la cellule hôte pour faciliter leur entrée. Ainsi, des études récentes semblent montrer que la phagocytose des spores a lieu 10 fois plus fréquemment que l'injection du sporoplasme. Alors que la majorité des spores phagocytées sont dégradées, certaines « dévaginent » leur tube polaire vers une autre cellule avant la fusion lysosomale échappant aux phagosomes et initiant ainsi le cycle de multiplication intracellulaire. Le tube polaire serait alors un moyen d'échapper à la lyse après phagocytose (Franzen *et al.*, 2005). D'autres études montrent au contraire que la phagocytose n'est pas le mode d'infestation privilégié dans les cellules épithéliales intestinales (Leitch *et al.*, 2005). Des infestations secondaires peuvent ensuite avoir lieu lorsque des spores matures, produites dans une première cellule infestée, germent pour infester la même cellule hôte ou une cellule adjacente (Fig. 12C et D).

Enfin, l'hypothèse que le tube polaire serait une adaptation pour une cellule non motile lui permettant d'interagir avec des cellules cibles plus ou moins distantes ne peut être exclue (Vivarès et Méténier, 2001).

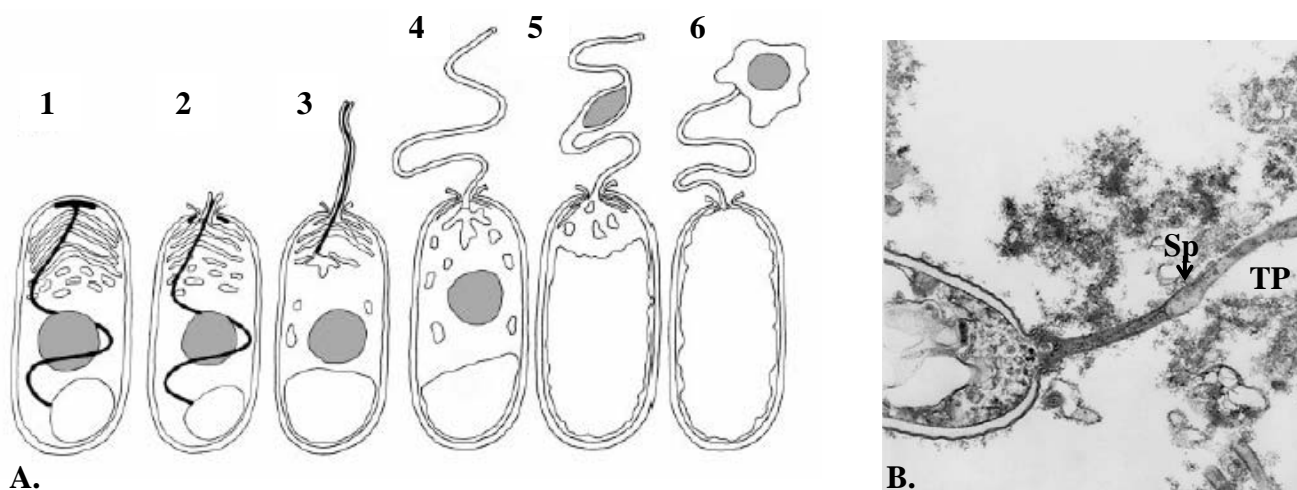


Figure 14. Représentation schématique du processus de dévagination d'une spore microsporidienne. Le sporoplasme ou matériel infectieux est expulsé hors de la spore par le tube polaire. Le polaroplasme lamellaire forme la future membrane du sporoplasme injecté dans le cytoplasme de la cellule hôte. **(1)** Spore mature où sont représentés le tube polaire (noir), le noyau (gris), le polaroplasme et la vacuole postérieure. **(2)** Suite à une augmentation de la pression osmotique se produit un gonflement du polaroplasme et de la vacuole postérieure entraînant la rupture du disque d'ancrage et le début de la dévagination du tube polaire à la manière d'un doigt de gant inversé. **(3)** La dévagination du tube polaire se poursuit. **(4)** Lorsque le tube polaire est complètement dévaginé le sporoplasme est poussé vers le tube polaire puis il est transféré à l'intérieur de celui-ci **(5)**. **(6)** Le sporoplasme sort du tube polaire et se retrouve entouré d'une membrane ayant comme origine le polaroplasme lamellaire (d'après Keeling et Fast, 2002). **(B)** Image du passage du sporoplasme infectieux à travers le tube polaire dévaginé observé en microscopie électronique à transmission. Sp : sporoplasme, TP : tube polaire (cliché F. Delbac).

II.2. La germination

II.2.1. Activation de la germination

Le processus d'extrusion du tube polaire et le transfert du matériel génétique sont réalisés en moins de 2 secondes (**Frixione *et al.*, 1992**) et peuvent être divisés en 4 étapes : (1) l'activation par divers stimuli appropriés, (2) l'augmentation de la pression osmotique intrasporale, (3) la dévagination du tube polaire par « inversion » et (4) enfin la libération du sporoplasme à travers le tube creux (**Fig. 14**).

Encore hypothétiques, les stimuli déclencheurs de la germination ne sont pas universels et diffèrent selon les espèces microsporidiennes. Ceci reflète probablement une adaptation des microsporidies à leur hôte et aux conditions environnementales, ces parasites étant capables d'infester un très grand nombre de vertébrés, d'invertébrés ainsi que différents tissus et types cellulaires. Ainsi, l'existence de stimuli spécifiques nécessaires à l'initiation de la germination permettrait d'éviter des libérations accidentelles du sporoplasme dans l'environnement et pourrait contribuer à la spécificité d'hôte (**Xu et Weiss, 2005**).

In vitro, selon l'espèce de microsporidie considérée, différentes conditions semblent être à l'origine d'une activation de la germination : les variations de pH, l'addition de cations monovalents (Na^+ , K^+) ou d'anions, la présence de H_2O_2 ou de faibles doses de radiations UV (**Undeen et Avery, 1988 ; Undeen et Vander Meer, 1990 ; Leitch *et al.*, 1993 ; Frixione *et al.*, 1994**). Un rôle du calcium, séquestré au niveau du polaroplaste, est suggéré car l'addition du ionophore de calcium A23187 stimule la germination (**Weidner et Byrd, 1982**). De plus, **Leitch *et al.* (1993)** ont montré que les ions Ca^{2+} et leur interaction avec le cytosquelette influencent la dévagination : des traitements à la nifédipine, agent bloquant des canaux calciques, ou à la cytochalasin D qui détruit les filaments d'actine inhibent la germination d'*E. hellem*. Rappelons aussi que de récentes études montrent que l'adhésion des spores

microsporidiennes à des glycosaminoglycanes sulfatés de la cellule hôte déclenche le processus de germination (**Hayman et al., 2005**).

Quels que soient les stimuli nécessaires à l'activation de la germination, leur conséquence est une augmentation de la pression osmotique intrasporale (**Lom et Vavra, 1963 ; Weidner et Byrd, 1982**). Cette dernière est responsable du gonflement du polaroplaste et de la vacuole postérieure produisant ainsi la force nécessaire à la rupture de la paroi au niveau du capuchon polaire, région où la paroi est réduite, et permettant alors l'extrusion du tube polaire et la libération du sporoplasme (**Fig. 14**). Une des causes de l'augmentation de la pression osmotique pourrait être l'hydrolyse du tréhalose, disaccharide non réduit et forme majoritaire de stockage glucidique de la spore, en deux molécules de glucose. En effet, simultanément à la germination, une forte diminution du taux de tréhalose est corrélée avec une augmentation stoechiométrique de la quantité de sucres réducteurs (**Undeen et Van der Meer, 1994**). De plus, des canaux transmembranaires de type aquaporine pourraient jouer un rôle important en facilitant l'entrée rapide d'eau à l'intérieur de la spore d'*E. cuniculi* (**Ghosh et al., 2006**).

II.2.2. Extrusion du tube polaire

Le premier signe de la dévagination est l'apparition d'une protubérance au niveau du disque d'ancrage. Une rupture du capuchon polaire permet alors l'émergence rapide du tube polaire (**Lom et Vavra, 1963 ; Frixione et al., 1992**). Ce processus d'extrusion a lieu probablement par inversion du tube polaire de façon similaire à un doigt de gant inversé. Lorsque le tube polaire est entièrement dévaginé, le sporoplasme passe à travers ce tube creux et apparaît après 15 à 500 ms tel une goutte à l'extrémité du tube (**Fig. 14A et B, Weidner, 1982 ; Frixione et al., 1992**). La nouvelle membrane plasmique pour le sporoplasme libéré proviendrait du polaroplaste lamellaire (**Weidner et al., 1984**).

II.3. Le tube polaire : un complexe multiprotéique

II.3.1. Hétérogénéité

Les premiers travaux visant à purifier les constituants du tube polaire se sont appuyés sur les propriétés particulières de dissociation de cette structure. Le tube polaire est en effet résistant aux détergents (SDS 1-3%) et aux acides (HCl 2N, H₂SO₄ 8N). Seules de fortes concentrations en agents réducteurs (DTT et 2-mercaptoéthanol) permettent de dissocier totalement le tube polaire ce qui laisse supposer un rôle important des ponts disulfures dans la stabilisation de cette structure (Weidner, 1976 ; Keohane *et al.*, 1996). *In vitro*, des études d'assemblage du tube polaire ont été réalisées chez *Ameson michaelis* après solubilisation en présence d'agents réducteurs suivie d'une acidification du milieu : le tube polaire résulterait de la polymérisation d'une seule protéine de 23 kDa (Weidner, 1976). Cette protéine présente 5 résidus cystéine et semble capable de s'assembler pour former une structure proche d'un tube, les liaisons entre les différentes protéines étant assurées par des ponts disulfure. Cependant aucune donnée de séquence de cette protéine n'a pu être obtenue. Des études immunologiques réalisées à l'aide d'anticorps produits contre différentes bandes protéiques de *Glugea atherinae* et d'*E. cuniculi* après séparation en SDS-PAGE suggèrent que le tube polaire est en fait composé de différentes protéines. Des anticorps dirigés contre des bandes de 34, 75 et 170 kDa de *G. atherinae* et de 28, 35, 55 et 150 kDa d'*E. cuniculi* donnent en effet un marquage spécifique des tubes polaires (Delbac *et al.*, 1998a).

II.3.2. Les protéines du tube polaire

La première séquence complète d'une protéine du tube polaire a été identifiée chez *E. cuniculi* et nommée EcPTP1. EcPTP1 est une protéine acide riche en proline de 395 aa contenant dans sa région interne 4 répétitions en tandem de 26 aa (Delbac *et al.*, 1998b). Des protéines de type PTP1 ayant des tailles apparentes de 50-55 kDa ont ensuite été identifiées

chez *E. hellem* (EhPTP1, 453 aa) et *E. intestinalis* (EiPTP1, 371 aa) (**Keohane et al., 1998 ; Delbac et al., 2001**). Ces 3 protéines présentent un peptide signal de 22 aa ce qui indique un processus de maturation et d'adressage *via* le réticulum endoplasmique. Bien que leurs séquences en acides aminés soient peu conservées, ces protéines présentent des caractéristiques communes : une richesse en proline et en glycine, un grand nombre de cystéines dont une en position C-terminale, des régions répétées internes. La richesse en proline, acide aminé cyclique, serait à l'origine de la flexibilité et l'élasticité nécessaire à la compaction du tube polaire à l'intérieur de la spore. Un rôle dans la génération d'une force lors de la dévagination et de la déformation du tube polaire lors du passage du sporoplasme est aussi suggéré. Cette richesse en proline et en glycine est une caractéristique de nombreuses protéines structurales comme le collagène ou l'élastine. On peut également noter que les régions N- et C-terminales de ces protéines sont conservées alors que la région centrale hydrophobe constituée de motifs répétés en tandem est divergente (**Keohane et al., 1999, Delbac et al., 2001**). Ces répétitions, variables selon l'espèce considérée, ne semblent donc pas être nécessaires à l'assemblage du tube polaire mais joueraient un rôle dans la réponse immunitaire.

L'utilisation de différentes lectines a permis de montrer que la protéine PTP1 d'*E. hellem* (EhPTP1) est capable de se lier spécifiquement à la Concanavaleine A (ConA). Cette liaison est rompue par un traitement NaOH suggérant une O-mannosylation de EhPTP1. Cette mannosylation semble nécessaire pour interagir avec la surface de la cellule hôte. En effet, un pré-traitement de cellules RK13 avec du mannose inhibe l'invasion par *E. hellem* ce qui suggère une interaction entre les résidus mannose de PTP1 et un récepteur cellulaire inconnu liant le mannose (**Xu et al., 2004**). Dans une autre étude, des expériences de déglycosylation de EiPTP1, montrent que la présence de mannose sur les protéines de type PTP1 pourrait expliquer le défaut de migration observé en SDS-PAGE (**Peek et al., 2005**). Cette

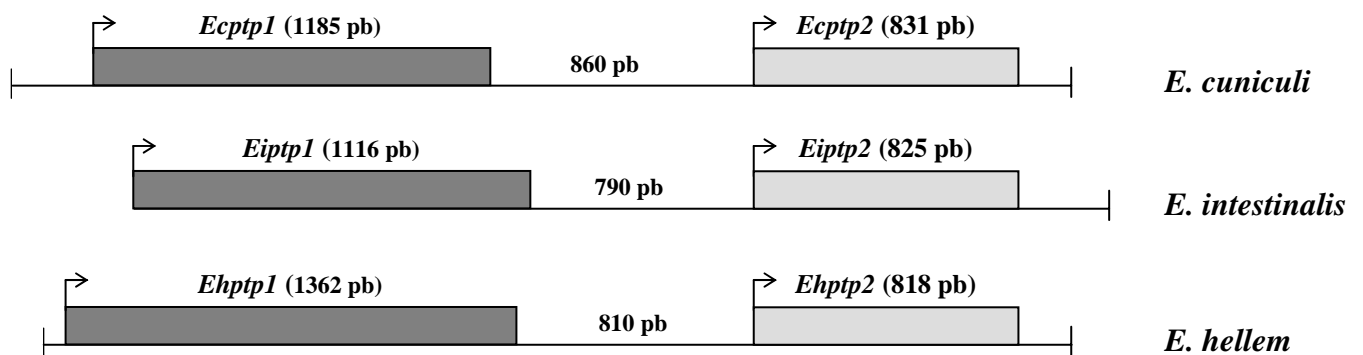


Figure 15. Représentation schématique de l'organisation conservée en cluster des gènes *ptp1* et *ptp2* au sein des trois espèces du genre *Encephalitozoon*. *ptp1* est représenté par un rectangle gris foncé, *ptp2* par un rectangle gris clair (d'après Delbac *et al.*, 2001)

modification post-traductionnelle jouerait également un rôle important au cours de la réponse immunitaire, des sérums de patients infectés par *E. intestinalis* possédant des IgG dirigés contre des résidus glucidiques de PTP1 (Peek *et al.*, 2005). Enfin, il apparaît que PTP1 serait un bon candidat pour des études sérologiques puisque une protéine EcPTP1 recombinante est reconnue par le sérum d'un patient accidentellement infecté par *E. cuniculi* ainsi que par des sérums de lapins naturellement infestés (van Gool *et al.*, 2004).

Bien que PTP1 semble être la protéine majeure du tube polaire, d'autres protéines du tube polaire ont été identifiées (Delbac *et al.*, 1998b). Parmi elles, la protéine PTP2 constituée de 277 aa et ayant une taille apparente de 35 kDa a été initialement caractérisée chez *E. cuniculi* (Delbac *et al.*, 2001). Les gènes codant *ptp1* et *ptp2*, présents sur le chromosome VI d'*E. cuniculi* (ECU06_0250 et ECU06_0240) sont organisés en tandem et sont séparés par un espace intergénique de 860 pb. Cette organisation en tandem, conservée au sein du genre *Encephalitozoon*, a permis l'identification des gènes codant les protéines PTP2 chez *E. hellem* (EhPTP2) et *E. intestinalis* (EiPTP2, Fig. 15, Delbac *et al.*, 2001). Les protéines PTP2 sont des protéines basiques riches en lysine présentant une taille de 30-35 kDa. Ces protéines sont nettement plus conservées que les protéines de type PTP1 et présentent un peptide signal de 19 aa. Trois régions peuvent être distinguées : une région N-terminale de 50 aa non chargés, une région interne basique contenant des répétitions riches en lysine et enfin une queue C-terminale acide de 24-27 aa. Les deux aa les plus abondants sont la lysine (10,8% - 12,1%) et le glutamate (6,2% - 9,5%). Un résidu glutamate occupe la dernière position et 8 résidus cystéines sont présents en des positions conservées dans les trois PTP2 identifiées.

Parmi les anticorps polyclonaux produits contre des bandes protéiques d'*E. cuniculi* séparées en SDS-PAGE, trois sont dirigés contre le tube polaire et reconnaissent des bandes à 35 kDa (EcPTP2), 55 kDa (EcPTP1) et 150 kDa (Delbac *et al.*, 1998a). L'immunocriblage d'une banque d'ADNc à l'aide des anticorps dirigés contre la bande protéique à 150 kDa, a

ensuite permis d'identifier une troisième protéine du tube polaire (PTP3), protéine codée par un gène de 3768 pb localisé sur le chromosome XI d'*E. cuniculi* (ECU11_1440, **Peuvel et al., 2002**). Polypeptide de 1256 aa (136 kDa, pI 6,5), PTP3 présente un domaine central acide riche en résidus aspartate et glutamate entouré de domaines N- et C-terminaux basiques. Contrairement à PTP1 et PTP2, cette protéine, après clivage du peptide signal prédit, ne contient aucun résidu cystéine et est soluble en l'absence d'agent réducteur. Des réactions croisées sont obtenues avec les tubes polaires d'*E. hellem* et d'*E. intestinalis* ce qui suggère une forte conservation de la protéine PTP3 au sein du genre *Encephalitozoon*.

Enfin, une étude de l'expression des trois gènes *ptp1*, *ptp2* et *ptp3* d'*E. cuniculi* au cours du temps montre une sur-expression au cours de la sporogonie ce qui est corrélé avec la mise en place du tube polaire (**Peuvel et al., 2002**).

II.3.3. Les interactions entre les protéines du tube polaire

La dissociation du tube polaire nécessitant la présence d'agents réducteurs, un rôle important des ponts disulfure dans l'architecture du tube polaire est envisagé. Ceci est en accord avec la présence d'un nombre important de résidus cystéine dans les protéines PTP1 et PTP2. L'utilisation de cross-linker chimiques (DSP et EGS) sur des extraits protéiques réalisés en présence de DTT, a permis de mettre en évidence un complexe multimérique contenant notamment PTP1, PTP2 et PTP3 (**Peuvel et al., 2002**). L'édification du tube polaire impliquerait des ponts disulfure entre les deux protéines majoritaires PTP1 et PTP2. L'absence de cystéine dans la séquence primaire de PTP3 implique une interaction avec les autres PTPs indépendamment des ponts disulfure. De plus, PTP3 présente de nombreux résidus chargés ce qui suggère une liaison *via* des interactions ioniques. PTP3 pourrait jouer un rôle dans l'extrusion du tube polaire en tant que réponse spécifique à un stimulus de type ionique (**Peuvel et al., 2002**).

Les premières expériences de double hybride chez la levure n'ont cependant pas permis d'identifier des interactions directes entre les protéines PTP1, PTP2 et PTP3 d'*E. cuniculi* (thèse I. Peuvel, 2002).

II.3.4. Morphogenèse du tube polaire

Le début de la mise en place du tube polaire a lieu au cours de la sporogonie. Le tube émerge de structures réticulaires denses aux électrons et énigmatiques qui semblent provenir de l'appareil de Golgi (Takvorian et Cali, 1996). L'enveloppe et les différentes couches concentriques se mettent ensuite en place. Les PTPs identifiées chez *E. cuniculi* présentent toutes un peptide signal à leur extrémité N-terminale indiquant que ces protéines doivent emprunter la voie classique du réticulum endoplasmique-Golgi. Cependant, des observations réalisées chez *Enterocytozoon bienewisi* montrent que les précurseurs du tube polaire sont des vésicules particulières d'origine inconnue (Desportes-Livage *et al.*, 1991 ; Hilmarsdottir *et al.*, 1993).

II.4. Systèmes d'extrusion chez d'autres organismes

Deux systèmes d'extrusion retrouvés chez les myxosporidies et les cnidaires sont apparentés au tube polaire des microsporidies. Le filament polaire contenu dans les capsules polaires des myxosporidies qui présente des homologies structurales avec le tube polaire et le nématocyste des cnidaires dont le mécanisme de dévagination est proche de celui des microsporidies.

II.4.1. Filaments polaires et capsules polaires chez les myxosporidies

Parasites de poissons, les myxosporidies regroupent environ 1300 espèces réparties en 55 genres. En raison de leur aptitude à former des spores présentant un filament polaire, les

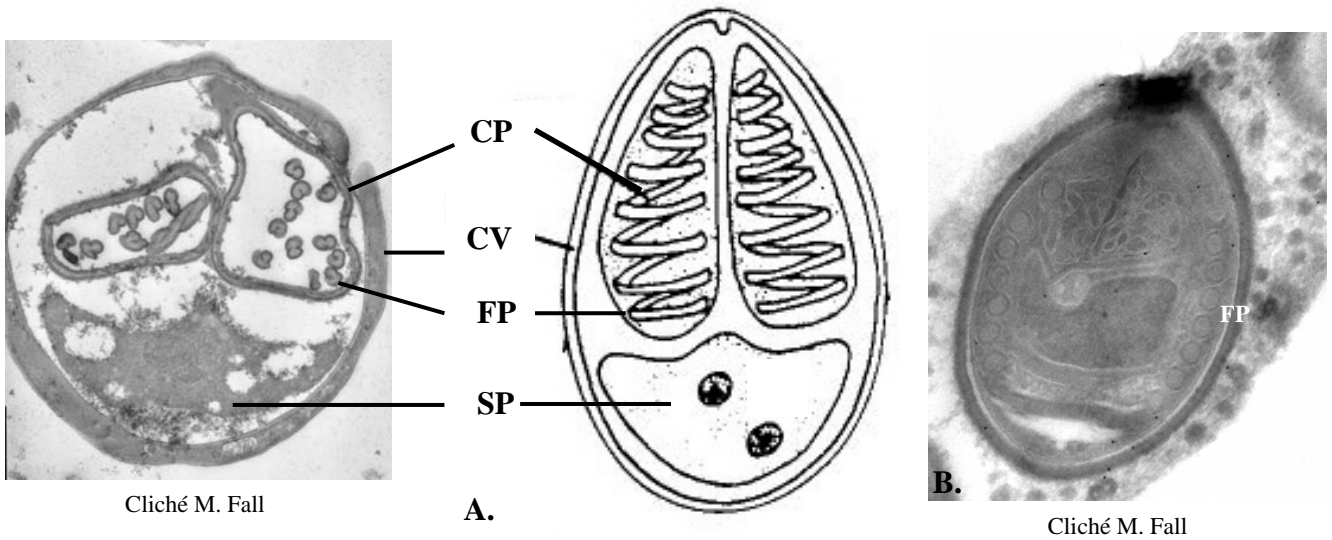


Figure 16. Filament polaire chez les myxosporidies. (A) Coupe en microscopie électronique à transmission et représentation schématique d'une spore de myxosporidie. La spore comprend trois types cellulaires : des cellules valvaires formant l'enveloppe sporale, les cellules polaires à l'intérieur desquelles un filament polaire est enroulé et le sporoplasme. CV: cellules valvaires, CP : capsules polaires, SP : sporoplasme binucléé. (B) Coupe en microscopie électronique à transmission d'une capsule polaire contenant un filament polaire (FP) enroulé à l'intérieur de la capsule.

myxosporidies furent initialement considérées comme des protozoaires parasites au même titre que les microsporidies. Elles sont désormais reconnues comme des Métazoaires en raison de leur caractère multicellulaire ce qui est confirmé par des analyses phylogénétiques réalisées à partir des séquences de la petite sous unité 18S de l'ARNr. Des similitudes de structure et de développement sont également observées entre la capsule polaire des myxosporidies et le nématocyste des cnidaires. Ceci suggère que les myxosporidies seraient des cnidaires qui auraient fortement divergés et se seraient adaptées à la vie parasitaire. Ces données sont confirmées par les analyses phylogénétiques qui suggèrent que les myxosporidies auraient émergées après les cnidaires (revue par **Canning et Okamura, 2004**).

Le stade sporal des myxosporidies présente trois types de cellules (**Fig. 16**) : les cellules valvaires formant l'enveloppe sporale, les cellules capsulaires ou capsules polaires, dont le nombre varie de 1 à 4, contenant chacune un filament polaire et les cellules germinatives ou sporoplasme binuclé qui présentent une organisation cellulaire typiquement eucaryote. La présence d'un filament polaire enroulé à l'intérieur des capsules polaires rappelle la structure des spores microsporidiennes. Sous l'action de stimuli encore mal déterminés, le filament polaire subit une extrusion permettant un accrochage de la spore à la cellule hôte. Les cellules valvaires s'ouvrent et le sporoplasme binucléé peut alors pénétrer dans les cellules de l'épiderme et initier un nouveau cycle de multiplication. Contrairement aux microsporidies chez lesquelles le tube polaire assure le transfert du sporoplasme vers la cellule cible, le filament polaire des myxosporidies est uniquement impliqué dans l'attachement à une nouvelle cellule hôte.

Ces parasites, pathogènes chez de nombreux poissons d'élevage, sont à l'origine de graves problèmes économiques. Ils présentent en général une spécificité d'hôte et de tissu. Ainsi, l'espèce *Myxobolus cerebralis*, agent étiologique de la « whirling disease » atteint les tissus cartilagineux des salmonidés. Son développement n'est pas intracellulaire mais

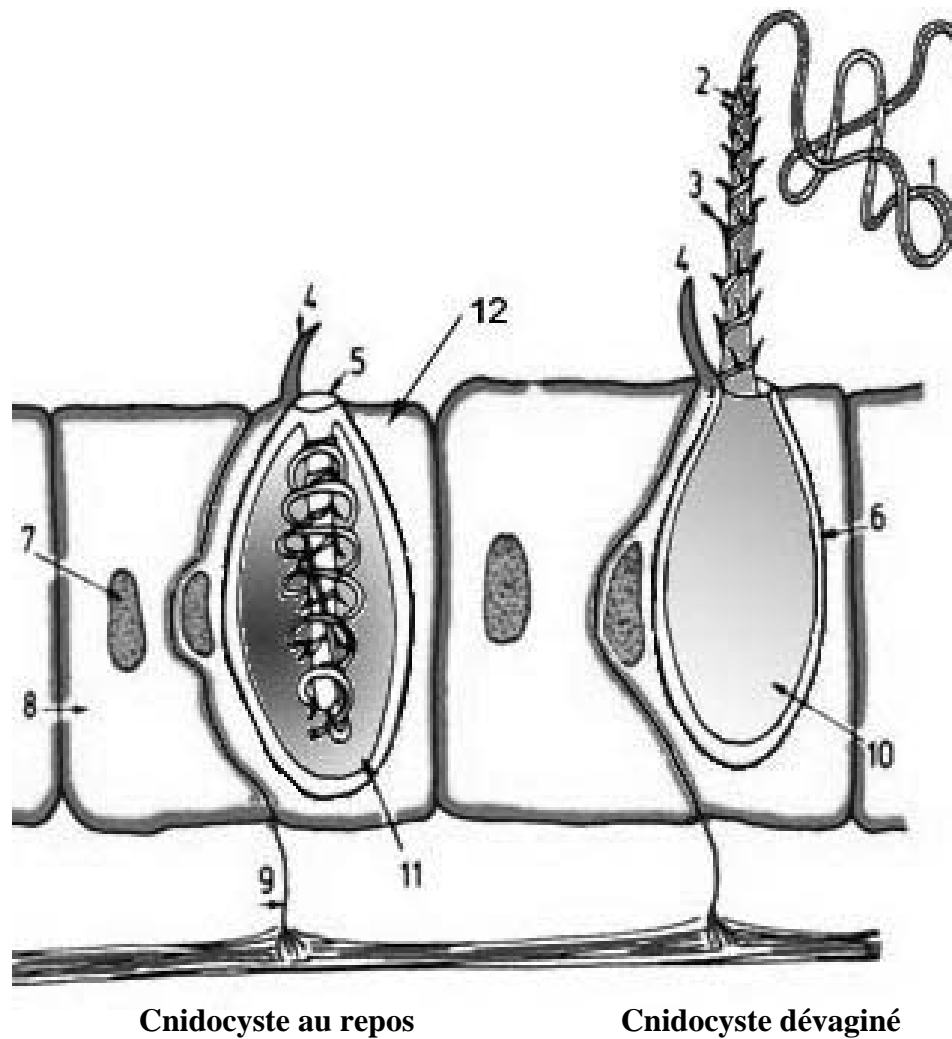


Figure 17. Schéma d'un cnidocyte (ou nématocyste) de cnidaire. A gauche avant la décharge et à droite après la décharge suite à un stimulus. Lorsque qu'un organisme effleure le cnidocil (4), l'opercule s'ouvre (5). Le filament (1) est expulsé et atteint sa victime lui administrant le poison contenu dans la cavité (10 et 11). En effet, sous l'effet de la pression du liquide interne veineux (11) le filament urticant se dévagine comme un doigt de gant inversé. Les épines déchirent alors les tissus de la victime. Le filament s'enfonce dans son corps et se comporte comme une aiguille inoculant le venin. Ce mécanisme dure quelques millièmes de secondes. 1. Filament urticant. 2. Tube présentant à sa surface des épines (3). Les épines servent de percuteur. 4. Cnidocil. 5. Opercule. 6. Cnidocyte ou nématocyste. 7. Noyau de la cellule urticante (8). 9. Ramification nerveuse. 10. Cavité du cnidocyte ou ampoule à venin. 11. Poison sous pression. 12. Cnidocyte. (http://vieocean.free.fr/paf/images/b3_37.jpg).

intercellulaire, au niveau de la matrice des cellules hôtes. *M. cerebralis* produit des spores mesurant entre 7 et 10 μm qui présentent deux capsules polaires au pôle antérieur, chacune contenant un filament polaire enroulé en 5 à 6 tours de spires (**Fig. 16B**). Malgré des ressemblances de structure avec le tube polaire des microsporidies, aucune donnée de séquence des protéines constituant les filaments polaires n'est disponible. **Clouthier et al. (1997)** ont caractérisé chez la myxosporidie *Henneguya salminicola*, la séquence N-terminale de deux antigènes de 30 et 32 kDa localisés à la surface de la spore. Des études de localisation ont montré que des protéines du cytosquelette (F-actine et β -tubuline) sont impliquées dans le mécanisme de décharge (**Uspenskaya et Raikova, 2004**). Récemment, il a été montré que *M. cerebralis* est capable d'adhérer à différents carbohydrates (lactose, fucose, galactose, N-acétyl-galactosamine, N-acétyl-glucosamine, **Knaus et Matbouli, 2005**). Cette activité pourrait être impliquée dans la spécificité d'hôte, l'attachement ou l'invasion *via* une reconnaissance glycanes-lectines.

II.4.2. Les nématocystes ou cnidocystes chez les cnidaires

Les cnidaires sont des métazoaires diploblastiques essentiellement marins (méduses, anémone, coraux) caractérisés par la présence de cellules urticantes appelées cnidocytes ou nématocytes. Ces cellules sensorielles et sécrétrices contiennent un appareil explosif, le cnidocyste ou nématocyste. Celui-ci est composé d'une capsule ovoïde limitée par une paroi rigide et résistante composée d'une double membrane fermée à l'un des deux pôles par un opercule. A l'intérieur, se trouve un tube creux inversé enroulé selon 15 spires et terminé par un long fil présentant sur sa surface externe des épines (**Fig. 17**). Ces sécrétions sont impliquées dans l'adhésion à un support lors de la locomotion, la capture de nourriture et la défense contre la prédation. En réponse à un contact avec un corps étranger, le nématocyste se

contracte entraînant la dévagination en doigt de gant du filament urticant (**Kass-Simon et Scappaticci, 2002**).

Chez *Hydra attenuata* Pall, ce mécanisme d'exocytose, réalisé en moins de 3 ms, est déclenché par une proie : la capsule s'ouvre, les trois stylets du nématocyste sont éjectés et se rejoignent pour perforer le tégument de la proie. Le long tube mince subit alors une dévagination dans le corps de la proie libérant des toxines qui provoquent la paralysie et la mort de la proie (**Holstein et Tardent, 1984**). Le mécanisme de dévagination pourrait résulter de la dissociation d'une macromolécule créant un grand nombre de molécules osmotiquement actives à l'origine du gonflement de la capsule et de son ouverture. Les ions Ca^{2+} jouent un rôle dans l'évagination puisque des agents bloquant les canaux calciques inhibent la décharge des nématocystes. La capsule, qui contient un liquide fortement concentré en Ca^{2+} (600 mM/kg de poids sec) est perméable à l'eau ce qui permet de maintenir la turgescence mais une pression insuffisante pour la décharge. En présence du stimulus approprié un déplacement de Ca^{2+} a lieu, provoquant une augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de la capsule. L'augmentation du volume du nématocyste serait à l'origine d'une dévagination explosive de la structure tubulaire (**Lubbock et al., 1981 ; Kass-Simon et Scappaticci, 2002**).

Les données moléculaires des constituants des nématocystes restent limitées. La spinaline, protéine de 24 kDa riche en glycine et histidine a été localisée au niveau des épines présentes sur la surface externe du tube ainsi qu'au niveau de l'opercule des nématocystes d'hydres. Cette protéine est insoluble en présence d'agents réducteurs (**Koch et al., 1998**). Au niveau de la paroi interne de la capsule, 4 protéines de type mini-collagène ont également été identifiées. Ces protéines, riches en proline, hydroxyproline et glycine, présentent aux deux extrémités des domaines riches en cystéines impliqués dans la formation d'un trimère *via* des ponts disulfure. Elles permettent ainsi de stabiliser la structure (**Kurz et al., 1991**). La

glycoprotéine NOWA (Nematocyst Outer Wall Antigen), composant majeur de la paroi, présente, comme les mini-collagènes, une extrémité C-terminale riche en cystéine impliquée dans l'auto-assemblage et l'interaction avec les protéines mini-collagène (**Engel et al., 2002 ; Ozbek et al., 2004**).

III. Transfection et génétique inverse

Alors que la génétique dite classique consiste, à partir d'un phénotype caractéristique, à identifier le(s) gène(s) responsable(s) de celui-ci, la génétique inverse consiste à cibler un gène d'intérêt et à caractériser le phénotype qui résulte de l'inactivation ou de la modification de ce gène. Les techniques de génétique inverse, qui permettent de manipuler les gènes et d'étudier la fonction de leur produit, ont été développées chez de nombreux eucaryotes notamment chez des parasites unicellulaires tels que *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* ou les Trypanosomes. Les applications sont nombreuses, les plus courantes concernent l'identification de régions régulatrices, la localisation de protéines d'intérêt ou encore l'inactivation de gènes par des stratégies de knock out (KO) par recombinaison homologe. Dans le cas de gènes essentiels, des approches alternatives telles que le KO conditionnel ou l'ARN interférence peuvent aussi être utilisées.

La première étape nécessite de développer un système de transfection du microorganisme ou de la cellule d'intérêt. Le terme transfection désigne l'introduction d'une molécule d'ADN étranger dans une cellule eucaryote cultivée *in vitro*, le terme transformation étant préférentiellement utilisé dans le cas des bactéries. Pour permettre l'expression du transgène dans l'organisme d'intérêt, il est nécessaire de connaître les éléments de séquences nécessaires pour le contrôle de l'expression des gènes et leur régulation.

Actuellement, aucune technique de transfection n'est disponible pour l'étude des microsporidies. Dans le but de mettre au point une telle technologie, nous ferons, dans une

première partie, l'état des lieux des connaissances disponibles concernant les signaux impliqués dans les mécanismes de transcription et de traduction. Nous nous limiterons ensuite à décrire les principales techniques de transfection et leurs applications chez quelques parasites eucaryotes unicellulaires.

III.1. Signaux de transcription et traduction

III.1.1. La transcription des ARNm

III.1.1.1. Chez les eucaryotes

La transcription est la première étape pour l'expression d'un gène. Chez les eucaryotes, la transcription débute par la reconnaissance de séquences localisées au niveau du promoteur (séquences *cis*) et l'assemblage d'un complexe multiprotéique d'initiation au point de départ de la transcription. Plusieurs régions situées en amont du site d'initiation sont de grande importance pour la transcription : la TATA box (TATAAAA), située 25 bases en amont du site d'initiation fixe le facteur de transcription TFIID. La boîte GC (régions -110 et -40) peut se présenter sous la forme d'hexanucléotides (GGGCGG) répétés plusieurs fois. Enfin, la boîte CAAT (régions -120 et -80) peut être située avant ou après une boîte GC ou entre deux boîtes GC. L'association facteurs transactivateurs/éléments *cis* permet de recruter de façon efficace l'ARN polymérase II.

Les ARNm néosynthétisés subissent deux modifications ayant un rôle dans leur stabilité et leur protection ainsi que dans la traduction : l'addition d'une coiffe en 5' et la polyadénylation en 3'. Chez les eucaryotes, les précurseurs des ARNm débutent par un nucléoside triphosphate adénylique ou guanylique. Cette extrémité 5' est bloquée dès le début de la transcription par l'addition d'un résidu guanylique qui est ensuite méthylé pour constituer la coiffe, indispensable pour empêcher leur dégradation en 5' par des phosphatases ou des exonucléases. De plus, cette coiffe favorise la formation du complexe d'initiation de la

traduction. Les signaux de terminaison de la transcription ne sont pas bien connus chez les eucaryotes. Après synthèse, les ARNm sont clivés par une endonucléase dans leur partie 3', une vingtaine de bases en aval d'une séquence spécifique AAUAAA. Après coupure, une poly(A) polymérase permet la polyadénylation de l'extrémité 3' en ajoutant un nombre variable de A (revue par **Ogbourne et Antalis, 1998**).

III.1.1.2 Chez les protozoaires

Chez les Apicomplexa comme *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*, les différents éléments cis comme la TATA box ou la CAAT box ne sont pas conservés (revue par **Meissner et Soldati, 2005**). En revanche un motif composé de 6 répétitions de 27 pb avec comme consensus central TGAGAGC semble impliqué dans l'initiation de la transcription du gène *sag1* (**Soldati et Boothroyd, 1995**). D'autres promoteurs présentent cette séquence ce qui suggère que ce motif fonctionne comme sélecteur de l'initiation de la transcription. Chez *Plasmodium*, l'étude du génome et les expériences de transfection ont permis d'identifier un îlot G-box palindromique (**Militello et al., 2004**). De nombreux composants de la machinerie de transcription eucaryote ont été mis en évidence chez *T. gondii* et *P. falciparum*. Cependant certaines exceptions méritent d'être soulignées comme par exemple l'absence de la plupart des facteurs co-activateurs TFIIA, TFIIE β , TFIIF et de la plupart de facteurs associés à TBP. Ceci suggère l'existence d'un appareil de transcription primitif différent de la machinerie transcriptionnelle des autres eucaryotes qui peut résulter d'une perte ou d'une simplification ou du fait que ces facteurs, dont les séquences sont trop divergentes, n'ont pu être identifiés. Pour de nombreux transactivateurs comme VP16 du virus l'herpès simplex virus, plusieurs interactions avec des facteurs de transcription (TFIIA, TFIIB, TFIID ou TFIIH) et un facteur associé à TBP (TAF31) ont été décrites pour l'activation *in vitro*. Aucune transactivation à l'aide de VP16 n'a pu être mise en évidence chez *T. gondii* et *P. falciparum* ce qui confirme l'absence de certains facteurs co-activateurs chez ces parasites.

Chez *Trypanosoma*, le mécanisme de transcription est exotique puisque des pré-ARNm sont synthétisés sous forme polycistronique puis des étapes de polyadénylation et de capping sont réalisées au cours du trans-splicing. Les régions intergéniques de 200 pb permettent d'assurer la polyadénylation et le capping des différents gènes du messenger polycistronique. En ce qui concerne la machinerie de transcription, certains facteurs généraux sont absents (TFIIB, TFIIF, TFIIE et certains TFIIH et TAF). La protéine TBP, protéine qui fait partie du complexe TFIID et qui s'associe à la séquence promotrice, joue un rôle universel dans la transcription des gènes eucaryotes. Chez les eucaryotes supérieurs, elle présente deux doublets de phénylalanine dans le domaine carboxy terminal conservé (CTD), ces acides aminés jouant un rôle essentiel dans la liaison à la TATA box. Chez *Trypanosoma*, la protéine TBP ne présente pas la première paire de phénylalanine ce qui suggère que cette protéine se lie différemment à l'ADN. Enfin, au niveau du domaine CTD de la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II, différentes étapes de phosphorylation des répétitions YSPTSPS coordonnent les événements de capping, splicing et de polyadénylation des ARNm. L'absence des répétitions au niveau de CTD implique que la transcription chez *Trypanosoma* est orchestrée de façon différente (revue par **Palenchar et Bellofatto, 2006**).

III.1.1.3. Chez les microsporidies

Nous disposons aujourd'hui d'une quantité importante d'informations sur le génome des microsporidies. Cependant, peu de données concernant l'expression de ces gènes et en particulier les mécanismes d'initiation de la transcription et de la traduction sont disponibles. Les gènes microsporidiens présentent des régions AT riches en amont de l'ATG et contenant deux consensus: les boîtes A (TATAWA) et B (SAAAAT) situées respectivement 20 et 30-60 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction qui peuvent être assimilées aux boîtes TATA et CAAT classiquement retrouvées au niveau des promoteurs eucaryotes (**Duffieux et al., 1998**). De plus, grâce aux nombreuses données de RACE-PCR, des

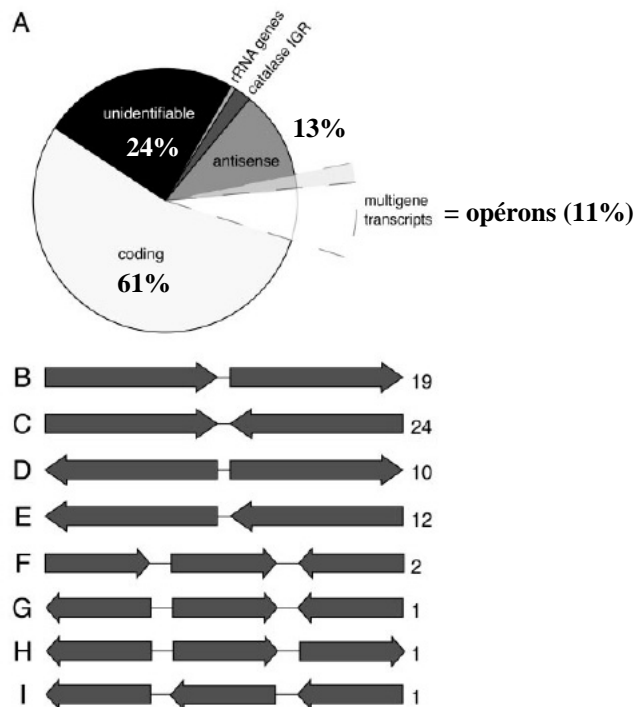


Figure 18. Distribution des différents types de messagers identifiés dans la banque d'EST d' *A. locustae*. (A) Classement des 1146 ARNm identifiés en fonction de ce qu'ils codent. 24% des messagers ne présentent aucune homologie avec des séquences connues. 1% correspondent à des fragments des opérons ARNr et 2% à des éléments répétés présents dans la région intergénique de la catalase d'*A. locustae*. 13% représentent des transcrits antisens dont 15% sont des antisens de plus d'un gène. 61% représentent des messagers sens de gènes connus dont 11% sont des transcrits contenant deux gènes ou plus en orientation sens ou antisens. (B-I) Représentation schématique des transcrits codant pour plus d'un gène. Le chiffre à droite indique le nombre d'exemples identifiés pour chaque cas. Tous les messagers sont orientés avec la queue polyA à droite (d'après Williams *et al.*, 2005).

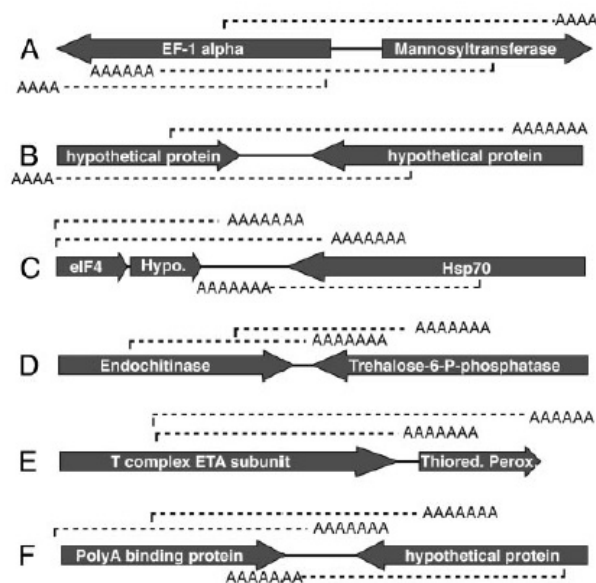


Figure 19. Exemple de messagers identifiés dans la banque d'EST d'*A. locustae*. Les flèches grises représentent la position et l'orientation des gènes dans leur contexte génomique (le nom des gènes est mentionné). Les pointillés, orientés par la queue polyA, indiquent les transcrits détectés dans la banque d'EST (d'après Williams *et al.*, 2005).

informations concernant les régions 5' et 3' UTR ont pu être collectées. Ainsi, les microsporidies à l'instar des protozoaires amitochondriaux du genre *Entamoeba*, *Trichomonas* ou *Giardia* possèdent des ARNm avec des séquences leader très courtes riches en AT (de 3 nt pour *ptp1* à 172 nt pour *ptp3*, **Katiyar et al., 1995 ; Delbac et al., 2001 ; Peuvel et al., 2002**). Signalons également que l'ensemble des messagers étudiés sont polyadénylés. Un consensus pour le signal de polyadénylation caractéristique des eucaryotes AATAAA a pu être caractérisé pour de nombreux transcrits. Cependant, pour d'autres transcrits, certains signaux présentent une dégénérescence (AATTAAA pour *ptp2* ; TATAAA pour *Eiswpl1*) qui pourrait être à l'origine d'un mauvais recrutement de la machinerie impliquée dans le clivage et la polyadénylation (**Delbac et al., 2001 ; Hayman et al., 2001**). Les régions 3' non traduites présentent également des tailles variables (25 à 175 nt, **Broussolle et al., 1999 ; Delbac et al., 2001, Peuvel et al., 2002**).

Récemment, **Williams et al. (2005)** ont caractérisé un mécanisme original de transcription des gènes chez la microsporidie *A. locustae*. L'analyse d'une banque d'EST a permis d'identifier des messagers codant pour plus d'un gène indiquant la présence d'opéons (**Fig. 18**). L'ensemble des données collectées suggère la présence de signaux de terminaison de la transcription non pas dans la région 3'UTR mais au niveau des séquences adjacentes en aval de la région 3'UTR voire même dans la séquence codante du gène aval. Dans certains cas, les messagers identifiés commencent par un antisens suggérant que l'initiation de la transcription a lieu dans le gène amont (**Fig. 19**). L'existence d'un tel mécanisme souligne la difficulté à identifier les signaux nécessaires à la régulation de la transcription.

Le séquençage du génome d'*E. cuniculi* a cependant révélé la présence des composants de la machinerie de transcription typiquement eucaryote : ARN polymérase II, facteurs de transcription TFIIA, TFIID qui se lie à la TATA box, TFIIE, TFIIIF et la plupart des sous-unités de TFIIH. Les acteurs permettant la formation de la coiffe en 5' sont également

présents tout comme une polyA polymérase qui confirme la polyadénylation des ARNm (**Katinka et al., 2001 ; Hausmann et al., 2002**).

III.1.2. La traduction

Chez les procaryotes, une séquence appelée Shine-Dalgarno (SD, AGGAGG) localisée en position -10 est impliquée dans la fixation de la sous-unité 30S du ribosome. Chez les eucaryotes, aucun signal situé en amont de l'AUG et permettant de fixation de la sous-unité 40S n'a été caractérisé. La sous-unité 40S se fixe à l'extrémité 5' de l'ARNm grâce à des facteurs appelés Cap Binding Protein puis la sous unité ribosomale se déplace de façon linéaire le long de l'ARNm jusqu'au codon d'initiation, le plus proche de l'extrémité 5', réalisant ainsi un « scanning » de l'ARNm vers l'extrémité 3' (revue par **Kozak, 2005**).

La plupart des ARNm des eucaryotes présentent cependant un contexte qui facilite la reconnaissance de l'AUG par la sous unité 40S. Chez les vertébrés, cette séquence appelée séquence de Kozak est GCCRCCATGG où R est une purine. Chez les sporozoaires parasites une autre séquence consensus a été caractérisée : T/ANAAAA ATG A. Dans ce consensus, le résidu A en position -3 joue un rôle prépondérant ; il serait lu par la sous unité ribosomale 40S comme un signal permettant d'initier la synthèse protéique au bon codon AUG. Un rôle de certains résidus situés en aval de l'ATG, comme par exemple le G en position +4 par rapport à l'ATG, est également suggéré (**Kozak, 1987 ; Yamauchi, 1991**). Chez *T. gondii*, l'analyse de plusieurs régions 5' UTR a permis de définir une nouvelle séquence consensus qui diverge de celle définie pour les eucaryotes supérieurs : gNCAAa ATG g (**Seeber, 1997**).

Les gènes des protozoaires amitochondriaux présentent des séquences 5' UTR très courtes au niveau desquelles aucune séquence consensus n'a pu être définie. La présence de séquences 5' UTR courtes empêche le scan de la région 5' UTR par la sous-unité 40S ce qui suggère un mécanisme unique d'initiation de la traduction. Une séquence TTCA située en

amont de l'AUG favoriserait la liaison des ribosomes (**Katiyar et al., 1995**). Chez les microsporidies, on peut donc imaginer que le ribosome couvre à la fois la coiffe à l'extrémité 5' et le codon AUG initiateur. Un nombre important de messagers ont un motif proche du consensus dégagé par Yamauchi (1991) mais il n'est pas présent dans l'environnement proche du codon l'AUG. Chez *E. coli*, une séquence consensus appelée Downstream Box (DB, CAUGACUGGUGGA) localisée en aval de l'ATG joue le rôle d'enhancer de la traduction et semble suffisante pour promouvoir la traduction indépendamment de la séquence Shine-Dalgarno. De plus, elle est complémentaire de la séquence 3' de l'ARNr 16S (séquence anti-DB) ce qui permet d'optimiser la traduction en plaçant l'AUG près de la région de lecture (**Sprengart et al., 1996**). De nombreux gènes d'*E. cuniculi* présentent une boîte DB (5'-AGGA-3') en aval de l'AUG ce qui suggère que l'initiation de la traduction aurait lieu à partir d'une séquence aval (**Duffieux et al., 1998**). Cette hypothèse est renforcée par la présence d'une séquence complémentaire (3'-GUCCUG-5') au niveau de l'ARNr 16S.

III.2. Les principales techniques de transfection

Les macromolécules d'ADN chargées négativement ne pouvant être délivrées dans les cellules cibles par simple diffusion, il est nécessaire d'utiliser des techniques telles que la lipofection, la magnétofection, l'électroporation, la biolistique ou la micro-injection.

III.2.1. Lipofection et magnétofection

La lipofection consiste à utiliser des liposomes cationiques comme vecteurs pour transférer des cellules eucaryotes. L'ADN est encapsulé dans des vésicules phospholipidiques artificielles pour former des complexes appelés lipoplexes (**Fig. 20A**). Les charges positives présentes à la surface des lipoplexes vont permettre une interaction avec les protéoglycanes chargés négativement présents à la surface des cellules. Ils sont ensuite

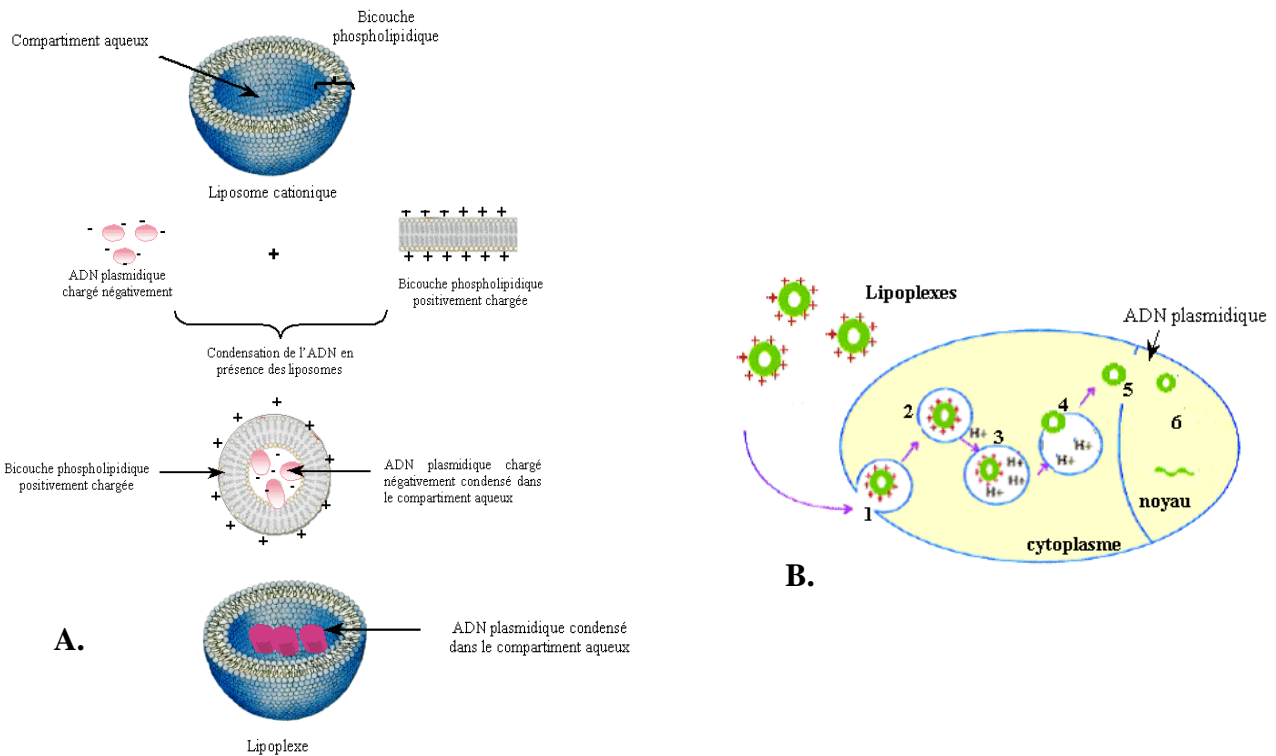


Figure 20. Principe de la lipofection. (A) Schéma expliquant la formation des lipoplexes, complexes liposomes cationiques/ADN. Elle repose sur une condensation de l'ADN chargé négativement au niveau des groupements phosphates avec la bicouche phospholipidique chargée positivement en raison des têtes cationiques (d'après Felgner *et al.*, 1997). (B) Mécanisme de transfection par lipofection. Les lipoplexes sont transférés dans la cellule cible au cours de différentes étapes. 1. Endocytose des lipoplexes dans la cellule cible. 2. Formation des endosomes. 3. L'acidification du contenu des endosomes n'a aucun impact sur l'ADN car il est protégé par le lipoplexe. 4. L'accumulation des composés cationiques dans les endosomes protège contre la dégradation par les enzymes endosomales et induit le relargage de l'ADN plasmidique à proximité du noyau. 5. Translocation dans le noyau par l'intermédiaire de pores nucléaires. 6. L'ADN contenu dans le noyau peut se décompacter et être reconnu par la machinerie cellulaire pour être transcrit (d'après Vijayanathan *et al.*, 2002).

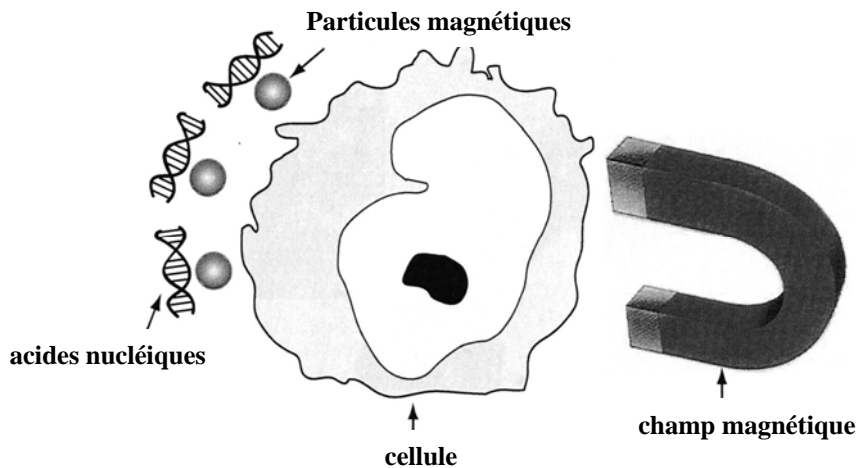


Figure 21. Principe de la magnétofection. Les acides nucléiques sont incubés avec les nanoparticules magnétiques pour former des complexes nanoparticules/ADN. Ces complexes sont mis en contact avec les cellules à transfecter qui sont ensuite placées entre la source magnétique et les acides nucléiques associés à des nanoparticules magnétiques. Le champ magnétique induit un mouvement des vecteurs vers la surface des cellules et leur accumulation à la surface des cellules permet d'améliorer l'efficacité de transfection. L'entrée dans les cellules n'est pas due aux nanoparticules magnétiques mais est identique à la lipofection (endocytose et voie d'entrée naturelles) (d'après Plank *et al.*, 2003).

internalisés dans la cellule par endocytose, les composés cationiques protégeant l'ADN de la dégradation par les enzymes lysosomales. L'accumulation de ces complexes déstabilise les endosomes ce qui induit une libération de l'ADN à proximité du compartiment nucléaire. La translocation de l'ADN dans le noyau se fait alors *via* les pores nucléaires (**Fig. 20B**). Les lipoplexes peuvent également pénétrer dans la cellule cible par fusion avec la membrane plasmique. La lipofection est couramment utilisée pour la transfection des cellules de mammifères en culture mais très rarement pour la transfection des parasites eucaryotes (**Strain, 2006**). Une utilisation pour la transfection des trophozoites d'*Entamoeba histolytica* a cependant été décrite (**Olvera et al., 1997**).

Une adaptation de la lipofection, appelée magnétofection, a récemment été développée. Elle consiste à exercer une force magnétique sur des nanoparticules magnétiques auxquelles sont associées les molécules d'ADN d'intérêt. Cette technique de transfection peut se faire en présence ou non d'un agent de lipofection. Composées d'oxyde de fer, les nanoparticules présentent une taille compatible (50 à 200 nm) avec l'incorporation cellulaire et la progression intracellulaire. Les cellules à transférer sont incubées avec les complexes billes magnétiques/ADN puis placées sur la source magnétique (**Fig. 21**). Le champ magnétique induit alors un mouvement des complexes vers les cellules cibles favorisant alors leur accumulation à la surface des cellules. L'entrée dans les cellules se réalise comme dans le cas des lipoplexes. Les nanoparticules magnétiques s'accumulent ensuite dans le noyau (revue par **Plank et al., 2003**). Cette technique permet d'augmenter l'efficacité de transfection de cellules de mammifères car l'application du champ magnétique favorise le contact entre une plus grande quantité de vecteur et la surface des cellules cibles (**Sherer et al., 2002 ; Krotz et al., 2003**). A l'heure actuelle aucune utilisation de la magnétofection pour la transfection de protozoaires n'a été décrite.

III.2.2. L'électroporation (ou électroperméabilisation)

Elle consiste à appliquer une brève impulsion électrique qui dépolarise la membrane plasmique et crée une ouverture temporaire de pores appelés électropores. Durant cette période, la membrane est très perméable à de petites molécules comme les ions, l'eau mais aussi à des macromolécules comme l'ADN. La cellule va ensuite refermer les électropores de façon spontanée, piégeant l'ADN à l'intérieur du cytoplasme de la cellule. Cette méthode non invasive et non chimique n'altère pas la structure biologique et la fonction de la cellule cible. Elle est largement utilisée lors de la transformation de bactéries et de parasites protozoaires (Miller, 1994 ; Davis-Hayman et Nash, 2002 ; Gardiner *et al.*, 2003).

Créant des pores au niveau de la membrane, l'électroporation rend les cellules très sensibles à l'osmolarité et la composition ionique du milieu. Une meilleure survie des cellules est observée lorsqu'elles sont placées dans un environnement qui ressemble à la composition ionique intracellulaire. Il facilite l'élimination des électropores et donc la restauration de la membrane (van den Hoff *et al.*, 1992). L'efficacité de la transfection de certains parasites tels que *T. gondii* ou *Plasmodium* est ainsi améliorée en présence d'un tampon appelé « cytomix » qui permet de limiter la fuite des composants du cytoplasme et de protéger les membranes contre l'oxydation (Soldati et Boothroyd, 1993 ; Goonewardene *et al.*, 1993).

Récemment, une adaptation de l'électroporation, appelée nucléofection, a été décrite. Cette méthode d'électroporation permet de délivrer directement l'ADN dans le noyau des organismes cibles. Utilisée chez *Plasmodium berghei* et *P. yoelii*, la nucléofection permet d'augmenter considérablement l'efficacité de transfection d'un facteur 10^4 à 10^6 (Janse *et al.*, 2006 ; Jongco *et al.*, 2006).

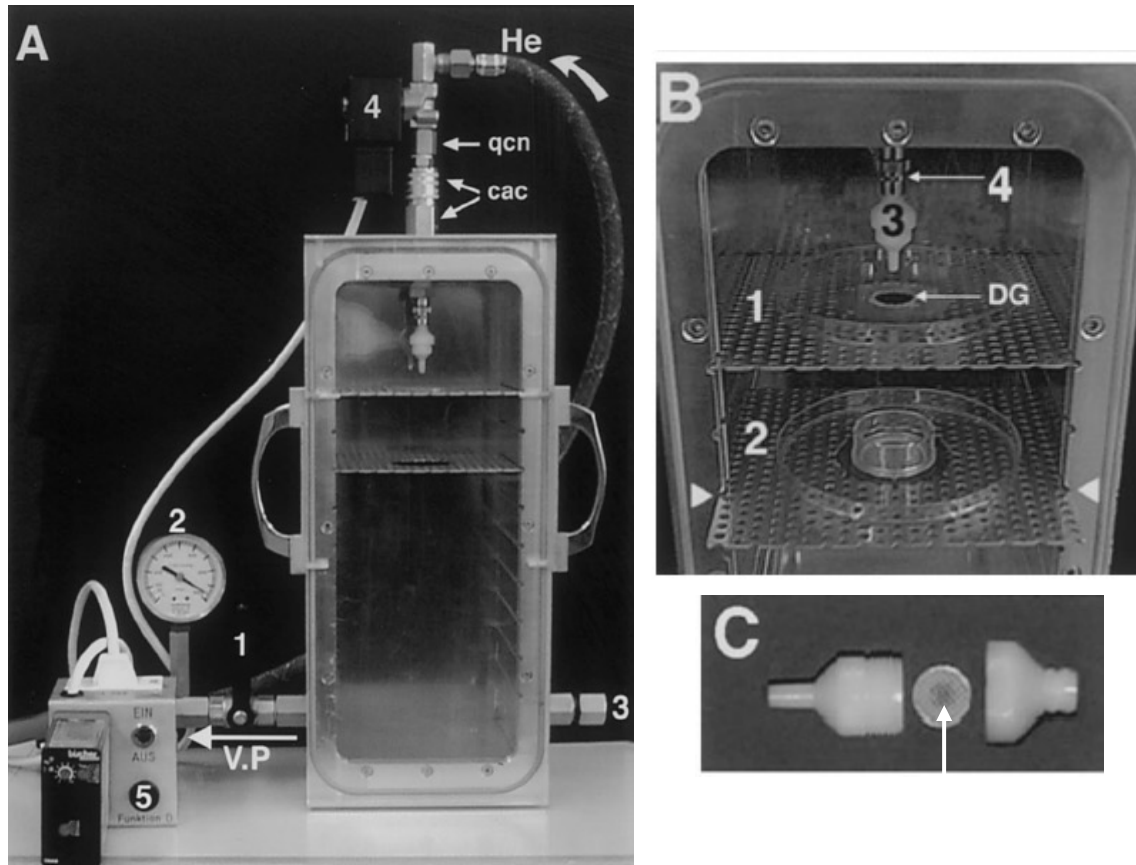


Figure 22. Illustration du canon à particules utilisé pour la biolistique. (A) La chambre présente un levier permettant de stopper le vide (1) ainsi qu'une jauge de vide (2) reliée à une sortie de la chambre menant à la pompe à vide (VP). Une valve permettant l'entrée d'air (3) est utilisée pour égaliser la pression dans la chambre après l'application du vide. Le vide est appliqué par un tuyau connecté directement à la valve solénoïde (4). Celle-ci est reliée au haut de la chambre par un système (qcn et cac) assurant un attachement/détachement rapide et facile de la valve à la chambre de micro-projection. (5) Un relais (fixé à 50 ms) contrôle la sortie d'hélium à partir de valve solénoïde. **(B)** Agrandissement de la partie supérieure de la chambre de micro-projection montrant l'emplacement des plateaux à différents niveaux (flèches). Le niveau 1 (1) est utilisé pour placer une plaque dite de dispersion (DG). La seconde plaque placée au niveau 3 (2) est utilisée pour déposer les échantillons pour la transfection. **(C)** Image du détendeur (cartouche) ouvert contenant un filtre sur lequel de l'ADN lié à des billes d'or a été déposé au centre du filtre (région noire indiquée par une flèche, d'après Ibrahim *et al.*, 2000).

III.2.3. La biolistique (ou balistique biologique)

La biolistique correspond au bombardement de cellules par des microbilles de métal (or ou tungstène) à l'aide d'un canon à particules (**Fig. 22**). Ces microbilles (0,2 à 1 µm de diamètre), enrobées d'ADN, sont ainsi projetées à grande vitesse et peuvent traverser la membrane ou la paroi des cellules à transformer. Une fois dans le noyau, l'ADN peut se séparer de la bille micro-porteuse et être reconnu par la machinerie transcriptionnelle de la cellule cible. Cette technique est utilisée pour la transformation de plantes, de tissus animaux, de bactéries, de levures, de champignons et d'organelles comme les mitochondries (**Lorence et Verpoorte, 2004 ; Smith *et al.*, 2002 ; Johnston et DeVit, 1996 ; Johnston *et al.*, 1988**). Elle est également applicable à des parasites tels que *Leishmania* (**Sbicego *et al.*, 1998**).

III.2.4. Les autres techniques de transfection

La micro-injection consiste à introduire de l'ADN dans une cellule à l'aide d'une aiguille microscopique. Cette technologie est très utilisée pour créer des animaux transgéniques. Elle est également utilisée dans le cas de la paramécie pour micro-injecter des transgènes directement dans le macro-noyau (**Gilley *et al.*, 1988**).

Les vecteurs viraux, utilisés pour la transfection de cellules de mammifères, sont principalement des rétrovirus ou des adénovirus recombinants. Une partie du génome viral essentiel à la réplication du virus est remplacée par la cassette d'expression. Les virus rendus inaptes pour la réplication infectent la cellule cible : la transcription du gène d'intérêt a lieu par la machinerie de transcription de la cellule hôte comme dans le cas d'un virus normal. Les rétrovirus présentent en plus la capacité d'insérer leur génome dans celui de l'hôte (revue par **Hendrie et Russell, 2005**). Chez les protozoaires, l'utilisation de virus a été décrite pour la transfection de *Giardia lamblia* (**Yu *et al.*, 1995**).

III.3. Les principaux gènes rapporteurs utilisés

Les gènes rapporteurs sont utilisés pour mettre en évidence l'expression d'un transgène dans un organisme ou une cellule. Les produits d'expression de ces gènes sont des molécules dont la présence est facilement analysable, soit directement par émission d'une fluorescence par exemple soit, indirectement en utilisant des anticorps spécifiques du produit du gène rapporteur. Seuls quelques exemples de gènes rapporteurs seront présentés.

III.3.1. La GFP (Green Fluorescent Protein)

La GFP est une protéine extraite de la méduse *Aequorea victoria* qui absorbe à 395 nm et émet une fluorescence à 508 nm. Elle est largement utilisée en transfection car elle ne nécessite pas de cofacteurs ce qui permet de suivre son activité directement *in situ*. Ce gène rapporteur est couramment utilisé pour déterminer l'activité de régions promotrices, étudier l'expression de gènes d'intérêt, la localisation de protéines de fusion ou encore suivre les voies de sécrétions. L'activité GFP nécessite cependant un bon repliement de la protéine et la formation post-traductionnelle du cycle chromophore *via* une étape d'oxydation. Celle-ci est favorisée à fortes concentrations d'oxygène et à des températures réduites ce qui peut limiter son utilisation. Des protéines GFP mutantes ont donc été créées par des substitutions d'acides aminés autour du chromophore permettant une excitation à 488 nm et une émission de fluorescence plus importante que la GFP sauvage. En raison de ces avantages, elle est utilisée chez de nombreux parasites comme *Toxoplasma gondii* (Striepen *et al.*, 1998), *Plasmodium falciparum* (van Wye et Haldar, 1997), *Entamoeba histolytica* (Ramakrishnan *et al.*, 2001) ou *Trypanosoma cruzi* (Ramirez *et al.*, 2000).

III.3.2. La chloramphénicol acétyltransférase, CAT

Cette enzyme procaryote catalyse le transfert de groupements acétyl de l'acétylcoenzyme A vers le chloramphénicol. Son activité peut être mesurée par incubation du lysat cellulaire exprimant cette enzyme avec du chloramphénicol marqué au C¹⁴.

Le gène *cat* a été utilisé comme gène rapporteur chez *T. gondii* pour étudier différents promoteurs et a permis par exemple de montrer que l'activité CAT est 8 fois plus importante avec le promoteur SAG1 qu'avec celui de l' α -tubuline (Soldati et Boothroyd, 1993). Ce gène rapporteur a aussi été utilisé chez des parasites tels que *P. falciparum*, *E. histolytica*, *T. cruzi* et *Leishmania* dans le but d'étudier les régions régulatrices nécessaires à l'expression (Wu *et al.*, 1995 ; Nickel et Tannich, 1994 ; Kelly *et al.*, 1992).

III.3.3. La luciférase, LUC

Cette enzyme catalyse une réaction de bioluminescence impliquant comme substrat la luciférine. L'activité de cette enzyme dans un lysat cellulaire est mise en évidence par une émission de lumière. Ce gène rapporteur, utilisé pour étudier l'activité de promoteurs d'intérêt grâce à des fusions transcriptionnelles, a permis par exemple de caractériser les régions régulatrices nécessaires à l'expression d'un transgène chez *P. gallinaceum* (Goonewardene *et al.*, 1993) ou *E. histolytica* (Purdy *et al.*, 1994). Chez *Giardia lamblia*, une fusion traductionnelle avec les 18 premiers acides aminés de la Glutamate Déshydrogénase (GDH) est nécessaire pour détecter une activité luciférase (Yee et Nash, 1995).

III.3.4. La β -galactosidase

L'activité de cette enzyme, codée par le gène procaryote *lacZ*, est révélée par l'addition d'un substrat hétéroside l'orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG). Son hydrolyse par la β -galactosidase libère du galactose et de l'orthonitrophénol (ONP), produit coloré en

jaune en milieu basique. Un autre substrat fluorescent plus sensible, le chlorophénol-red-B-D-galactopyranoside (CPRG) peut également être utilisé. A titre d'exemple, chez *T. gondii*, ce gène rapporteur a permis de comparer l'activité de différents promoteurs (**Seeber et Boothroyd, 1996**).

III.3.5. La fusion avec des épitopes

De très nombreux épitopes sont utilisés pour suivre l'expression de gènes après transfection (c-Myc, V5, HA, Ty-1...). Ils sont codés par de courtes séquences d'ADN et leur présence est détectée par l'utilisation d'anticorps anti-épitope. Ils sont également très utiles pour purifier la protéine d'intérêt sur colonne d'affinité. L'épitope c-Myc correspond à une séquence de 10 aa (EQKLISEEDL) de la partie C-terminale du proto-oncogène humain c-Myc. Cette séquence est en général clonée en C-terminale des protéines d'intérêt pour ne pas interférer avec l'adressage de la protéine d'intérêt. La détection des protéines recombinantes fusionnées à c-Myc est réalisée à l'aide d'un anticorps (**Munro et Pelham, 1984**). Cet épitope est largement utilisé pour localiser les protéines d'intérêt chez *T. gondii*.

III.4. Transfection transitoire et transfection stable

La transfection transitoire correspond à l'expression d'un gène nouvellement introduit dans un organisme, non intégré dans son génome et dont l'expression diminue en fonction de la dégradation ou de la perte du transgène. La transfection stable, transmissible à la descendance, nécessite, en général, l'utilisation de gènes de résistance à des drogues pour lesquelles les cellules à transfecter sont naturellement sensibles. Ces stratégies sont d'autant plus compliquées à mettre en place dans le cas de parasites intracellulaires obligatoires car les drogues ne doivent pas être toxiques pour les cellules hôtes.

III.4.1. Les stratégies de sélection

III.4.1.1. Les antibiotiques

Certains antibiotiques peuvent être utilisés en tant qu'agents de sélection lors de la transfection d'organismes eucaryotes. Produit par *Streptomyces venezuelae* ou par synthèse *in vitro*, le **chloramphénicol** agit en bloquant la synthèse protéique en empêchant la liaison de l'acétyl-ARNt au site A de la sous-unité 50S des ribosomes. La résistance au chloramphénicol est conférée par le gène *cat* qui code pour la chloramphénicol acétyltransferase (CAT). Cette enzyme agit en liant de façon covalente un ou deux groupes acétyl dérivés de l'acétyl-S-coenzyme A sur les groupements hydroxyle du chloramphénicol, l'acétylation empêchant la liaison du chloramphénicol au ribosome. Ainsi, le gène *cat* peut être utilisé comme gène rapporteur et/ou gène de sélection chez *T. gondii* (**Soldati et Bootroyd, 1993 ; Kim et al., 1993**).

La **blasticidine S**, produite par *Streptomyces griseochromogenes*, est responsable de l'inhibition de la synthèse protéique chez les procaryotes et les eucaryotes en empêchant la formation des liaisons peptidiques. Le gène de résistance code pour une blasticidine S déaminase (BSD) et peut être utilisé comme gène de sélection chez *E. histolytica* (**Ramakrishnan et al., 2001**), *P. falciparum* (**Manoun et al., 1999**) et chez les Trypanosomatidae (**Brooks et al., 2000**).

La **puromycine** est un antibiotique qui interagit avec le site A de la grande sous-unité des ribosomes procaryotes et eucaryotes. Le gène *pac* codant pour une puromycine N-acétyltransferase (PAC) permet de résister à l'action de cette molécule. L'utilisation de cette stratégie a été décrite chez *P. falciparum* (**de Koning-Ward et al., 2001**), *Giardia lamblia* (**Singer et al., 1998**) et *T. brucei* (**Lorenz et al., 1998**).

Produite par *Streptomyces fradiae*, la **néomycine** est capable d'inhiber la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 30S des ribosomes. Un analogue de la néomycine moins

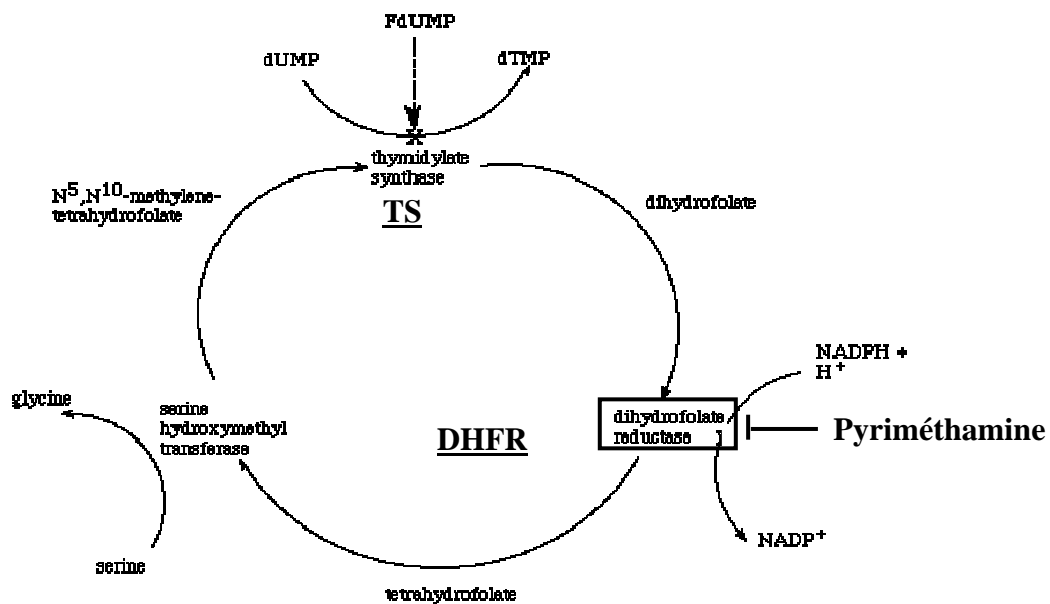


Figure 23. Site d'action de la dihydrofolate réductase (DHFR) dans la voie de biosynthèse des bases pyrimidiques. La dihydrofolate réductase (DHFR) catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate de façon NADPH dépendante. Cette enzyme est la cible de la pyriméthamine. Le tétrahydrofolate est un cofacteur essentiel pour la conversion du déoxyuridylylate (dUMP) en déoxythymidylylate (dTMP) par la thymidylylate synthétase. Le déficit en tétrahydrofolate perturbe la synthèse des bases pyrimidiques et donc la synthèse d'ADN. L'utilisation d'une DHFR résistante à la pyriméthamine ou à un antifolate, le WR99210, a permis d'envisager la mise au point d'une transfection stable chez *T. gondii* ou *P. falciparum* (modifié d'après http://www.pharmacy.umaryland.edu/courses/PHAR531/lectures_old/fig/dhfr_fig1.GIF).

toxique est couramment utilisé, le G418. Cette molécule se lie à la sous-unité 80S des ribosomes eucaryotes. La résistance à ces composés résulte de l'action d'une néomycine phosphotransférase II (NEO) codée par le gène *neo*. Ce marqueur de sélection a été utilisé chez *P. falciparum* (Mamoun *et al.*, 1999), chez les kinétoplastidae (Kelly *et al.*, 1992) ainsi que chez *Entamoeba histolytica* (Vines *et al.*, 1995). Cependant cette stratégie ne fonctionne pas chez *T. gondii* en raison d'une toxicité envers les cellules hôtes.

Enfin, dans la famille des bléomycines, **la phléomycine** est une molécule qui semble agir sur l'ADN en créant des doubles cassures inhibant ainsi la transcription et la réplication. Le gène de résistance utilisé, *Sh ble*, code pour une protéine de résistance à la phléomycine qui protège contre la dégradation de l'ADN en séquestrant la phléomycine. Cette stratégie de sélection a été utilisée pour développer une transfection stable chez *T. gondii* (Messina *et al.*, 1995) ou pour compléter des mutants délétés pour *Rop1* (Soldati *et al.*, 1995).

III.4.1.2. DHFR-TS (Dihydrofolate réductase Thymidylate synthase) et résistance à la pyriméthamine

La DHFR catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate qui intervient dans la voie de biosynthèse des bases pyrimidiques (Fig. 23). Les souches sauvages de *P. falciparum* et *T. gondii* sont naturellement sensibles à la pyriméthamine, molécule qui inhibe la DHFR et donc la biosynthèse des acides nucléiques. Des souches de *P. falciparum* naturellement résistantes à la pyriméthamine présentent des mutations au niveau du gène codant pour la DHFR, mutations qui sont conservées dans des souches de *T. gondii* résistantes à cette molécule. Les mutations impliquées dans la résistance à la pyriméthamine entraînent 3 changements en aa (Ser36 en Arg, Thr83 en Asn et Phe245 en Ser). L'utilisation d'une DHFR mutante résistante à la pyriméthamine a ainsi été envisagée pour la mise au point d'une transformation stable chez *T. gondii* (Donald and Roos, 1993). Cette même stratégie a été développée chez *P. falciparum* en utilisant soit le gène codant la DHFR isolé de souches de

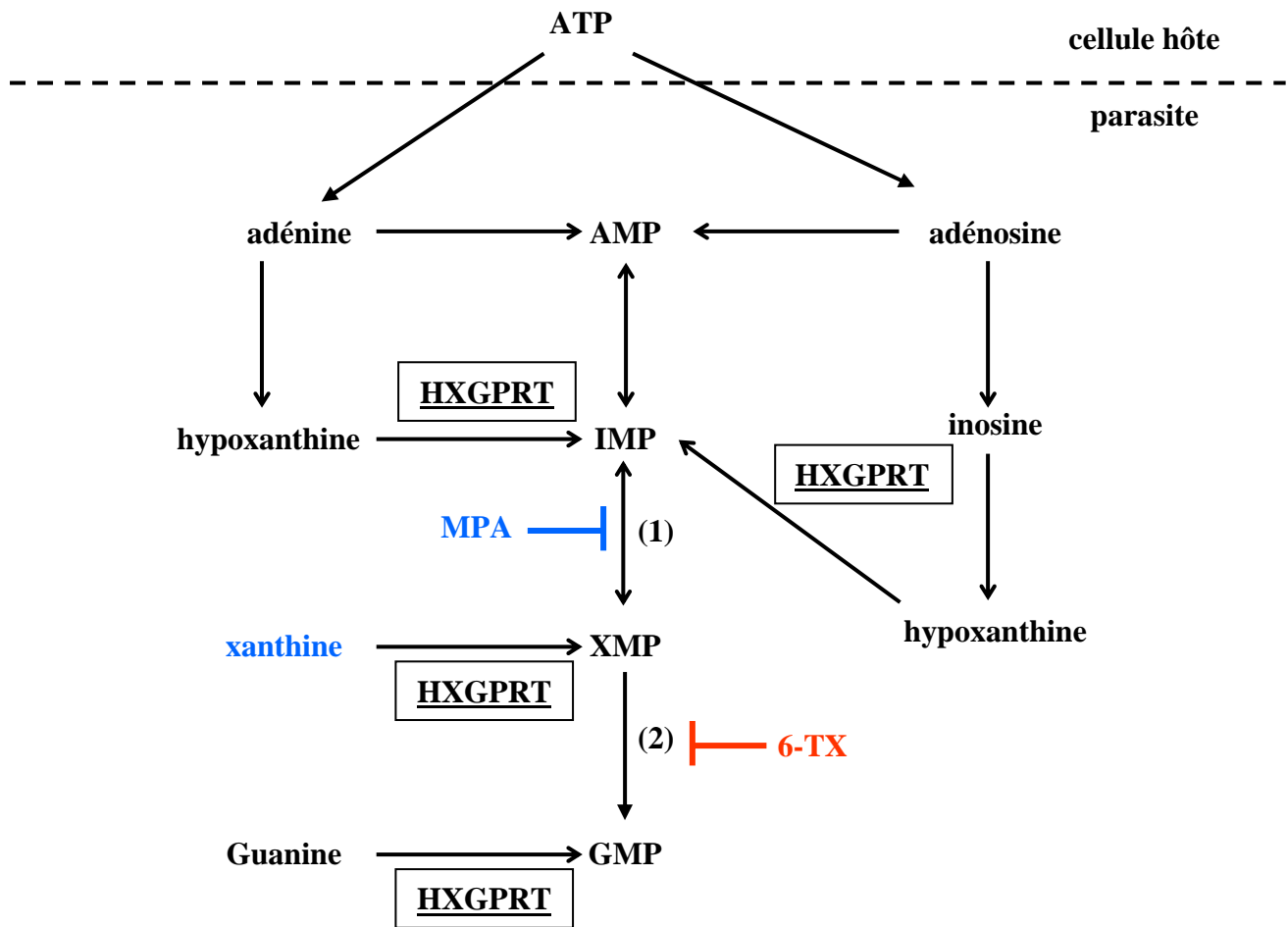


Figure 24. Principe des sélections positives et négatives basées sur l'enzyme HXGPRT impliquée dans la voie de récupération des purines. L'Hypoxanthine Guanine Phosphorybosyl Transférase (HXGPRT) est encadrée. Le gène codant cette enzyme peut être utilisé en tant que stratégie de sélection positive (bleu) en présence d'acide mycophénolique (MPA) et de xanthine dans des souches de *T. gondii* dépourvue de HXGPRT. MPA bloque l'IMP déshydrogénase (1) empêchant la synthèse de XMP à partir d'IMP. XMP est produit sous l'action du HXGPRT en présence de xanthine ce qui permet d'obtenir du GMP. HXGPRT peut être utilisé dans le cadre d'une sélection négative (rouge) en utilisant comme substrat un analogue de la xanthine, la 6-thioxanthine : 6-TX est convertit en 6-TX-XMP qui est métaboliquement inactif et qui bloque l'IMP-déshydrogénase ce qui provoque une inhibition du développement de *T. gondii* par un épuisement en bases guanines. Seuls les parasites dépourvus de HXGPRT sont capables de se développer en présence de 6-TX. 6-TX : 6-thioxanthine, MPA : acide mycophénolique. (1) IMP déshydrogénase. (2) GMP synthase (modifié d'après Pfkckerkorn *et al.*, 2001).

P. falciparum résistantes à la pyriméthamine (Wu *et al.*, 1996), soit le gène de résistance de *T. gondii* (Crabb et Cowman, 1996), soit une DHFR humaine conférant la résistance à un antifolate, le WR99210 (Fidock *et al.*, 1998 ; de Koning-Ward *et al.*, 2000). Cette stratégie de sélection pose cependant le problème de la création de mutants à la pyriméthamine, molécule utilisée en traitement.

III.4.1.3. HXGPRT ou Hypoxanthine-xanthine-guanine-phosphoribosyltransférase et résistance à l'acide mycophénolique

T. gondii, comme d'autres parasites protozoaires, ne peut pas synthétiser ses propres bases puriques mais il présente la capacité de convertir plusieurs nucléotides puriques. Le mécanisme de récupération des purines à partir de la cellule hôte est essentiel. L'enzyme HXGPRT intervient dans ce mécanisme. Le protocole de sélection nécessite de disposer de souches mutantes dépourvues du gène *hxgprt*. Ces parasites sont viables puisque AMP et IMP sont interconvertibles (Fig. 24). Chez *T. gondii*, HXGPRT peut être utilisée en tant qu'agent de sélection positif : en présence d'acide mycophénolique (MPA), l'IMP déshydrogénase est inhibée, empêchant la synthèse de GMP à partir d'IMP. Seuls les parasites ayant incorporé le gène codant HXGPRT peuvent se développer en présence de MPA et de xanthine. En effet, HXGPRT permet de convertir la xanthine en XMP qui donne ensuite du GMP sous l'action de la GMP synthase. Le GMP peut également être obtenu par action de la HGPRT à partir de la guanine (Fig. 24, Donald *et al.*, 1996).

III.4.1.4. Les marqueurs de sélection négative

Les sélections négatives sont basées sur l'expression, dans des cellules cibles, de gènes codant pour des enzymes capables de convertir un substrat inoffensif en un métabolite toxique. Cette stratégie peut, par exemple, permettre d'éliminer les recombinants non issus d'une recombinaison homologe. Ces marqueurs peuvent être utilisés dans des stratégies positives / négatives : la première étape consiste à sélectionner positivement les transformants

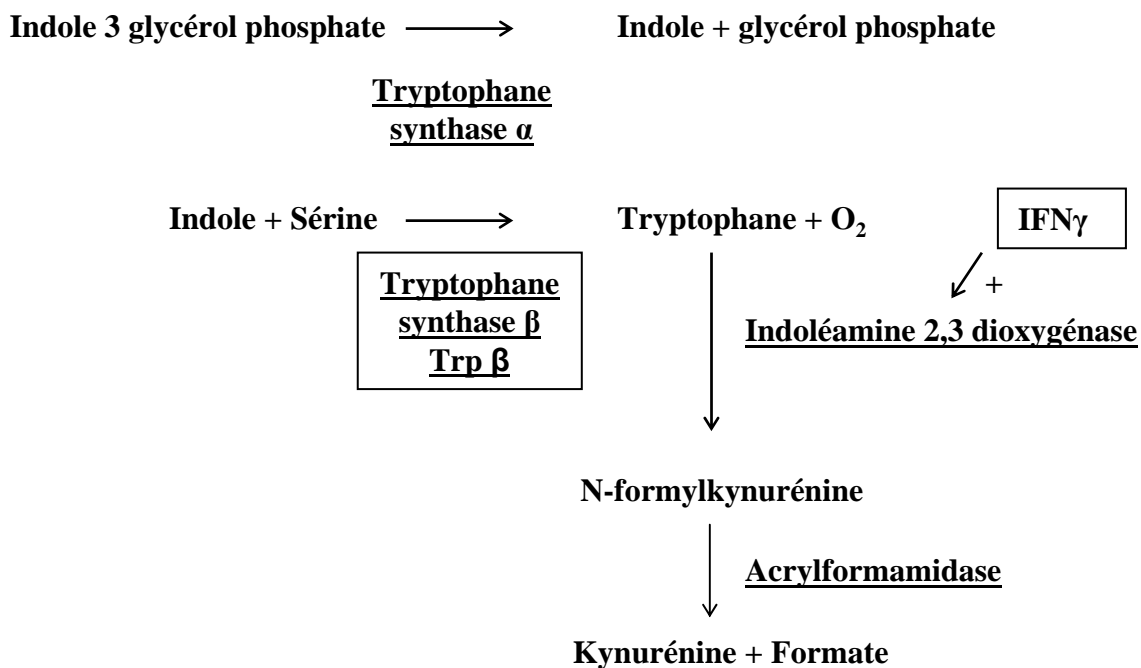


Figure 25. Schéma de la voie de biosynthèse du tryptophane. La tryptophane synthase α dégrade l'indole 3 glycérol phosphate en indole et glycérol phosphate. L'indole, en présence de sérine, est converti en tryptophane sous l'action de la tryptophane synthase β . Le tryptophane peut être ensuite dégradé par l'indoléamine 2,3 dioxygénase (EC 1.13.11.42) en présence d'O₂ pour donner de la N-formyl-kynurénine. Cette molécule est prise en charge par une acrylformamidase (EC 3.5.1.9) pour être dégradée en kynurénine et formate. L'interféron γ (IFN- γ) stimule l'activité de l'indoléamine 2,3 dioxygénase et accélère le catabolisme du tryptophane.

puis la sélection négative est appliquée. On peut citer par exemple le 5-fluoro-déoxyuridine (5-FDUR) chez *T. gondii* qui, sous l'action de l'**uracil Phosphoribosyl transferase** (UPRT), est métabolisé en 5-fluoro-dUMP, inhibiteur de la synthèse d'ADN et donc de la réplication. Une inactivation du gène codant *uprt* confère la résistance au 5-FDUR (**Donald et Roos, 1995**). Utilisé en tant qu'agent de sélection positif, le gène *hxgprt* peut également être utilisé dans une stratégie de sélection positive / négative. Les révertants sont caractérisés pour leur capacité à se développer en présence d'un analogue de la xanthine, la 6-thioxanthine (6-TX, **Fig. 24**). Le 6-TX est métabolisé par HXGPRT en un produit qui inhibe l'IMP déshydrogénase. Seuls les parasites dépourvus de HXGPRT sont résistants à cette molécule (**Donald et Roos 1998**).

Le gène codant pour la **thymidine kinase** (TK) du virus de l'herpès simplex convertit la déoxythymidine en déoxythymidine monophosphate. L'expression de cette enzyme confère aux parasites une susceptibilité pour un analogue de la guanosine, le gancyclovir, qui lorsqu'il est clivé par la TK, produit des dérivés toxiques qui s'incorporent dans le pool de nucléotides et inhibent la synthèse d'ADN. Cette stratégie a été décrite chez *P. falciparum* pour induire une recombinaison par double crossing-over (**Duraisingh et al., 2002**). Cette même stratégie est décrite chez *T. gondii* couplée à la sélection positive DHFR et chez *T. brucei* couplée à une sélection positive à l'hygromycine (**Fox et al., 2001 ; Lye et Wang, 1996**).

III.4.1.5. La complémentation de l'auxotrophie au tryptophane

Cette stratégie a été développée chez *T. gondii* (**Sibley et al., 1994**). L'IFN- γ induit une augmentation de l'activité de l'indoléamine 2,3-dioxygénase qui convertit le tryptophane en *N*-formylkynurenine favorisant le catabolisme du tryptophane et son élimination du milieu (**Fig. 25**). L'auxotrophie au tryptophane peut être complétement par expression du gène *trpB* d'*Escherichia coli* codant la sous unité β de la tryptophane synthase, enzyme qui catalyse la production de tryptophane à partir d'indole et de sérine (**Fig. 25, Hartman et Mulligan,**

1988). L'utilisation de cette stratégie chez le parasite intracellulaire *T. gondii* tire avantage de son auxotrophie naturelle pour le tryptophane. La nécessité d'utiliser le tryptophane de la cellule hôte permet d'obtenir une inhibition efficace du développement de *T. gondii* lorsque l'on déplete le milieu en tryptophane (Pfefferkorn, 1984). Une transformation stable de *T. gondii* a ainsi été obtenue par complémentation de l'auxotrophie au tryptophane par la TrpB d'*E. coli* (Sibley *et al.*, 1994).

III.4.2. Intégration dans le génome

Chez certains organismes comme *Giardia lamblia* ou *Entamoeba histolytica*, des vecteurs maintenus sous forme d'épisomes peuvent permettre d'obtenir des transformants stables. Chez *T. gondii* ou *P. falciparum*, en présence d'agents de sélection, les vecteurs circulaires peuvent être maintenus sous forme d'épisomes mais ils sont rapidement perdus au cours des divisions en raison d'une mauvaise ségrégation entre les cellules filles. Ceci explique une croissance lente en présence d'agents de sélection et une perte rapide des vecteurs lorsque la sélection est éliminée. L'introduction du transgène dans le génome de manière aléatoire ou par recombinaison homologue aboutit à une expression stable des transgènes et permet de résoudre les problèmes liés à l'instabilité des épisomes.

III.4.2.1. Chez les Trypanosomatidae

Chez *T. brucei* ou *Leishmania major*, la transfection avec des vecteurs sous forme linéaire permet d'obtenir des transformants stables exclusivement par recombinaison homologue (Lee et van der Ploeg, 1990 ; Cruz et Beverley, 1990). Les séquences adjacentes homologues, même courtes (1 à 2 kb) suffisent à réaliser une recombinaison homologue (Tobin et Wirth, 1992). Les Trypanosomatidae existent sous forme diploïde ce qui nécessite, pour obtenir des mutants nuls, d'inactiver les deux allèles. Une inactivation séquentielle d'un

allèle puis du second est réalisé grâce à l'utilisation de deux gènes de sélection indépendants (Cruz *et al.*, 1991).

III.4.2.2. Chez *Toxoplasma gondii*

Les premières expériences de transformations stables de *T. gondii* ont montré que l'intégration de molécules d'ADN étranger dans le génome a lieu préférentiellement de façon aléatoire (Donald et Roos, 1993). Ceci pose le problème d'une intégration dans un gène essentiel entraînant un phénotype létal. Cependant, l'intégration par recombinaison non homologue présente un côté positif car elle peut être utilisée pour faire de la mutagenèse aléatoire, ou pour cibler des gènes comme par exemple *hxgpri* à l'aide d'une stratégie de sélection négative : lorsque le transgène est introduit dans le gène codant HXGPRT, les parasites résistent en effet à l'action de la 6-TX (Fig. 24, Donald *et al.*, 1996). La même stratégie a été utilisée pour cibler le gène *upri* et caractériser des parasites capables de résister à la 5-FDUR (Donald et Roos, 1995). Ces deux stratégies sont basées sur l'utilisation des sélections négatives décrites précédemment.

Cependant, lorsque la région d'homologie avec le locus d'intérêt est suffisamment grande (plusieurs kb), l'efficacité de recombinaison homologue par double crossing-over est améliorée. Ainsi, dans le cas du gène *dhfr-ts*, un fragment de 16 kb permet d'augmenter l'efficacité de recombinaison par double crossing-over (Donald et Roos, 1994). De façon générale, la présence de régions flanquantes d'environ 2 à 2,5 kb est nécessaire pour que la recombinaison homologue par double crossing-over ait lieu de façon efficace. La fréquence de recombinaison homologue restant cependant faible, une autre stratégie a été développée. Ce système est basé sur deux étapes qui utilisent le gène codant HXGPRT comme sélection positive / négative. Un vecteur présentant le gène *hxgpri* flanqué par un grand fragment d'ADN encadrant le gène d'intérêt est introduit de façon stable au niveau du locus du gène endogène d'intérêt sous une pression de sélection positive. Les pseudo-diploïdes (gène

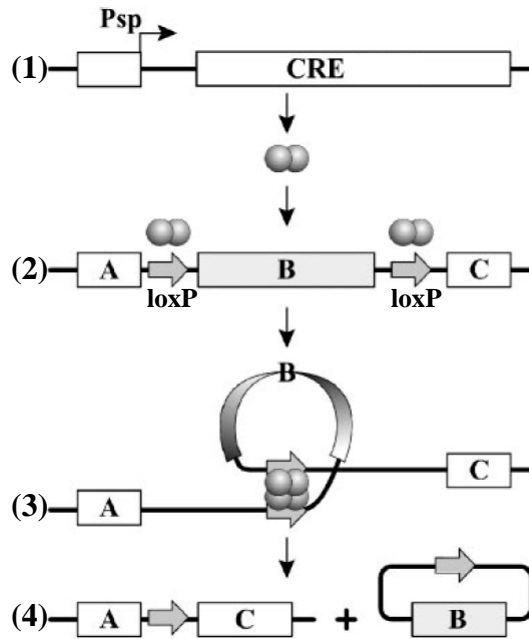


Figure 26. Recombinaison site spécifique à l'aide du système Cre-lox. (1) Le gène codant la recombinase Cre est placé sous le contrôle d'un promoteur de l'organisme d'intérêt (Psp). (2) La recombinase Cre, exprimée sous forme de dimère, va interagir avec les deux sites spécifiques loxP encadrant le gène d'intérêt B. Les sites loxP sont constitués de répétitions de 13 pb inversées associées à une séquence core de 8 pb. (3) L'association ADN-recombinase catalyse une recombinaison homologue à l'intérieur des séquences core de 8 pb. (4) Selon l'orientation des sites loxP, la recombinaison aboutit soit à la délétion soit à l'inversion du fragment d'ADN bordé par les sites loxP. Le site loxP toujours présent dans le génome peut être utilisé pour une nouvelle recombinaison et donc l'insertion d'une nouvelle séquence (d'après Gossen et Bujard, 2002).

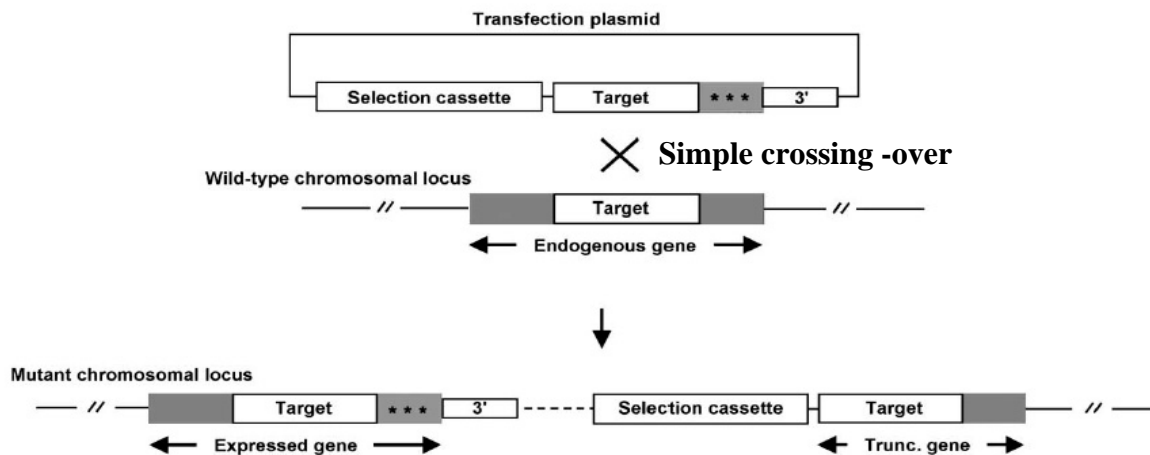


Figure 27. Stratégie de remplacement par simple crossing-over à l'origine d'organismes pseudo-diploïdes chez *P. falciparum*. Le plasmide contient une séquence cible (Target) qui est partiellement identique à la séquence sauvage du gène endogène du parasite puisque dans la partie 3' du transgène, sont introduites des mutations (rectangle gris avec les astérisques indiquant les mutations). Une séquence de terminaison de transcription est présente (3'). Après transfection, une procédure cyclique sélection/perte de sélection est réalisée pour favoriser l'intégration dans le génome. De façon générale, les plasmides s'intègrent par recombinaison par simple crossing-over au niveau de la séquence endogène cible : il en dérive un gène entier, contenant les mutations d'intérêt, placé sous le contrôle transcriptionnel du promoteur endogène et de la séquence 3' introduite. Une copie tronquée (truncated gene) est également présente dans le génome mais elle n'est pas exprimée en raison de l'absence de promoteur. Ceci est à l'origine d'organismes pseudo-diploïdes. Un autre inconvénient de la recombinaison par simple crossing-over est la persistance du corps du plasmide au locus d'intérêt après recombinaison (modifié d'après Crabb, 2002).

sauvage et transgène séparés par le vecteur) sont éliminés en incubant les parasites en présence de 6-TX. Une recombinaison intrachromosomique permet d'exciser le corps du plasmide qui contient le marqueur produisant ainsi des parasites résistants à l'action de 6-TX (**Donald et Roos 1998**).

Une autre stratégie alternative non basée sur la recombinaison homologue consiste en l'expression des composants du système sites spécifiques de la recombinaise Cre-loxP du bactériophage P1. Dans cette stratégie, le gène cible est placé entre deux sites loxP de 34 pb en orientation directe. Cette construction s'insère de façon aléatoire dans le génome de *T. gondii*. L'expression transitoire de la recombinaise Cre permet de réaliser une recombinaison entre deux sites *loxP* : le gène cible peut alors être délété de façon efficace et sélective (**Fig. 26**). L'activité de la recombinaise Cre est réversible ce qui permet de réaliser ensuite une recombinaison intégrative spécifique d'un ADN exogène, au niveau d'un site loxP libéré au cours d'une précédente excision, éliminant ainsi le problème des intégrations aléatoires dans le génome de *T. gondii*. Cette stratégie permet aussi d'éliminer un gène de sélection ce qui facilite la réutilisation ultérieure de ce gène de sélection (**Brecht et al., 1999**).

III.4.2.3. Chez Plasmodium falciparum

L'intégration des vecteurs a généralement lieu par recombinaison homologue au niveau du locus d'intérêt sans contrainte de taille. Il semble que la recombinaison soit favorisée lorsque les vecteurs sont sous forme circulaires (**Wu et al., 1996**). La plupart des expériences réalisées chez *P. falciparum* montrent une intégration par simple crossing-over ce qui permet de réaliser des remplacements alléliques ou des inactivations ciblées de gènes (**Fig. 27**). L'intégration par simple crossing-over présente certaines limites car la nature même de cette intégration implique que le corps du vecteur reste dans le génome au niveau du locus

d'intégration et cette stratégie crée des pseudo-diploïdes puisqu'une seule copie est intacte et peut s'exprimer (**Crabb et Cowman, 1996**).

La réalisation d'un double crossing-over chez *P. falciparum* implique l'incorporation dans le vecteur de transfection d'une seconde cassette, codant pour un marqueur de sélection. Le gène codant la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès simplex qui confère une susceptibilité au gancyclovir peut être utilisé en tant que sélection négative. En association avec un marqueur de sélection positif comme DHFR, il est également possible d'obtenir des recombinaisons homologues par double crossing-over (**Duraisingh et al., 2002**).

Une autre stratégie utilisant un élément transposable permet d'obtenir une intégration dans le génome de *P. falciparum*. Les éléments transposables n'existent pas de façon naturelle chez la plupart des eucaryotes inférieurs et notamment chez *P. falciparum*. Le gène conférant la résistance à la pyriméthamine (*dhfr*) est placé entre les séquences ITR de l'élément transposable de lépidoptère *piggybac*, base pour l'insertion dans le génome. Un vecteur helper porte le gène codant la transposase sous le contrôle de séquences régulatrices de *Plasmodium*. *Piggybac* cible exclusivement la cible tétra nucléotidique TTAA lui permettant de s'intégrer à plusieurs endroits dans le génome. Cette stratégie permet de réaliser des études de mutagenèse à grande échelle mais les gènes essentiels ne peuvent être ciblés (**Balu et al., 2005**).

III.4.3. Stratégies alternatives à l'intégration dans le génome

Une alternative à l'intégration dans le génome consiste à identifier des séquences favorisant le maintien des vecteurs sous forme d'épisomes au cours des générations. Chez *T. gondii*, une séquence de 500 pb appelée EMS (Episomal Maintenance Sequence) impliquée dans l'auto-réplication des plasmides, leur stabilisation et leur ségrégation en l'absence d'agent de sélection a été caractérisée (**Black et Boothroyd, 1998**). Chez *P. falciparum*, les

répétitions subtélomériques Rep20 améliorent la ségrégation des épisomes dans les cellules filles ce qui permet d'établir une sélection plus rapidement (O'Donnell *et al.*, 2002).

III.5. Quelques exemples d'application de la génétique inverse chez des parasites

III.5.1. L'invalidation de gènes (knock-out) par simple ou double crossing-over

Le knock-out (KO) désigne l'invalidation d'un gène d'intérêt par recombinaison homologue aboutissant à l'inhibition de son expression. Cependant, cette stratégie ne peut s'appliquer aux gènes essentiels dont l'inactivation entraîne une perte de la viabilité. Elle constitue une méthode d'étude de choix pour les gènes non essentiels pour lesquels les KO peuvent être réalisés en remplaçant le gène d'intérêt par recombinaison homologue par des gènes de sélection. Pour une délétion complète du gène d'intérêt, les régions flanquantes 5' et 3' du gène cible sont placées de part et d'autre du gène de sélection. Cette stratégie a été utilisée chez *T. gondii* : à titre d'exemple, des KO des gènes ROP1 (Soldati *et al.*, 1995) et MyoD (Herm-Gotz *et al.*, 2006) ont été obtenus après remplacement par le gène *cat* et sélection en présence de chloramphénicol. Le marqueur de sélection HXGPRT a également été utilisé pour interrompre des gènes d'intérêt : il est placé sous le contrôle des régions régulatrices de *dhfr* et entre les régions 5' amont et 3' aval du gène à inactiver. La sélection est réalisée en présence d'acide mycophénolique et de xanthine (Donald et Roos, 1998).

Chez *P. falciparum*, la première expérience de KO a été rapportée pour l'inactivation du gène *kahrp* (Knob associated histidine rich protein). *Tg-dhfr* placé sous le contrôle des régions régulatrices de la calmoduline permet de conférer la résistance à la pyriméthamine. Cette séquence placée entre deux exons de *kahrp* permet d'inactiver le gène cible par simple crossing-over (Crabb *et al.*, 1997). Dans le cas des kinétoplastidae qui sont diploïdes,

l'obtention d'un KO nécessite d'inactiver les deux allèles : ceci est réalisé en utilisant 2 gènes de sélection différents (**Clayton, 1999**).

Il est nécessaire de s'assurer que le phénotype observé lors d'un KO résulte bien de l'absence de la protéine d'intérêt. En effet, les phénotypes mutants observés peuvent s'expliquer par des modifications génétiques survenues au cours du processus de sélection ou par l'influence du locus de recombinaison sur l'expression de loci proches. Ceci est réalisé par la ré-introduction d'une copie sauvage (complémentation) du gène d'intérêt afin de restaurer le phénotype sauvage. Pour cela, il faut utiliser un premier gène de sélection pour créer le phénotype KO et un second pour restaurer la fonction. Les KO des protéines ROP1 pour *T. gondii* (**Soldati et al., 1995**) ou TRAP chez *P. berghei* (**Sultan et al., 2001**) ont pu ainsi être vérifiés après complémentation.

III.5.2. La trans-complémentation

La trans-complémentation correspond à la complémentation de gènes conservés entre plusieurs espèces. Elle permet de vérifier, malgré une divergence de séquence, que la fonction des protéines d'intérêt est conservée. Le gène endogène est remplacé par recombinaison homologue par le gène étudié. Une conservation du domaine cytoplasmique des protéines TRAP chez les Apicomplexa a ainsi été montrée (**Kappe et al., 1999**) tout comme une conservation entre *P. falciparum* et *P. chabaudi* des protéines MSP-1₁₉ (surface) et AMA-1, (rhoptries), ces protéines jouant un rôle essentiel dans l'invasion des globules rouges (**Triglia et al., 2000 ; O'Donnell et al., 2000**). Cette stratégie a permis de réaliser le premier KO de TgMIC2 en le remplaçant par EtMIC1, son homologue chez *Eimeria tenella* (**Huynh et al., 2004**). La trans-complémentation a aussi permis de mettre en évidence le rôle majeur des domaines I et III de AMA-1, protéine impliquée dans l'invasion des érythrocytes par *P. falciparum* (**Healer et al., 2005**).

III.5.3. L'inactivation de gènes par knock-down

Les stratégies de knock-out aboutissent à l'élimination du gène cible et ne peuvent donc être appliquées à des gènes essentiels. De plus, pour des organismes diploïdes ou polyploïdes, il est nécessaire d'invalider tous les allèles. Des stratégies alternatives dites de knock-down consistent à sous-réguler l'expression du gène cible sans l'inactiver de façon totale.

III.5.3.1. Systèmes inductibles et knock-out conditionnels

Le contrôle inductible de l'expression individuelle des gènes est une alternative à l'étude des gènes à fonction essentielle car il assure un contrôle quantitatif et réversible de la fonction d'un gène cible. Il permet non seulement de créer des knock-out conditionnels mais également d'étudier des gènes endogènes mutés ainsi que l'expression de gènes toxiques. La plupart des systèmes décrits pour contrôler de façon fine l'expression des gènes eucaryotes, utilisent les éléments de contrôle de l'opéron de résistance à la tétracycline codé par Tn10 (**Hillen et Schollmeier, 1983**). Comme chez les bactéries, en l'absence de tétracycline, le répresseur TetR interfère avec l'initiation de la transcription en se liant à l'opérateur *tetO* placé à proximité des régions promotrices des gènes d'intérêt. En présence de tétracycline, la liaison du répresseur avec *tetO* est rompue ce qui rend le promoteur actif.

Des systèmes d'expression contrôlés par la tétracycline ont été mis au point chez des protozoaires parasites comme *E. histolytica* (**Ramakrishnan et al., 1997**), *G. lamblia* (**Sun et Tai, 2000**) ou *T. brucei* (**Wirtz et Clayton, 1995**). Chez *T. brucei*, où les knock-down sont souvent réalisés par ARN interférence, ce système inductible est utilisé pour induire l'expression d'ARN double brin (**Shi et al., 2000 ; Alibu et al., 2005**).

Dans les cellules de mammifères, le système d'expression inductible à la tétracycline nécessite la présence d'un trans-activateur qui intervient dans la régulation de la transcription par l'ARN polymérase II : la fusion du répresseur TetR avec le domaine activateur de la

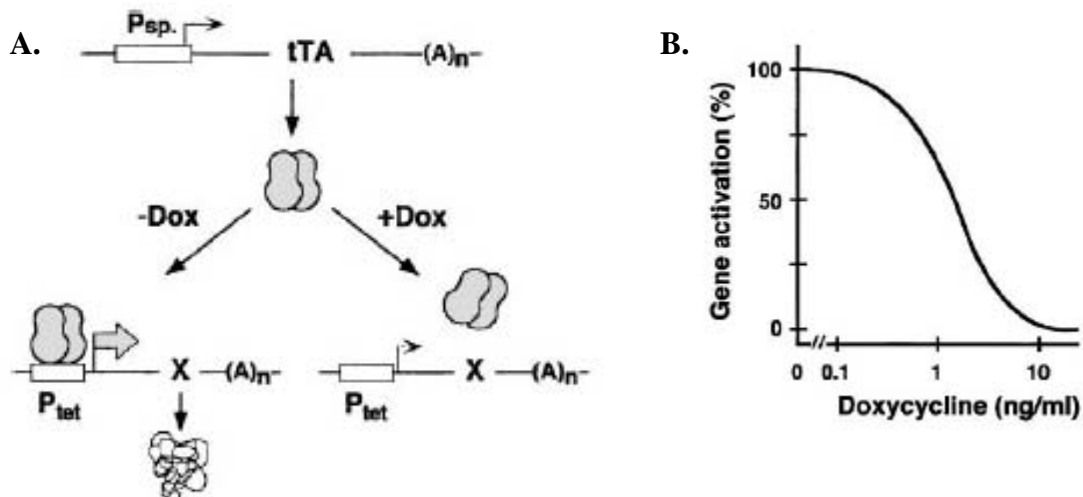


Figure 28. Mode d'action du système inductible à la tétracycline via un contrôle par un trans-activateur. (A) En l'absence de Dox (Doxycycline, antibiotique appartenant à la famille des tétracyclines), tTA (tétracycline Trans-Activator) se lie au promoteur (P_{tet}) contenant les séquences opératrices $tet(O)$ et active ainsi la transcription du gène X placé sous le contrôle du promoteur P_{tet} . La présence de Dox bloque la liaison de tTa au promoteur ce qui empêche l'initiation de la transcription du gène placé sous le contrôle de P_{tet} . (B) L'expression du gène est dépendante de la dose de Doxycycline utilisée. L'activité du promoteur P_{tet} est maximale en absence de Dox. Quand la dose d'antibiotique augmente, la transcription du gène diminue graduellement jusqu'à un niveau basal obtenu pour une dose de 5 ng/ml (d'après Gossen et Bujard, 2002).

protéine VP16 du virus de l'herpès simplex a permis de caractériser un trans-activateur efficace, contrôlé par la tétracycline (tTA, tetracycline controlled trans-activator,). Ainsi, dans des cellules exprimant tTA, en absence de tétracycline, un promoteur fusionné à *tet(O)* est activé. Il est réprimé en présence de tétracycline : en se fixant à l'opérateur, la tétracycline empêche la fixation du transactivateur entraînant le « silencing » du gène cible (**Fig. 28, Gossen et Bujard, 1992 et 2002**).

Chez *T. gondii*, une première étude montre que TetR peut être utilisé pour réguler l'expression de gènes d'intérêt : la liaison de TetR à *tetO* placé en amont du gène d'intérêt est dépendante de la présence d'un analogue de la tétracycline, l'anhydrotétracycline (ATc). En présence d'ATc, TetR ne peut plus se lier à *tetO*, le gène d'intérêt est exprimé. La meilleure localisation des séquences *tetO* ainsi que leur nombre (7) ont été déterminés et appliqués à l'étude d'un transgène c-Myc-MyoA (**Meissner et al., 2001**). Les domaines d'activation viraux (VP16 ou SV40) ne pouvant être utilisés chez *T. gondii*, un trans-activateur nommé TATi (Trans-activator Trap identified) a récemment été caractérisé. L'ensemble des expériences de knock-out conditionnel devra donc être désormais réalisé dans une souche portant la séquence codant pour ce trans-activateur. Comme dans les systèmes utilisés pour les cellules de mammifères, la présence de tétracycline inhibe l'action du transactivateur et donc l'expression des gènes placés sous le contrôle du promoteur *tet* dépendant (**Meissner et al., 2002**). Ce système inductible a été appliqué à l'étude de la Myosine A (MyoA). En effet, aucun knock-out du gène codant cette myosine impliquée dans le système de locomotion par « gliding » et dans l'invasion des cellules hôtes n'avait pu être obtenu. Après intégration aléatoire d'une seconde copie du gène *myoA* couplé à un épitope c-Myc dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur comprenant *tetO*, le gène endogène est inactivé par recombinaison homologe. L'inactivation de la nouvelle copie de MyoA est réalisée par addition d'ATc. Une inhibition de la mobilité et de l'invasion est observée sans aucune

modification de la libération du contenu des micronèmes (**Meissner et al., 2002**). La même stratégie a été utilisée pour l'étude de la protéine de micronème AMA-1 (**Mital et al., 2005**). Enfin, l'utilisation du transactivateur de *T. gondii* chez *P. falciparum* ouvre la voie de la génération de mutants dominants-négatifs chez ce parasite (**Meissner et al., 2005**).

III.5.3.2. L'ARN interférence (RNAi) chez les protozoaires

Le phénomène d'interférence ARN (RNAi), découvert chez le nématode *Caenorhabditis elegans* désigne l'inhibition post-transcriptionnelle de gènes induite par de l'ARN double brin (**Fire et al., 1998**). A l'origine, il constitue un mécanisme naturel de défense contre les ARN double brin d'origine hétérologue ou virale et contre l'abondance des transcrits de transposons. Par définition, le RNAi correspond à un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle par lequel des ARN double brin (double strand RNA, dsRNA) dirigent la dégradation spécifique de leurs transcrits cellulaires homologues *via* des siRNA (small interfering RNA) ce qui permet de sous-réguler l'expression d'un gène cible. Une inhibition de 100% étant rarement atteinte, cet outil permet de passer outre un phénotype létal. Ceci fait du RNAi un outil d'une grande valeur pour analyser la fonction de gènes dans de nombreux organismes eucaryotes (revue par **Ullu et al., 2004**).

Chez les protozoaires parasites, le mécanisme de RNAi a initialement été décrit chez *T. brucei*. Les premières expériences ont consisté à introduire, par électroporation, un ARN double brin spécifique de l' α -tubuline, la réduction de l'expression de ce gène se traduisant par l'apparition de cellules multinucléés (**Ngo et al., 1998**). Il a également été démontré chez ce parasite que les machineries de traduction et de RNAi sont liées ce qui facilite la reconnaissance entre des messagers cibles en cours de traduction. La dégradation des cibles doit avoir lieu alors que l'ARNm est associé aux ribosomes ou bien l'association aux ribosomes entraîne un marquage des ARNm qui sont ensuite dégradés dans le cytoplasme

(**Djikeng et al., 2003**). L'ARN interférence est désormais reconnu comme une méthode de choix pour sous-réguler l'expression de gènes d'intérêt chez *T. brucei*.

Chez *P. falciparum*, plusieurs études suggèrent l'existence du mécanisme d'interférence ARN. Ainsi, l'électroporation de globules rouges infestés avec des dsRNA spécifiques d'une enzyme de la voie de biosynthèse des bases pyrimidiques, la dihydroorate déshydrogénase (DHOHD), montre une corrélation entre l'inhibition du développement parasitaire et la diminution du taux d'ARNm de *dhohd*. Cependant, aucun ARN de petite taille caractéristique du mécanisme de RNAi n'a pu être identifié (**McRobert et McConkey, 2002**). Des ARN de petite taille (≈ 25 nt) sont par contre mis en évidence lors de l'utilisation d'ARN double brin homologues aux gènes codant pour deux cystéines protéases, les falcipaines 1 et 2 (**Malhotra et al., 2002**). L'existence du mécanisme de RNAi est confirmée par l'introduction de siRNA correspondant aux berghepaines 1 et 2, cystéines protéases de la famille des papaines chez des souris infectées par *P. berghei* (**Mohammed et al., 2003**). Cependant, dans le génome de *Plasmodium*, aucun gène impliqué dans le mécanisme de RNAi n'a pu être identifié suggérant une perte de ce mécanisme. L'existence d'une voie classique de RNAi n'est donc pas supportée par les données génomiques.

Chez *T. gondii*, l'introduction d'un ARN double brin homologue à l'uracil phosphorybosyltransférase (UPRT) a mis en évidence une diminution de l'expression de cette enzyme à l'origine d'une résistance au 5-fluoro-2'-déoxyuridine (FDUR). Cependant, malgré la réduction du nombre de message, aucune synthèse de siRNA n'a été détectée (**Al-Anouti et Ananvoranich, 2002 ; Al-Anouti et al., 2003**). L'analyse du génome de *T. gondii* montre que les gènes classiques codant les protéines impliquées dans le mécanisme d'ARN interférence sont présents. Les échecs rencontrés pour la mise en évidence de ce mécanisme peuvent s'expliquer par la production d'ARN de petite taille de type micro-ARN non détectés par Northern blot (**Ullu et al., 2004**).

Une stratégie alternative a été développée : elle consiste à utiliser un ribozyme fusionné à un ARN antisens. Le 3'UTR impliqué dans la stabilisation des ARNm est remplacé par un ribozyme en marteau qui clive les ponts phosphodiester de façon spécifique au niveau de l'ARN cible. Cette stratégie a permis de montrer le rôle essentiel d'une apyrase, la Nucléoside Triphosphate hydrolase (NTPase) dans la réplication ainsi que le rôle majeur de la protéine ROP2 dans les rhoptries (**Nakaar *et al.*, 1999 ; Nakaar *et al.*, 2003**).

Matériel et Méthodes

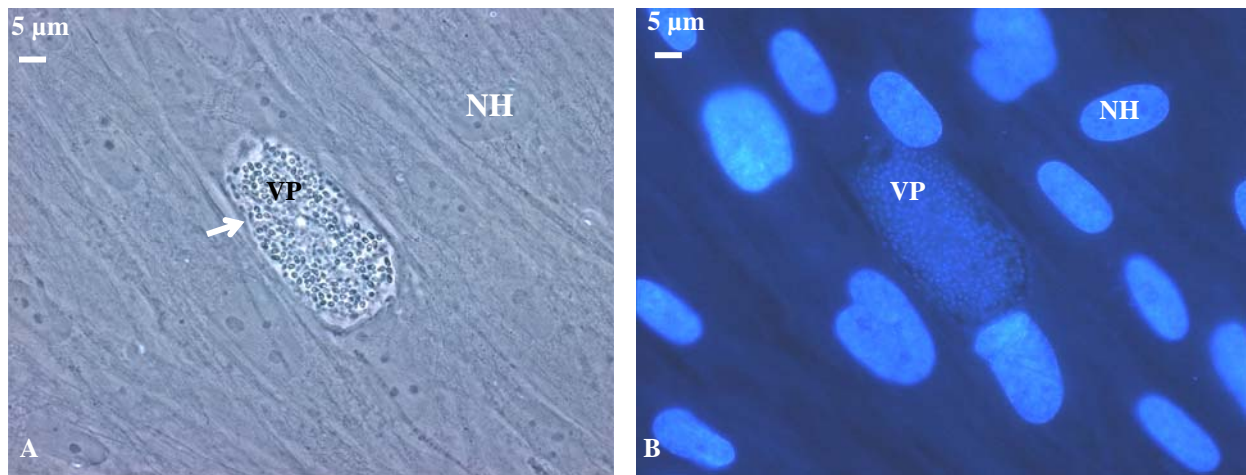


Figure 29. Cellules fibroblastiques humaines (HFF) infestées par *Encephalitozoon cuniculi* observées en microscopie optique. Le cycle de développement se déroule au sein d'une vacuole parasitophore (flèche). (A) Contraste de phase. (B) Coloration DAPI permettant de visualiser les noyaux des cellules hôtes et des parasites. NH : noyau de la cellule hôte. VP : vacuole parasitophore.

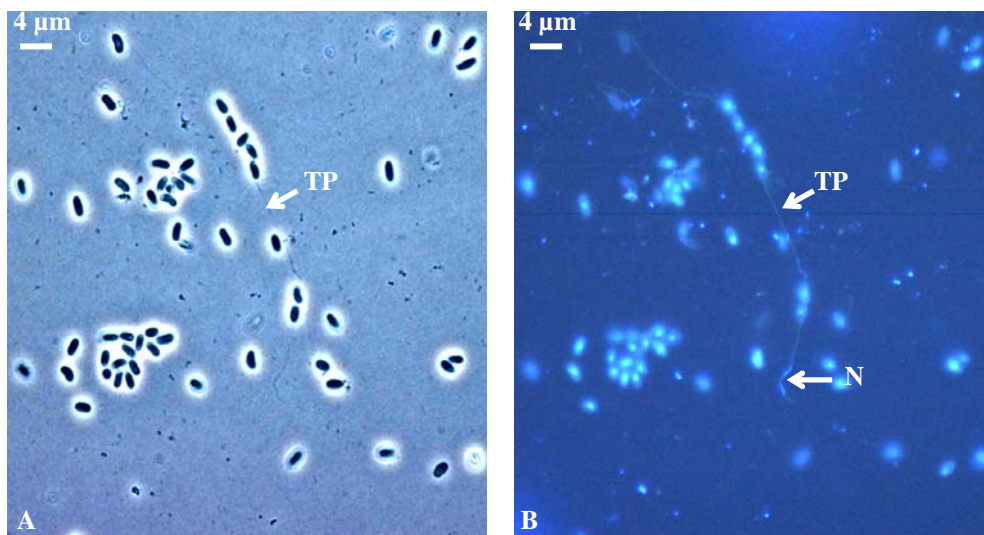


Figure 30. Frottis de spores d'*Antonospora locustae* visualisées en microscopie optique. (A) Contraste de phase. (B) Coloration DAPI permettant de visualiser le diplocaryon contenu dans les spores ainsi que son passage dans le tube polaire. TP : tube polaire. N : noyaux transitant dans le tube polaire.

Matériel et Méthodes

I. Les espèces microsporidiennes étudiées

Les modèles biologiques sont les espèces microsporidiennes *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Antonospora locustae* et *Paranosema grylli*.

I.1. *Encephalitozoon cuniculi*

L'espèce *E. cuniculi*, initialement isolée à partir du cerveau d'un lapin, a depuis été caractérisée chez de nombreux mammifères dont l'Homme (**Levaditi et al., 1923**). Son cycle se déroule au sein d'une vacuole parasitophore (**Fig. 29**) et les spores uninucléées produites mesurent 2,5 x 1,5 µm. C'est actuellement la microsporidie la plus étudiée et dont le génome extrêmement réduit (2,9 Mpb) a été entièrement séquencé (**Katinka et al., 2001**).

I.2. *Encephalitozoon hellem*

E. hellem a été identifiée à partir de trois patients atteints de SIDA et présentant des kératoconjunctivites (**Didier et al., 1991**). Cette espèce est majoritairement décrite chez les oiseaux. Comme *E. cuniculi*, le cycle complet a lieu au sein d'une vacuole parasitophore. Les spores sont uninucléées et mesurent 1 µm x 1,5-2 µm.

I.3. *Antonospora locustae*

Cette microsporidie a été isolée à partir de corps gras du criquet *Locusta migratoria* (**Canning, 1953**). Diplocaryotique tout au long de son cycle de développement, elle a d'abord été classée au sein du genre *Nosema*. L'analyse récente de la petite sous unité ARNr montre 96% d'identité avec *Antonospora scoticae* ce qui a conduit à renommer cette espèce *Antonospora locustae* (**Slamovits et al., 2003**). Elle se développe au contact direct du cytoplasme des tissus adipeux et produit des spores mesurant 4,95 µm x 2,65 µm (**Fig. 30**).

I.4. *Paranosema grylli*

Caractérisée à partir de grillons *Gryllus bimaculatus*, cette microsporidie présente un cycle diplocaryotique au contact direct du cytoplasme des adipocytes aboutissant à la production de spores mesurant 4,5 µm x 2,2 µm. Initialement classée dans le genre *Nosema*, cette espèce a été récemment reclassée dans un nouveau genre, le genre *Paranosema*, suite à des études ultrastructurales et une analyse de l'ARNr 16S (Sokolova *et al.*, 2003).

II. Production et purification des parasites

E. cuniculi, isolat de souris (GB-M1), fourni par le Pr E.U. Canning (Imperial College of London) et isolat de référence choisi pour le séquençage du génome, est cultivé *in vitro* sur des cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ou des cellules fibroblastiques HFF (Human Foreskin Fibroblast). Les différentes souches d'*E. hellem* (EhDidier, V242, V257 et V213) sont cultivées sur des cellules HFF. Les cultures s'effectuent en milieu MEM (Minimum Essential Medium, Life technologies) supplémenté en sérum de veau foetal 5%, L-glutamine 2 mM et divers antibiotiques (ampicilline 100 µg.ml⁻¹, streptomycine 100 µg.ml⁻¹, pénicilline 100 U.ml⁻¹ ou gentamicine 25 µg.ml⁻¹ et fungizone 2,5 µg.ml⁻¹) dans une atmosphère enrichie à 5% en CO₂ à 37°C. Lorsque les cellules sont à confluence, l'infestation est réalisée avec des spores d'*E. cuniculi* ou d'*E. hellem* (10⁸ spores par flacon de 25 cm²). Les spores libérées par lyse des cellules hôtes, sont collectées tous les deux jours dans le surnageant de culture. Après centrifugation (2 min, 6000 g) et lavages en PBS, le culot de spores est incubé 10 min à 65°C dans du SDS 1% afin d'éliminer les débris cellulaires. Les spores ainsi purifiées sont conservées dans du PBS à 4°C.

Les spores d'*A. locustae* sont commercialisées par M & R Durango, Inc. Insectary (Bayfield, Colorado).

Paranosema grylli a été produit dans le corps gras de grillons (*Gryllus bimaculatus*) qui étaient maintenus au laboratoire comme décrit précédemment (Sokolova *et al.*, 2003). Les corps gras infestés sont homogénéisés dans de l'eau distillée puis centrifugés 10 min à 200 g. Le culot contenant les spores matures de *P. grylli* est lavé 4 à 6 fois dans de l'eau distillée. Les spores sont conservées dans du PBS à 4°C.

III. Extraction d'ADN et PCR

Afin d'extraire l'ADN génomique destiné aux amplifications PCR, les spores purifiées ($5 \cdot 10^8$) sont resuspendues dans 200 µl d'eau stérile ou de PBS puis mises à ébullition 15 min (Ombrouck *et al.*, 1997). Un second protocole d'extraction d'ADN (kit ELU-Quick DNA purification Kit, Schleicher and Schuell) a également été utilisé. Les réactions d'amplification sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur Perkin-Elmer 2400 dans un volume de 50 µl avec 1 ng d'ADN, 1 µM de chaque amorce, 20 µM de chaque dNTP, 2,5 mM de $MgCl_2$ et 2,5 U de Taq DNA Polymerase (Eurobio). Après une première étape de dénaturation de 3 min à 94°C, 35 cycles sont réalisés selon les conditions suivantes : une dénaturation de 20 sec à 94°C, une hybridation de 30 sec à 42-65°C (selon le T_m des amorces) et une élongation d'1 à 2 min à 72°C. Une élongation finale est effectuée 15 min à 72°C.

Les produits d'amplification sont analysés sur gels d'agarose 1%, visualisés sous UV après traitement au bromure d'éthidium ($0,4 \mu g \cdot ml^{-1}$), découpés et purifiés sur colonne (QiaKit gel extraction, QIAGEN). Ils sont ensuite clonés dans le vecteur pGEM-T Easy Vector System I (Promega) ou dans le vecteur d'expression pGEX-4T1-His (voir partie expression hétérologue).

Les séquences des amorces utilisées pour l'identification des gènes *ptp1* et *ptp2* chez *A. locustae* et *P. grylli*, l'étude de l'expression des gènes *ptp4* et *ptp5* d'*E. cuniculi* et

Amorces	Séquences
Al-3	5' -GCAGGGGCATCCACTAGA-3'
Al-4	5' -GTGAAAAAACTATAAATAG-3'
Pg-1	5' -TGGAGGCATTGGCACAGG-3'
Pg-2	5' -CGCGAAGGGAAGCTTAC-3'
Al-7	5' -AGATTTCGCATTTCGCCACA-3'
Pg-3	5' -GTGCGTGAAGAAGCTAGG-3'
Al-8	5' -CGCCGTGCATAGCTACTG-3'

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour l'identification des homologues des gènes *ptp1* et *ptp2* chez *P. grylli*. Les amorces notées Al sont spécifiques d'*A. locustae*. Celles notées Pg sont déterminées à partir de séquences spécifiques de *P. grylli*.

Amorces	Séquences
07_1070D1	5' -GATATCAGCAGAGACGAG-3'
07_1070D2	5' -GACTTGAGGTTGAGAC-3'
07_1080D1	5' -CAGATCAATAGGAATGGAG-3'
07_1080D2	5' -AACAAACCCATCAGAATC-3'
07_1090D1	5' -ATTGAGATGAAGCCATGTG-3'
07_1090D2	5' -TTCGTTGAGAAGGACATC-3'

Tableau 3. Séquences des amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des CDS ECU07_1070, ECU07_1080 (*ptp5*) et ECU07_1090 (*ptp4*) d'*E. cuniculi* par RT-PCR.

Amorces	Séquences
SWD1	5' -AARAAYTAYGARGAYCARTA-3'
SWR1	5' -TGRAAIACIGCCATYTGYYT-3'
SWD2	5' -TAGGAAGGAAATTAAGATG-3'
EhR1	5' -CAGTGCAAGAGTAACGGCAC-3'
EhD1	5' -CAGTGATCACGATTGGCATC-3'
EhD2	5' -ATGTTGAAGCTCTCGTTGC-3'
OligodT	5' -GACTCACTATAGGGCATGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
Adaptateur	5' -GACTCACTATAGGGCATGC-3'
EhD3	5' -ACGACTGCGTCTGGCGAC-3'
EhR4	5' -AGTGTCTTGTGGACACTC-3'

Tableau 4. Séquences des amorces utilisées pour l'identification des deux gènes de type *swp1* chez *E. hellem*. SWD1 et SWR1 sont des amorces dégénérées déduites à partir de l'alignement entre les séquences de EcSWP1 et EiSWP1. Les amorces SWD2 et EhR1 ont été utilisées pour l'amplification de la partie 5'. L'oligodT couplé à un adaptateur utilisé avec EhSWP-D2 a permis d'obtenir la partie 3' par RT-PCR. La totalité des deux gènes a été amplifiée à l'aide de l'amorce EhD2 associée à une amorce spécifique (EhR2 ou EhR3). Les amorces EhD3 et EhR4 ont été utilisées lors de l'étude de polymorphisme entre quatre isolats d'*E. hellem*.

l'identification des deux gènes SWP1 chez *E. hellem* sont répertoriées dans les **tableaux 2, 3 et 4**.

IV. Séquençage des vecteurs recombinants et analyses bio-informatiques

IV.1. Séquençage

Les clones recombinants sont séquencés par la méthode de **Sanger *et al.* (1977)** avec le kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman-Coulter). Les réactions sont réalisées dans un volume de 20 µl contenant 500 ng d'ADN plasmidique, 3,3 pmol d'amorce et 5 µl de DTCS Quick Start Master Mix selon les conditions préconisées par le fournisseur. Le séquençage est réalisé à l'aide du séquenceur CEQTM 2000 Beckman.

IV.2. Analyses bioinformatiques

Les électrophorégrammes obtenus après séquençage sont alignés grâce au Staden Package version 96.2 (Staden, 1996) disponible sur le serveur INFOBIOGEN (« INFOrmatique BIOMolécule et GENOME », <http://www.infobiogen.fr>). Les programmes BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, **Altschul *et al.*, 1990**) sont utilisés pour les recherches d'homologies avec les séquences nucléiques et protéiques disponibles dans les banques de données. Le programme CLUSTALW disponible sur le serveur INFOBIOGEN permet d'effectuer les alignements de séquences. FREQSQ, SAPS et MWCALC, disponibles sur ce même serveur, ont été respectivement utilisés pour les analyses statistiques des gènes et des protéines, pour le calcul des masses moléculaires et des points isoélectriques. L'identification de peptide signal a été réalisée à l'aide du programme PSORT (<http://www.psort.nibb.ac.jp>). Les domaines protéiques caractéristiques ont été recherchés avec le programme MOTIF (<http://www.motif.genome.ad.jp>) ou SMART ([67](http://smart.embl-</p></div><div data-bbox=)

Amorces	Séquences
AIPTP1-Bam (Al-1)	5' -CG GGATCC CCCTGTAATTTTCATATGC-3'
AIPTP1-Eco2	5' -CG GAATTC TGGTATACTAATTGGCAC-3'
AIPTP1-Bam2	5' -CG GGATCC GTGCCAATTAGTATACC-3'
AIPTP1-Eco (Al-3)	5' -CG GAATTC GCAGGGGCATCCACTAGA-3'
AIPTP2-Bam	5' -CG GGATCC TTAAGCCACGGCTACGGC-3'
AIPTP2-Eco	5' -CG GAATTC TCCCTCAGACTTTTCCTTG-3'
AIPTP3-Bam	5' -CG GGATCC TTGCCTCTAAAGACATTC-3'
AIPTP3-Eco	5' -CG GAATTC TTCAGGAACACCTATTGG-3'
1712-Bam	5' -CG GGATCC TCGTATTCGAGTAGTTGG-3'
1712-Eco	5' -CG GAATTC TGCGGATGTATGTTGTTG-3'

Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes *Al-ptp1*, *Al-ptp2* et *Al-ptp3* et leur clonage dans le vecteur d'expression pGEX-4T1-His. Les sites de restriction utilisés sont indiqués en italique.

Amorces	Séquences
07_1070Eco	5' -CC GAATTC CAAGGACCCAGTCGAAATC-3'
07_1070Xho	5' -CC GCTCGAG CATTTTTCTGCTCCTC-3'
07_1080Bam	5' -CG GGATCC TATCCCCTGTATCTTGAC-3'
07_1080Eco	5' -CG GAATTC CCATAGTTTCTTGCAGAA-3'
07_1090Eco	5' -CG GAATTC AGGGAGTTGGAGGAGTTCG-3'
07_1090Xho	5' -CG CTCGAG ACTCTCTTCGTACAGCGG-3'
AIPTP4Eco	5' -CG GGATCC TACGATGATAGAGTCACC-3'
AIPTP4Bam	5' -CG GAATTC CGTCAGTGTTCCTAACACC-3'
AIPTP5Eco	5' -CG GGATCC GAAACACATAGACGATATC-3'
AIPTP5Bam	5' -CG GAATTC TCCCTTCCACATTCCAGG-3'

Tableau 6. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification et le clonage des CDS ECU07_1070, ECU07_1080 (*ptp5*) et ECU07_1090 (*ptp4*) d'*E. cuniculi* et de leur homologues chez *A. locustae* dans le vecteur d'expression hétérologue pGEX-4T1-His. Les sites de restriction utilisés pour le clonage sont indiqués en italique.

Amorces	Séquence
EhSWP1N-Bam	5' -CG GGATCC GGAGAGAGAAGGAGAAGC-3'
EhSWP1N-Eco	5' -CG GAATTC TGTTGATGTGCTGTTTCGTC-3'
EhSWP1aC-Bam1	5' -CG GGATCC GGCGACAACAACAGTGGG-3'
EhSWP1aC-Eco1 (EhR2)	5' -CG GAATTC GGATGATTTACCTGCCTC-3'
EhSWP1bC-Bam2	5' -CG GGATTC GAGTCAAGGAAACAAGG-3'
EhSWP1bC-Eco2 (EhR3)	5' -CG GAATTC TAGAATAGCTTTTGGCGA-3'

Tableau 7. Séquences des amorces utilisées pour le clonage de EhSWP1N, EhSWP1aC et EhSWP1bC en vecteur d'expression procaryote pGEX-4T1-His. Les sites de restriction sont indiqués en italique.

heidelberg.de). La prédiction des potentiels sites de N- et O-glycosylation a été réalisée à l'aide du serveur Expasy (<http://www.expasy.org/>).

L'ensemble des analyses de séquences concernant *A. locustae* sont réalisées à partir des données disponibles sur les sites suivants : <http://jbpc.mbl.edu/Nosema/> et <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01?>.

V. Analyse des ADNc par RT-PCR

Des cellules HFF à confluence sont infestées par 1.10^6 spores d'*E. cuniculi* ou d'*E. hellem*. Une 1 heure après infestation, les spores extracellulaires résiduelles sont éliminées par lavage. Les ARN totaux de cellules HFF infestées sont extraits 96 h après infestation avec le kit RNeasy Mini kit (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur. 5 µg d'ARN totaux sont mis en présence de l'amorce reverse spécifique des gènes ou de l'oligoDT à une concentration finale de 1 µM puis dénaturés 10 min à 70°C et incubés de 5 min dans la glace. La réaction de transcription inverse est effectuée à 37°C pendant une heure après addition de 15 U de reverse transcriptase AMV (Pharmacia) et de dNTPs 2 mM. Les réactions PCR sont réalisées en utilisant 5 µl d'ADNc obtenu précédemment après dilution au 1/2, l'amorce antisens spécifique du gène d'intérêt et l'amorce directe correspondante (**Tableaux 3 et 4**). L'amplification comprend une dénaturation à 94°C pendant 5 min, 25 cycles comportant trois étapes de 20 secondes : une dénaturation à 94°C, une hybridation à 63°C et une élongation à 72°C. Après une élongation finale de 10-15 min, les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose 1,5% et visualisés par coloration au bromure d'éthidium ($0,4 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$).

VI. Expression de protéines recombinantes chez *Escherichia coli*

L'amplification des gènes d'intérêt a été réalisée à l'aide des amorces regroupées dans les **tableaux 5, 6 et 7** selon les conditions décrites précédemment. Les amplifiats sont ensuite

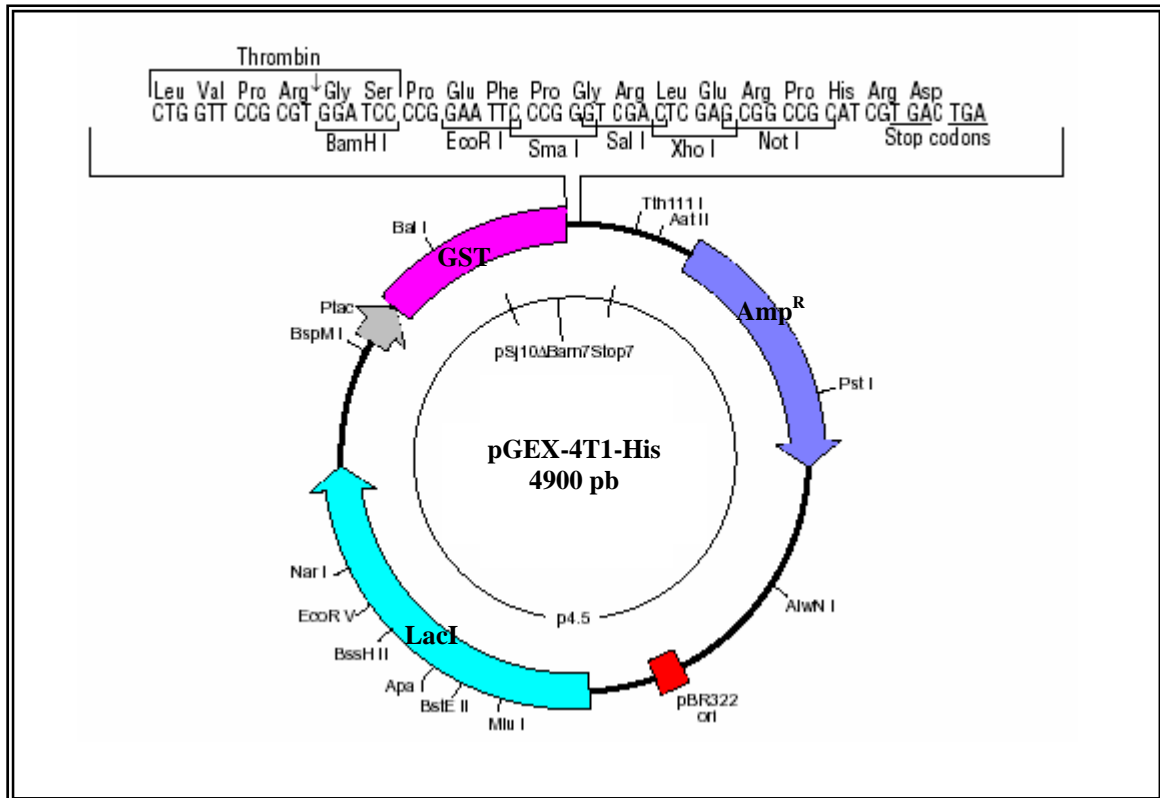


Figure 31. Carte du vecteur d'expression pGEX-4T1-His (d'après les informations de Pharmacia, <http://www.apbiotech.com>). Une séquence codant pour un épitope de 8 histidines a été ajoutée entre les sites *XhoI* et *NotI*. Les gènes d'intérêt ont été clonés entre les sites de restriction *BamHI* et *EcoRI*.

digérés par enzymes correspondantes, les sites de restriction ayant été introduits aux extrémités des produits d'amplification, puis clonés dans le vecteur d'expression pGEX-4T1-His digéré par les mêmes enzymes (**Tableaux 5, 6 et 7**).

Le vecteur d'expression de type procaryote utilisé possède en amont du site multiple de clonage une séquence codant la Glutathion-S-Transférase (GST). En aval de ce site, une séquence codant pour 8 histidines a été rajoutée : ce vecteur modifié est appelé pGEX-4T1-His (**Fig. 31**). La protéine de fusion « GST-protéine d'intérêt-épitope histidine » peut alors être purifiée par chromatographie d'affinité soit sur colonne de nickel soit sur colonne de glutathion. L'expression des protéines recombinantes est réalisée chez *E. coli* BL21⁺ sur milieu sélectif approprié (LB-ampicilline 100 µg/ml). Dès que la DO_{600nm} atteint 0,5, l'expression des protéines recombinantes est induite par ajout d'IPTG 2 mM. Après 4 heures, les bactéries sont centrifugées et les protéines bactériennes totales sont solubilisées dans du tampon de Laemmli contenant 2,5% de SDS et 100 mM de DTT pour être ensuite analysées en SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Chaque protéine de fusion a été purifiée sur colonne Ni-NTA (QIAGEN) et injectée à des souris CD1 afin de produire des anticorps spécifiques.

VII. Electrophorèse de protéines, Western blot et production d'anticorps

VII. 1. SDS-PAGE

Les protéines totales de cellules HFF infestées par *E. hellem* et de spores d'*E. cuniculi*, *A. locustae* et *P. grylli* sont extraites dans un tampon de lyse contenant 2,5% de SDS et 100 mM de DTT. Les spores sont soumises à des cycles de congélation/décongélation en azote liquide (10) suivi d'une série de traitements aux ultrasons (10 x 30 sec). Cet échantillon est ensuite placé 15 min à ébullition et centrifugé 5 min à 14000 g pour éliminer les débris sporaux.

Pour les extractions différentielles, les spores sont traitées dans un premier temps avec un tampon contenant 2,5% de SDS et dépourvu d'agent réducteur. Après centrifugation, le culot est traité à l'aide d'un tampon contenant 2,5% de SDS / 5 mM DTT puis 2,5% de SDS / 100 mM DTT. Le culot obtenu est ensuite traité avec un tampon contenant 2,5% de SDS / 200 mM DTT.

Les protéines (20 à 30 µg) sont analysées sur gel de polyacrylamide 10-12%. La migration s'effectue à 25 mA par gel puis les gels sont colorées au bleu de Coomassie.

VII. 2. Production des anticorps polyclonaux

La production des anticorps est réalisée chez des souris CD1 à partir des bandes protéiques séparées sur gel de polyacrylamide. Après séparation par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, les bandes protéiques correspondant aux protéines recombinantes d'intérêt sont découpées et broyées dans 200 µl d'eau stérile à l'aide d'un Potter. Les protéines purifiées sur colonne Ni-NTA (QIAGEN) sont précipitées à l'acide trichloracétique (TCA) 10% et remises en suspension dans du PBS. Les échantillons protéiques ainsi obtenus sont homogénéisés avec de l'adjuvant de Freund complet (Sigma) et injectés dans la cavité intra-péritonéale des souris. De l'adjuvant de Freund incomplet est ensuite utilisé pour les injections réalisées 14, 21 et 30 jours après la première injection. Le sang de l'animal est prélevé une semaine après la dernière immunisation pour évaluer la réponse immunitaire.

VII. 3. Western blot

Les protéines séparées par électrophorèse SDS-PAGE sont transférées sur membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride Polylabo) en utilisant un système de transfert semi-sec (Amersham). Une étape de saturation est effectuée en présence de PBS-lait écrémé 5% pendant 1h. La membrane est ensuite incubée pendant trois heures avec les anticorps

polyclonaux dilués en PBS-Triton X-100 0,1% (dilutions 1/500 à 1/2000). Après 4 lavages en PBS-Triton X-100 0,1%, la membrane est traitée une heure avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline (Promega) dilué au 1/10000. Quatre lavages en PBS-Triton X-100 0,1% puis un lavage en PBS sont ensuite effectués. La révélation est réalisée en présence de NBT et BCIP selon les recommandations du fournisseur (Promega). Dans le cas des études sérologiques, les sérums de lapins sont dilués au 1/500 en PBS-Triton 0,1%. Les anticorps secondaires anti-IgG de lapin sont testés au 1/10000.

VIII. Immunolocalisation

VIII. 1. Immunofluorescence indirecte

Des cellules HFF cultivées sur lamelles de verre sont infestées avec des spores d'*E. cuniculi* ou d'*E. hellem*. Les spores extracellulaires résiduelles sont éliminées 1h après infestation. Les cellules sont lavées 24, 48 ou 72h après infestation avec du PBS et fixées 20 min en présence de méthanol froid (-80°C). Dans le cas de spores extracellulaires (*E. cuniculi*, *E. hellem*, *A. locustae* et *P. grylli*) des frottis sont réalisés sur des lames de verre recouvertes de polylysine. Les préparations sont fixées de la même manière en présence de méthanol.

Après une étape de perméabilisation de 30 minutes avec une solution de PBS-Triton X-100 0,5% une étape de saturation en PBS-lait écrémé 5% pendant une heure est réalisée. Le matériel biologique est alors incubé une heure avec les anticorps primaires dilués en PBS/Triton X-100 0,1% (1/100). Plusieurs lavages en PBS-Triton X-100 0,1% sont réalisés avant d'incuber les cellules une heure avec les anticorps secondaires (anti-IgG de souris ou de lapin) conjugués au fluorochrome Alexa 488 (dilué au 1/1000, Molecular Probes) ou TRITC (dilué au 1/400, Sigma). Afin de mieux visualiser les foyers infectieux ou les noyaux des spores, une coloration au DAPI est réalisée. Les préparations sont observées à l'aide d'un

microscope à épifluorescence LEICA DMR. Le traitement des images est réalisé à l'aide du logiciel Adobe Photoshop 7.0.

VIII. 2. Microscopie électronique à transmission

Des cellules HFF infestées par *E. cuniculi* ou *E. hellem* ainsi que les spores d'*A. locustae* et *P. grylli* sont fixées dans une solution glutaraldéhyde 0,1% / formaldéhyde 4% pendant 1h. L'échantillon est ensuite incubé dans un mélange cryoprotecteur (glycérol 25%-DMSO 5%) pendant 2h. Ce mélange est ensuite congelé dans de l'azote pâteux obtenu à la pression de 10^{-6} Torr puis conservé en azote liquide. Des coupes ultrafines (80 nm) sont réalisées grâce à l'ultramicrotome (UltracutS Leica) équipé avec un système de cryocoupe puis déposées sur des grilles de nickel recouvertes d'une membrane de collodion et conservées en solution de saccharose 2,3 M. Les grilles sont lavées plusieurs fois avant d'être saturées en PBS-Trion X-100 0,1% / ovalbumine 0,1% pendant 1h. Elles sont ensuite incubées avec les différentes dilutions d'anticorps primaires pendant 3h. Après plusieurs lavages, les grilles sont incubées pendant 1h avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris (dilution 1/100) couplé à des billes d'or colloïdal de 10 nm de diamètre (Sigma) puis contrastées avec une solution d'acétate d'uranyle aqueux 0,5%-méthylcellulose 1,6% pendant 10 min. Après séchage, les coupes sont observées au microscope électronique à transmission Jeol 1200X.

IX. Détection des protéines glycosylées

IX.1. Par utilisation de lectines

Après perméabilisation en PBS-Triton X-100 0.5%, des frottis de spores d'*A. locustae* et de *P. grylli* ont été incubés en présence de la lectine ConA-FITC (Sigma) diluées au 1/40 pendant 1h. Les préparations sont observées au microscope à épifluorescence.

Des blots de protéines de spores d'*A. locustae* et *P. grylli* solubilisées en présence de SDS 2,5% et de DTT 100 mM sont traités avec les lectines ConA et GNA (dilution 1/1000, EY laboratory) pendant une heure. Après lavage en TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM), les membranes sont incubées avec des anticorps anti-biotine dilués au 1/1000 (Sigma) puis avec des anticorps anti-IgG de chèvre couplés à la peroxydase (dilution 1/10000, Sigma). La liaison des lectines aux protéines glycosylées est ensuite révélée par chimioluminescence (ECL+ Western blot detection kit, Amersham).

IX. 2. Purification sur colonne de Concanavaleine A

Pour la purification des protéines mannosylées sur colonne de concanavaleine A, les protéines d'*A. locustae* et de *P. grylli* sont extraites de façon séquentielle avec du SDS 1% puis du SDS 2,5% et de l'urée 9M. Les PTPs sont solubilisées avec une solution de DTT 2% comme décrit par **Keohane et al. (1996)**. 500 µl de billes de ConA-Agarose (Amersham) sont lavées avec du tampon de liaison (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM et CaCl₂ 1 mM) pour éliminer l'éthanol. L'échantillon enrichi en PTPs (50 µl) est incubé avec les billes de ConA et 150 µl de tampon de liaison. Après incubation sous agitation à 4°C pendant 3h, les billes sont lavées avec du tampon de liaison pour éliminer les protéines non fixées. Les protéines fixées à la colonne sont éluées de façon séquentielle avec 200 µl d'une concentration croissante (0,1 M, 0,2 M et 0,5 M) d'un compétiteur spécifique de la ConA, l' α -D-méthylmannopyranoside (Sigma). Les protéines purifiées sont précipitées avec du TCA 10% et lavées deux fois avec de l'éthanol. Le culot de protéines est repris avec 40 µl de tampon de Laemmli (SDS 2,5% et DTT 100 mM). Les différentes fractions sont séparées par SDS-PAGE 10% puis transférées sur membrane de PVDF. AIPTP1 est détectée par immunomarquage en utilisant des anticorps de souris anti-AIPTP1 dilués au 1/1000 puis

A	I S I P R N * Y D S L * G N C E R I	18
	ATC TCG ATC CCG CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT GAG CGG ATA	54
	T I P H * * * F C L T L R R R Y T M	36
	ACA ATT CCC CAC TAG TAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACC ATG	108
	G S S H H H H H H S S G T G S G L V	54
	GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGT ACC GGC AGC GGC CTG GTG	162
	P R G S H M L E L K Q L G S * * S R	72
	CCG CGC GGC AGC CAT ATG CTC GAG CTT AAG CAA TTG GGA TCC TAA TAG TCT AGA	216
	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i> <i>BamHI</i>	
	A S P R R S G C * Q S P K G S * V G	90
GCT AGC CCT AGG AGA TCC GGC TGC TAA CAA AGC CCG AAA GGA AGC TGA GTT GGC	270	
C C H R * A I T S I T P W G L * T G	108	
TGC TGC CAC CGC TGA GCA ATA ACT AGC ATA ACC CCT TGG GGC CTC TAA ACG GGT	324	
L E G F F	113	
CTT GAG GGG TTT TTT G	340	
B	R S R S R E I N T T H Y R G I V S G	18
	AGA TCT CGA TCC CGC GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA ATT GTG AGC GGA	54
	* Q F P T S N N F V * L * E G D I H	36
	TAA CAA TTC CCC ACT AGT AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT	108
	<i>NdeI</i>	
	M L E L K Q L G S * * S R A S P R R	54
	ATG CTC GAG CTT AAG CAA TTG GGA TCC TAA TAG TCT AGA GCT AGC CCT AGG AGA	162
	<i>XhoI</i> <i>BamHI</i>	
	S G C * Q S P K G S * V G C C H R *	72
	TCC GGC TGC TAA CAA AGC CCG AAA GGA AGC TGA GTT GGC TGC TGC CAC CGC TGA	216
A I T S I T P W G L * T G L E G F F	90	
GCA ATA ACT AGC ATA ACC CCT TGG GGC CTC TAA ACG GGT CTT GAG GGG TTT TTT	270	
G	271	

Figure 32. Séquences des sites de clonage des vecteurs d'expression utilisés pour étudier les interactions entre les protéines du tube polaire. (A) Séquence du site de clonage du vecteur pEATN-H, l'épitope de six histidines situé en amont du site de clonage est indiqué en rouge. (B) Séquence du site de clonage du vecteur pEK. Les sites de restriction utilisés pour les clonages de EcPTP1, EcPTP2 et EcPTP3 sont indiqués.

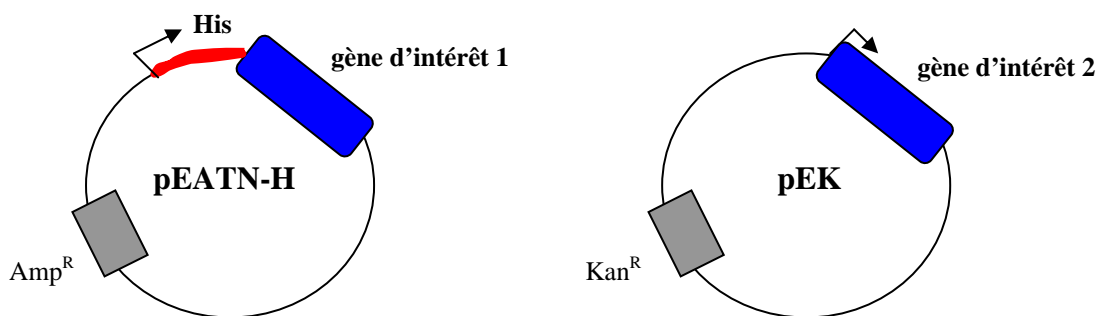


Figure 33. Représentation schématique des vecteurs recombinants obtenus après clonage des gènes d'intérêt dans les vecteurs pEATN-H et pEK. L'épitope de six histidines est indiqué en rouge. Les deux gènes codant les résistances à l'ampicilline (Amp^R) et à la kanamycine (Kan^R) sont indiqués. Les flèches représentent le sens de transcription.

des anticorps anti-IgG de souris conjugués à la phosphatase alcaline (1/10 000). La révélation est réalisée en présence de NBT et BCIP (Promega).

X. Co-expression chez *Escherichia coli* BL21-DE3

L'étude des interactions entre les protéines du tube polaire a été réalisée par co-expression chez *E. coli* BL21-DE3 (Fribourg *et al.*, 2001). Les gènes d'intérêt sont portés par deux plasmides différents (pEATN-H et pEK, Fig. 32 et 33). Le vecteur pEATN-H permet d'obtenir une protéine recombinante avec une étiquette de 6 histidines en N-terminal. La purification est réalisée sur colonne de nickel en conditions natives.

X.1. Clonage des gènes d'intérêt, transformation des bactéries par électroporation

Les gènes *ptp1* et *ptp2* d'*E. cuniculi* et d'*A. locustae* ainsi que *ptp3*, *ptp4* et *ptp5* d'*E. cuniculi* ont été amplifiés à l'aide des amorces représentées dans le **tableau 8**. Les produits d'amplification obtenus sont ensuite digérés par les enzymes correspondantes et clonés dans les vecteurs pEATN-H et pEK. Les vecteurs recombinants obtenus sont alors introduits dans la souche *E. coli* BL21-DE3 rendue électrocompétente pour étudier l'expression des protéines recombinantes. 1 µg de plasmide pEK ou pEATN-H recombinant et 1 µg du vecteur pRARE (améliorant la traduction des protéines) sont ajoutés aux bactéries. Le mélange est incubé dans la glace pendant 2 min puis soumis à un choc électrique selon les conditions suivantes : 2 500 V, 25 µF et 201 Ω. Les bactéries transformées sont étalés sur milieu LB contenant les antibiotiques appropriés.

X.2. Co-expression des protéines recombinantes

L'expression de chaque protéine d'intérêt est induite par addition d'IPTG 2mM. Après avoir vérifié que chaque protéine était bien exprimée indépendamment, les étapes de co-

Amorces	Séquences
EcPTP1-Xho	CCG CTCGAG GCAACCGCACTGTGCAGC
EcPTP1-BglII	GGA AGATCT CTAGCAGCATTGGACAGCAG
EcPTP1-XhoIB	CCG CTCGAG GGAACATCCGGTATTCCT
EcPTP1-BglIIB	GGA AGATCT AGGAATACCGGATGTTCC
EcPTP2-Nde	GGAATTCC CATATG ACGATGGTCCATCCTTCAG
EcPTP2-Bam	CG GGATCC TTACTCTAGACCCTCGCCGTC
EcPTP3-SalI	ACGCGTCGACGATCTTGGTTCTCGATCA
EcPTP3-BglIII	GGA AGATCT CTAACGGGCTATCTTTCC
EcPTP4-Nde	GGAATTCC CATATG AAAGACAGGGAGTTGGAG
EcPTP4-Bam	CG GGATCC CTAATTTACAACAGGCTTTC
EcPTP5-Nde	GGAATTCC CATTAT GTATCCCCTGTATCTTGAC
EcPTP5-Bam	CG GGATCC CTACCATAGTTTCTTGAC
AlPTP1-Xho	CCG CTCGAGA ATGATCCCTGTAATTC
AlPTP1-Bam	CG GGATCC TTAGCAGGGGCATCCACTAG
AlPTP2-Nde	GGAATTCC CATATG TTAAGCCACGGCTACGGC
AlPTP2-Bam	CG GGATCC TTATCCCTCAGACTTTTCC
coexpD	GGGAATTGTGAGCGGATA
coexpR	TGCTCAGCGGTGGCAGCA

Tableau 8. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes *ptp1*, *ptp2*, *ptp3*, *ptp4* et *ptp5* d'*E. cuniculi* et de *ptp1* et *ptp2* d'*A. locustae* et leur clonage dans les vecteurs d'expression pEATN-H et pEK pour la co-expression chez *E. coli*. Les sites de restriction ajoutés en 5' des amorces sont indiqués en italique. Les amorces coexpD et coexpR sont utilisées pour le séquençage des vecteurs recombinants.

expressions sont réalisées. Pour cela, des bactéries exprimant l'une des deux protéines d'intérêt sont rendues thermocompétentes afin d'être transformées avec le plasmide recombinant codant pour la seconde protéine d'intérêt.

Chaque clone contenant les trois vecteurs (pRARE, pEATN-H et pEK) est mis en culture en milieu LB supplémenté par les trois antibiotiques (chloramphénicol, ampicilline et kanamycine). L'expression des protéines recombinantes est induite par addition d'IPTG (2 mM) à 30°C pendant 4h afin de limiter les risques de production de corps d'inclusion. Une extraction des protéines en tampon de Laemmli (SDS 2,5% et DTT 100 mM) est réalisée pour vérifier que les 2 protéines sont exprimées et comparer leur niveau d'expression.

Afin d'étudier d'éventuelles interactions, les protéines recombinantes doivent rester dans leur conformation active et donc être solubilisées en conditions non-dénaturantes. Pour cela, 10 ml de milieu sélectif sontensemencés et incubés à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0,5. L'expression est induite par addition d'IPTG 2 mM à 30°C pendant 4h. Le culot bactérien est repris avec 900 μ l de tampon de lyse (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM et imidazole 10 mM, pH 8,0) et 100 μ l de lysozyme à 10 mg/ml. Après 30 min d'incubation dans la glace, un traitement aux ultrasons (10 cycles de 30 s) est effectué. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 60 min à 4°C à 18 000g afin d'éliminer les débris bactériens.

X.3. Purification des protéines par chromatographie d'affinité

Une des 2 protéines recombinantes étant fusionnée à un épitope de 6 histidines, elle présente une forte affinité pour les ions nickel, caractéristique qui permet sa purification sur colonne de nickel (Qiagen). La purification est réalisée en conditions natives grâce à un gradient croissant d'imidazole, compétiteur des résidus histidine, selon les recommandations du fournisseur.

Amorces	Séquences
5'TubKpnI	5' -GGGGTACCACCAGGACCTTTTTCTGTATCT-3'
5'TubKpnI-b	5' -GGGGTACCCCGCAGGGAGCTAGAGACAG-3'
5'TubNsiI	5' -CCAATGCATTTGAAGGGCAAATTTTTTC-3'
5'TubNsiI-b	5' -CCAATGCATAATCCCGTGCTCCCCGCTGATC-3'
3'TubPacI	5' -CCTTAATTAAGGATTTAATCG-3'
3'TubXbaI	5' -TGCTCTAGAAGACAGGGCATCCAGTGC-3'
β-tubNsiI	5' -CCAATGCATATGAGAGAAATCATACTTG-3'
β-tubPacI	5' -CCTTAATTAACGAATTC TAGAACTCCTCAGC-3'
TubMutNsiI	5' -CCAATGCATATGAGAGAAATCATACA ^G TTGCA-3'
TubMutEcoRV	5' -GCAGATATCGTACAGCGCCTCGTTGTCAATGCAG ^T ACGTCTC-3'
c-MycEco	5' -AATTCGAGCAGAAGCTCATCTCCGAGGAGGACCTGCTTTAAT-3'
c-MycPac	5' -TAAAGCAGGTCCTCCTCGGAGATGAGCTTCTGCTCG-3'

Tableau 9. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification du gène codant la β-tubuline d'*E. cuniculi* (ECU03_0820i, NP_597591) ainsi que des régions 5' amont et 3' aval. Les sites de restriction rajoutés aux extrémités sont en italiques. Les amorces TubMutNsiI et TubMutEcoRV ont été utilisées pour introduire les deux mutations sur la β-tubuline. Les positions changées sont indiquées en rouge. Les amorces c-MycEco et c-MycPac permettent de créer l'épitope c-Myc.

Amorces	Séquences
TrpB-NsiI	5' -CCAATGCATCATTACTTAACCCC-3'
TrpB-Eco	5' -GCCAATTCGATTTCCCTCGTGCTTTC-3'
TrpB-D1	5' -AGGCGTTGCTGGCGAAGC-3'
TrpB-D2	5' -GGTATGAAAGCGCCGATG-3'
TrpB-R	5' -TTCAACGTCTTTGGCACC-3'

Tableau 10. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification du gène codant la tryptophane synthase β d'*E. coli* (numéro d'accèsion NZ_AAMK0100005) à partir du vecteur pSAG1/TrpB (Sibley *et al.*, 1994). Les sites de restriction rajoutés aux extrémités sont en italiques. Les amorces TrpB-D1, TrpB-D2 et TrpB-R ont été utilisées pour le séquençage de la construction ainsi que pour le criblage des transformants.

Amorces	Séquences
MetAPNsiI	5' -CCAATGCATATGGCTATCTCAATCAAG-3'
MetAPEcoRI	5' -CCGGAATTCCTTCGTGCGGAGATTAT-3'

Tableau 11. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification du gène codant la méthionine aminopeptidase de type I d'*E. coli* (numéro d'accèsion U70214) à partir du vecteur pet28b-MetAP1 (Lowther *et al.*, 1998). Les sites de restriction rajoutés aux extrémités sont en italiques.

Les différents extraits et fractions de purification sont analysés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (10-15%) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), et visualisés par coloration au bleu de Coomassie. Des Western blot sont également réalisés afin de repérer à l'aide d'anticorps spécifiques les protéines d'intérêt.

XI. Essais de transfection de la microsporidie *E. cuniculi*

XI.1. Réalisation des constructions plasmidiques

Les amorces utilisées sont regroupées dans les **tableaux 9, 10 et 11**.

Les différents vecteurs ont été construits à partir du plasmide pTUB8-GFP contenant le promoteur de la β -tubuline de *Toxoplasma gondii* fusionné au gène codant la GFP (**Hettmann et al., 2000**). La séquence promotrice de la β -tubuline de *T. gondii* située entre les sites *KpnI* et *NsiI* a été remplacée par deux régions 5' situées en amont de l'ATG (600 et 1200 pb) de la β -tubuline d'*E. cuniculi* (ECU03_0820i, NM_001040955). La région de 1200 pb a été amplifiée grâce aux amorces 5'Tub*KpnI* et 5'Tub*NsiI*. Le fragment de 600 pb a été amplifié grâce aux amorces 5'Tub*KpnI*-b et 5'Tub*NsiI*. Une région 5' amont de la β -tubuline d'*E. cuniculi* de 600 pb comprenant les 30 premiers acides aminés de la β -tubuline a été amplifiée grâce aux amorces 5'Tub*KpnI*-b et 5'Tub*NsiI*-b pour réaliser des fusions traductionnelles. Ces régions sont ainsi clonées en amont du gène codant la GFP qui est présent entre les sites *NsiI* et *PacI* du vecteur d'origine pTUB8-GFP. Enfin, la séquence 3' aval de la β -tubuline de *T. gondii*, située entre les sites *PacI* et *XbaI* a été remplacée par une région 3' aval de 600 pb située en aval du codon stop de la β -tubuline d'*E. cuniculi*. Cette région a été amplifiée à l'aide des amorces 3'Tub*PacI* et 3'Tub*XbaI*.

L'étape suivante a consisté à remplacer le gène codant la GFP par celui codant la β -tubuline d'*E. cuniculi*. Ce gène a été amplifié à l'aide des amorces β -Tub*NsiI* et β -Tub*PacI*, présentant des sites *NsiI* et *PacI* à leurs extrémités. Ce gène β -tubuline a été cloné en aval de

ces régions régulatrices précédemment clonées (p600 et p1200), remplaçant ainsi le gène codant la GFP. Un épitope c-Myc, a ensuite été introduit à l'extrémité 3' de la β -tubuline entre les sites *EcoRI* et *PacI*, le site *EcoRI* ayant été introduit sur l'amorce β -tubuline reverse.

La construction pEnp1-myc contient la totalité de la séquence codant la protéine de l'endospore Enp1 fusionnée à l'épitope c-Myc en C-terminal (ECU01_0820, XM_960824). La région 5' amont, constituée des 1200 nucléotides présents en amont de l'ATG est clonée entre les sites *KpnI* et *NsiI*. Cette région est fusionnée à la séquence codant Enp1 entre les sites *NsiI* et *XhoI*. Un épitope c-myc est cloné en aval entre les sites *XhoI* et *PacI*. La région 3' aval présentant les 450 nucléotides en aval du codon stop du gène *enp1* est introduite entre les sites *PacI* et *BamHI*.

XI.2. Stratégies pour les essais de transfections stables

XI.2.1. Création d'une β -tubuline « mutante » résistante à l'albendazole

Ces constructions ont été réalisées à partir des fusions transcriptionnelles contenant le gène codant la β -tubuline entière fusionnée à l'épitope c-Myc sous le contrôle des deux régions 5' amont p600 et p1200. Les deux mutations au niveau des résidus Histidine 6 et Phénylalanine 200 ont été introduites par PCR en changeant une seule position au niveau des deux codons : l'amorce directe TubMut*NsiI* permet l'introduction de la mutation au niveau du résidu Histidine 6 (cac) vers une Glutamine (cag). La séquence codant la β -tubuline présente en position 624 un site *EcoRV*, en aval du codon ttc codant la Phénylalanine 200. La seconde mutation Phénylalanine 200 (ttc) vers Tyrosine (tac) a été introduite suite à l'amplification obtenue avec l'amorce reverse TubMut*EcoRV*. Ce fragment de 620 nucléotides est ensuite introduit entre les sites *NsiI* et *EcoRV* pour remplacer la partie codant la partie N-terminale. L'épitope c-Myc maintenu en 3' de la β -tubuline mutante permet de détecter les transformants.

Le protocole de sélection est réalisé de la manière suivante : après transfection par électroporation, les spores microsporidiennes microsporidies sont mise en contact avec des cellules HFF dans du milieu MEM supplémenté avec 10% de SVF. L'albendazole à 10 ng/ml est rajouté dans le milieu 24h après transformation.

XI.2.2. Résistance à la fumagilline

Le gène codant la méthionine aminopeptidase de type I d'*Escherichia coli* (U70214) a été amplifié à l'aide des amorces MetAP*Nsi*I et MetAP*Eco*RI contenant des sites *Nsi*I et *Eco*RI à leur extrémités. Cette amplification a été réalisée à partir du vecteur pet28-MetAP1 (Lowther *et al.*, 1998). Ce fragment de 792 nucléotides a été introduit entre les sites *Nsi*I et *Eco*RI à la place de la séquence codant la β -tubuline, en phase avec l'épitope c-Myc et sous le contrôle des différentes régions 5' amont de la β -tubuline. Une fusion traductionnelle a été réalisée avec la région 5' amont présentant en plus des 600 pb en amont de l'ATG, les 30 premiers codons de la β -tubuline.

Après choc électrique, les microsporidies sont mises au contact de cellules HFF en présence de milieu MEM supplémentée avec 10% de SVF. La fumagilline à 10 ng/ml est rajoutée dans le milieu 24h après transformation.

XI.2.3. Complémentation de l'auxotrophie au tryptophane

Le gène codant la tryptophane synthase β d'*E. coli* (NZ_AAMK01000005) est amplifié à l'aide des amorces TrpB-*Nsi*I et TrpB-*Eco*RI à partir du vecteur pSAG1/trpB (Sibley *et al.*, 1994). Ce gène fragment de 1200 bases est introduit entre les sites *Nsi*I et *Eco*RI en aval des différentes régions « régulatrices » de la β -tubuline et en amont de l'épitope c-Myc. Une fusion traductionnelle a également été réalisée à l'aide de la région 600- β tub30aa.

Pour le protocole de sélection, les cellules HFF sont prétraitées pendant une nuit avec de l'interféron γ (200 U/ml, Sigma) en présence de milieu MEM déplété en tryptophane (Milieu Tryp⁻) supplémenté avec 3% de SVF dialysé (Invitrogen), 200 μ M d'indole (Sigma) et 500 μ M de L-sérine (Sigma). Après transformation, les parasites sont incubés 24h en milieu MEM-10% SVF. La culture est ensuite réalisée en milieu Tryp⁻ supplémenté avec 200 μ M d'indole, 500 μ M de L-sérine et 200 U/ml d'IFN- γ à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% en CO₂.

XI.3. Les différentes techniques utilisées

XI.3.1. La magnétofection

Des cellules HFF sont cultivées en plaques 24 puits et infestées par *E. cuniculi*. L'ADN plasmidique (10 à 30 μ g d'ADN / μ l de billes), correspondant aux différentes constructions réalisées, est incubé 15 min avec les billes magnétiques en milieu MEM sans sérum. 50 μ l à 200 μ l du mélange ADN/billes sont mis en contact avec les cellules infestées depuis 72h. L'ensemble est placé 5 à 30 min sur une plaque magnétique. Les cultures sont ensuite réalisées en milieu MEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Ce protocole a également été appliqué à des cellules 30 min après infestation.

XI.3.2. L'électroporation

Les expériences d'électroporation d'*E. cuniculi* ont été réalisées dans un tampon appelé cytomix incomplet (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 7,6), 25 mM Hepes (pH 7,6), 2 mM EGTA (pH 7,6) et 5 mM MgCl₂) supplémenté de glutathion 5 mM et ATP 2 mM. Des chocs électriques ont également été réalisés en milieu sans sérum ou en PBS.

Différents essais d'électroporation ont été réalisés à partir de cellules infestées mises en suspension après traitement à la trypsine ou de stades extracellulaires récupérés dans le surnageant de culture. Après centrifugation, le culot est lavé deux fois en PBS puis avec 5 ml de cytomix incomplet. Après centrifugation, le culot est repris dans 600 µl de cytomix additionné de 5 mM glutathion et 2 mM ATP. Cette suspension est mélangée avec l'ADN (30 à 100 µg linéaire ou circulaire) puis déposée dans une cuve d'électroporation 0,4 cm (EQUIBIO, Biorad). Différentes conditions de choc électrique ont été appliquées.

Après électroporation, la suspension est déposée dans une boîte de cellules HFF saines à confluence pour les essais réalisés avec les stades extracellulaires et non à confluence pour les essais réalisés à partir de cellules infestées. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% en CO₂ dans du milieu MEM supplémenté avec 10% de SVF.

XI.3.3. La biolistique

XI.3.3.1. Liaison de l'ADN aux billes de tungstène

Pour 20 tirs, 150 mg de microbilles de tungstène M5 (0,4 µm, Biorad) sont stérilisées par trois lavages en éthanol 100 puis trois lavages à l'eau ultrapure et traitées au sonicateur (10 impulsions d'une seconde). Les microbilles sont reprises dans 150 µl d'eau stérile.

Pour une série de 5 tirs, 25 µl de la solution de microbilles de tungstène sont mélangés à 2,5 µg ou 10 µg d'ADN, 25 µl de CaCl₂ (2,5M) et 10 µl de spermidine (0,1M). Le mélange est vortexé pendant 5min puis incubé 15 min à température ambiante. Après centrifugation, le mélange billes/ADN est déposé sur une grille métallique à l'intérieur de la cartouche.

XI.3.3.2. Bombardement à l'aide du canon à particules

Des cellules MDCK infestées par *E. cuniculi* sont cultivées sur des lamelles de verre. Les lamelles de verre sont placées sur une boîte de Pétri placée à différents niveaux à l'intérieur de la chambre et centrée par rapport au canon. Différentes conditions de pression (1

à 3 bar) et de vide (30 à 40 mm Hg) permettant la dispersion des billes ont été testées (Ibrahim *et al.*, 2000).

XI.4. Détection des transformants

Les cellules infestées sont fixées à différents temps après infestation (24h, 48h, 72h ou 120h). Les parasites exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) sont recherchés à 420 nm au microscope à épifluorescence. Les parasites exprimant l'épitope c-Myc sont recherchés grâce à d'anticorps anti-c-Myc dilués au 1/1000, ceux exprimant la tryptophane-synthase β (TrpB) fusionné à c-Myc sont aussi identifiés à l'aide d'anticorps anti-TrpB dilués au 1/1000. L'expression des gènes d'intérêt est également recherchée par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques du transgène (β -tubuline, MetAP1, TrpB et c-Myc) après extraction des messagers à différents temps après infestation. Enfin, la mise en évidence des transformants a aussi été réalisée en Western blot à l'aide des différents anticorps (anti-c-Myc ou anti-TrpB).

XII. Digestion trypsique et analyse en MALDI-TOF

La bande protéique de 70 kDa a été extraite manuellement d'un gel SDS-PAGE monodimensionnel coloré au bleu de Coomassie. Après plusieurs lavages en solutions de décoloration (25 mM de NH_4HCO_3 pendant 15 min suivi d'un bain de 15 min avec une solution d'acétonitrile 50% (v/v) contenant 25 mM de NH_4HCO_3), le gel est déshydraté avec une solution d'acétonitrile 100%. Après séchage, le gel est incubé avec une solution de réduction (NH_4HCO_3 , 10 mM DTT) pendant 1h à 37°C puis avec une solution d'alkylation (NH_4HCO_3 , 55 mM d'iodoacétamide) pendant 30 min à 37°C. Plusieurs lavages avec les solutions de décoloration sont réalisés avant un lavage final en eau pure pendant 15 min avant un traitement à l'acétonitrile 100%. Selon la quantité de protéines, 2 à 3 μl de trypsine

modifiée diluée (0,1 µg.ml dans 25 mM de NH₄HCO₃, Promega) sont ajoutés. Après 30 min d'incubation, 7 µl de 25 mM de NH₄HCO₃ sont ajoutés sur le gel pour une incubation 5h à 37°C. Pour l'analyse en MALDI-TOF, un aliquot de 0,5 µl est mélangé avec 0,5 µl de solution de matrice (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique saturé à 50% avec une solution d'acétonitrile 60%-acide trifluoroacétique 0,1%). La solution résultante est déposée sur la plaque et rincée avec 2 µl de TFA 0,1% pendant 30 sec. Le mélange de peptides est analysé par un spectromètre de masse de type MALDI-TOF avec une moyenne de masse allant de 0 à 4200 Da. Les spectres de 200 points sont combinés pour générer une empreinte de masse peptidique (PMF) permettant une recherche dans les bases de données. Les spectres sont calibrés en utilisant un mélange angiotensine II (1046,54 Da), substance P (1347,74 Da, Bombesine (1619,82 Da) et ACTH (18-39, 2465,20 Da) en tant que standards externes. Des recherches ont été entreprises contre la nouvelle base de données d'*A. locustae*. Les données ont été traitées avec une version intranet de Mascot 1.7. Tous les peptides sont supposés être mono-isotopique et [M+H⁺] (ion moléculaire protoné). Différentes modifications ont été recherchées : carbamidométhylation des cystéines, N-acétylation des protéines et oxydation des méthionines. Dans la plupart des cas, les protéines ayant un score supérieur à 70 et une moyenne de couverture de 20% sont automatiquement validées. Pour celles présentant un score inférieur à 70 et ayant un taux de couverture inférieur à 20%, une vérification manuelle est réalisée.

Résultats

Résultats

Les données concernant la composition du tube polaire et de la paroi des microsporidies sont encore très limitées. Ainsi, trois protéines du tube polaire (PTP1, PTP2, PTP3) ont été identifiées chez *E. cuniculi*, des protéines de types PTP1 et PTP2 ayant également été décrites chez les deux autres espèces du genre *Encephalitozoon*, *E. hellem* et *E. intestinalis*. En ce qui concerne la paroi sporale, seule une protéine de l'exospore (SWP1) a été mise en évidence chez *E. cuniculi*. Deux protéines de la même famille (SWP1 et SWP2) sont présentes chez *E. intestinalis*. L'identification de nouvelles protéines du tube polaire et de la paroi sporale s'inscrit donc dans un travail visant à améliorer la connaissance de ces deux structures jouant des rôles importants dans les interactions avec l'hôte et dans le processus d'invasion.

La première partie des résultats sera consacrée à la caractérisation de protéines du tube polaire de types PTP1, PTP2 et PTP3 chez *Antonospora locustae* et *Paranosema grylli*, deux espèces microsporidiennes parasites d'insectes. Cette étude a été initiée par la comparaison des génomes d'*E. cuniculi* et d'*A. locustae* mettant en évidence une conservation de la synténie de nombreux gènes. L'identification de deux nouvelles protéines du tube polaire (PTP4, PTP5) sera ensuite décrite chez *Encephalitozoon cuniculi*, *A. locustae* et *P. grylli*. Dans une deuxième partie, nous présenterons des résultats préliminaires concernant l'analyse des interactions entre certains composants du tube polaire par une méthode de co-expression chez *E. coli*. Nous décrirons, dans la troisième partie, la stratégie utilisée pour identifier les séquences complètes de deux protéines de type SWP1, protéines de la paroi sporale chez la microsporidie *Encephalitozoon hellem*. Nous montrerons que la variabilité de l'extrémité codant la partie C-terminale de ces protéines peut être un bon outil de génotypage. La dernière partie traitera des essais de mise au point d'une technique de transfection de la microsporidie *E. cuniculi* dans le but d'envisager des études fonctionnelles par génétique inverse.

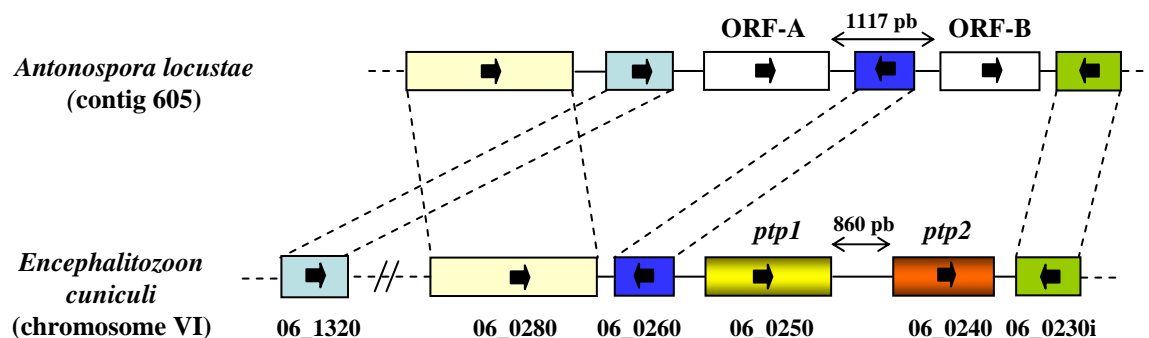


Figure 34. Conservation de l'organisation des gènes entre *Encephalitozoon cuniculi* et *Antonospora locustae*, centrée sur les deux gènes *ptp1* et *ptp2* d'*E. cuniculi*. Une partie du contig 605 d'*A. locustae* est comparée avec une région du chromosome VI d'*E. cuniculi* contenant les gènes *ptp1* et *ptp2* organisés en tandem. Les gènes homologues en positions conservées entre le contig 605 et le chromosome VI sont représentés par des rectangles de couleur identique reliés par des pointillés. Les ORF-A et ORF-B non annotés sont représentés par des rectangles blancs. Les flèches indiquent le sens de transcription. ECU06_1320 et ECU06_0280 sont séparés par 130 kb. Sur le contig 605, les ORF-A et ORF-B occupent les positions 11156-12415 et 13536-14396 (<http://jbpc.mbl.edu/Nosema/Contigs/Contig605A.html>). Dans la nouvelle base de données d'*A. locustae* comportant 2600 CDS, les ORF-A et B portent les numéros 1048 et 1050 (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01?page=orfs>).

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication qui est reportée en annexe (Polonais *et al.*, 2005). Deux autres sont en cours de rédaction.

I. Identification de nouvelles protéines du tube polaire chez différentes espèces microsporidiennes

I.1. Protéines de type PTP1, PTP2 et PTP3 chez *Antonospora locustae* et *Paranosema grylli*, deux microsporidies parasites d'insectes

Chez *Encephalitozoon cuniculi*, trois protéines du tube polaire (PTP1, PTP2 et PTP3) ont été préalablement identifiées (Delbac *et al.*, 1998 et 2001; Peuvel *et al.*, 2002). Les gènes *ptp1* (ECU06_0250, NP_585781) et *ptp2* (ECU06_0240, NP_585780) sont localisés sur le chromosome VI et séparés de 860 pb (Fig. 34). Chez les deux autres espèces du genre *Encephalitozoon*, *E. hellem* et *E. intestinalis*, le gène *ptp2* est également trouvé à proximité du gène *ptp1*, révélant donc une conservation de la synténie (Delbac *et al.*, 2001).

I.1.1. Mise en évidence de 2 ORFs sur un contig d'*A. locustae* pouvant correspondre à des gènes de type *ptp1* et *ptp2*

Un projet de séquençage du génome d'*Antonospora locustae* (taille estimée à 5,4 Mb) est en cours de réalisation. Au début de mon travail, 2,2 Mb répartis sur 199 contigs de 3 à 50 kb étaient disponibles (<http://jbpc.mbl.edu/Nosema/Contigs/>). Une première analyse des séquences de ce génome n'a pas permis de mettre en évidence des gènes homologues à *ptp1* et *ptp2*. Cependant la comparaison du génome d'*E. cuniculi* avec les contig d'*A. locustae* montre une conservation de la position de nombreux gènes. C'est le cas notamment du contig 605 qui présente plusieurs cadres de lecture ouverts (ORFs) dont les homologues sont situés sur le chromosome VI d'*E. cuniculi*, et plus particulièrement à proximité du locus *ptp1/ptp2* (Fig. 34). Chez *E. cuniculi*, en amont de *ptp1*, ECU06_0260 (NP_585782) présente 48% de

A.

MFSQNNIDRHMSCCTYIISLKHVCVKKAGAEKTVCLQASKTTGGTYSNKTRFIVKKTINRS

1
 FPNTTMKFKASVLAVAYLTTARGNDPCNFICDGGGSGGGNGGGNMIFVKPVATIHKQQPV 55

CNCATGRGYSPGGARGGSYAPPQSSGYGGYGAAGGYNGYTGYGPGYSTPSIPYVQIPVP 115

TFPPVPPPPQAYAAPSGEPPKEKIITTTVTPLKSTTPVCSVTTIQECEEVPVEPETITM 175

1
 HVPEKPPKNDTPPPQSPPQMQPMMQSMVQPIVPISIPLQAAPAPPPQAQAPAPAPPQAP 235

2 3
APPPQAQAPPPQAQASVPMYSQAYYQAPPPKPAPRAQYTSGGSIPKDVCICDTTG 295

4 5
 SGGNYQEGGMNCADQTNVDLAACREGNSYPSANITNVEVPLAAASQKASPPLEYSSGCPC 355

B.

↓
 MKRLVSLVLLYSILEPVFALSHGYGSKYSVNAVSGSSGAVNNAAREKTLSLEQNRVLKAA 60

IAQNAAASLPPGMAGSFLTNNPKCKSSSVDGNSMLQTKLNQDCVEKVIEKNERAKKYAQ 120

ILSKPSSKECIKKLNPNAMVCQARKVMSRVEEPYQIIMYGNVVQLVEDGRVKMMGVVE 180

KIHYDVEKKNMRTPSPLKKPTALLEFNELGGLLKOKGKIPAAKSPDPCLSSCIEALEKKA 240

AVEGQNEGCGECESLMEITTVRPGIFKDASKKKEETPSGENKEKSEG 287

Figure 35. Séquences en acides aminés déduites des ORF-A (A) et ORF-B (B). (A) Les 3 méthionines pouvant jouer le rôle d'initiation de la traduction sont en gras et soulignées. Seule la troisième est suivie d'un peptide signal (en gras et souligné). L'ORF-A code alors pour une protéine de 355 aa riche en proline. 12 résidus cystéine sont présents dont un en position C-terminale. Les 5 répétitions internes riches en proline sont numérotées et soulignées. (B) L'ORF-B code pour une protéine de 287 aa. L'aa majeur est la lysine et 8 résidus cystéine sont présents. Les aa majeurs (P pour PTP1, K pour PTP2) sont surlignés en noir. Les résidus cystéine sont surlignés en gris. Les sites de clivage prédits des peptides signaux sont indiqués par des flèches. Le nombre d'aa est indiqué à droite.

similarité avec une protéine de *Drosophila melanogaster* appartenant à la famille des facteurs de transcription de type E2F/DP (Q24318). Un homologue de E2F/DP, localisé sur le contig 605 d'*A. locustae*, est entouré par deux ORFs dont les séquences ne présentent aucune homologie avec celles d'*E. cuniculi* ni avec celles des bases de données. Ces deux ORFs ont été désignés ORF-A et ORF-B (**Fig. 34**). Chez *E. cuniculi*, un gène codant pour une protéine nucléaire (ECU06_0230i, NP_585779) est présent en aval du gène *ptp2*. Ce même gène est retrouvé en aval de l'ORF-B au niveau du contig 605. Un gène codant une leucyl-tRNA synthétase occupe la seconde position en amont de *ptp1* chez *E. cuniculi* (ECU06_0280, NP_585784) ou de l'ORF-A chez *A. locustae*. En amont de l'ORF-A, se trouve un gène à fonction inconnue dont l'homologue est localisé sur le chromosome VI d'*E. cuniculi* mais en position beaucoup plus éloignée du locus *ptp1/ptp2* (ECU06_1320, NP_585888). Il est important de souligner que pour l'ensemble des gènes considérés, le sens de transcription est conservé entre les deux espèces microsporidiennes. A la vue de ces données, nous sommes intéressés aux ORF-A et ORF-B qui pourraient correspondre à des orthologues des gènes *ptp1* et *ptp2* dont les séquences auraient fortement divergé au cours de l'évolution.

L'ORF-A présente 3 codons ATG en phase pouvant jouer le rôle d'initiation de la traduction. Cependant, seul le troisième ATG localisé 195 nucléotides (nt) en aval du premier est suivi d'une séquence codant pour un peptide signal potentiel de 18 acides aminés (aa), caractéristique des protéines sécrétées comme c'est le cas des protéines du tube polaire jusqu'alors identifiées. La protéine ainsi obtenue est constituée de 355 aa et présente plusieurs propriétés similaires aux protéines PTP1 identifiées chez *Encephalitozoon* : un pI acide (5,2), une forte teneur en proline (19,8%), des répétitions internes et de nombreux résidus cystéine dont un en position C-terminale (**Fig. 35A** et **Tableau 12A**). L'ORF-B (864 pb) code pour une protéine putative de 287 aa. Après clivage du peptide signal (19 aa), cette protéine présente une masse moléculaire de 29 170 Da, un pI basique (9,1), une forte teneur en lysine

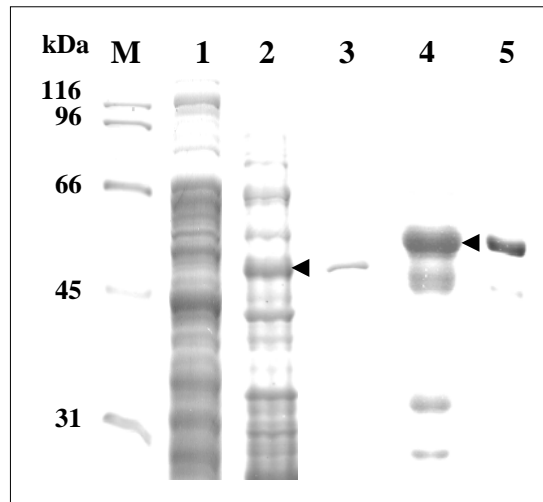


Figure 36. Expression des protéines recombinantes correspondant aux ORFs A et B chez *Escherichia coli*. Les protéines de bactéries *E. coli* BL21⁺ transformées avec les vecteurs pGEX-4T1-ORF-A (pistes 2 et 3) et le pGEX-4T1-ORF-B (pistes 4 et 5) sont analysées en SDS-PAGE (10%) après solubilisation en tampon de Laemmli. Pour l'ORF-A, la protéine exprimée correspond à la partie N-terminale (aa 21 à 222). Pour l'ORF-B, la protéine entière en dehors du peptide signal a été exprimée (aa 20 à 287). Les flèches indiquent les bandes supplémentaires de 50 kDa et 55 kDa correspondant aux deux protéines recombinantes. Piste 1: Contrôle non induit ; pGEX-4T1-ORF-A (piste 2) et pGEX-4T1-ORF-B (piste 4) après induction IPTG. Les pistes 3 et 5 correspondent aux protéines recombinantes des ORFs A et B après purification sur colonne Ni-NTA. M: marqueur de masse moléculaire en kDa (Biorad). Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

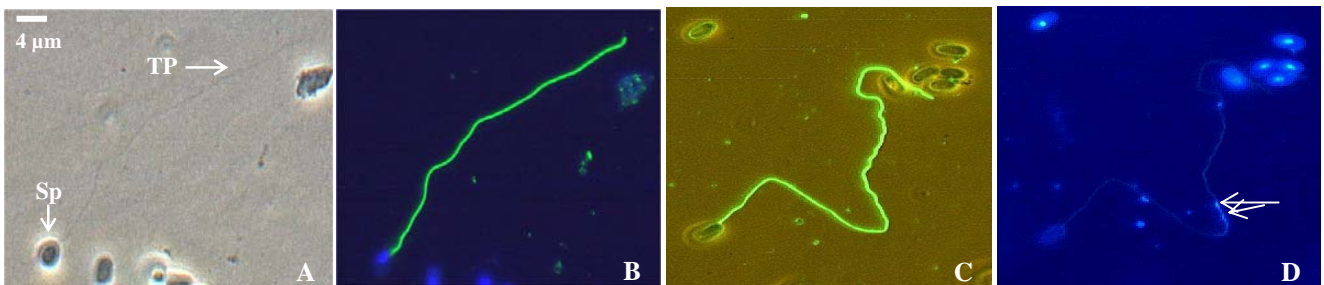


Figure 37. Les protéines codées par les ORFs A et B sont localisées au niveau du tube polaire. Immunofluorescence sur des frottis de spores d'*A. locustae* incubés avec les anticorps dirigés contre les protéines recombinantes des ORF-A (B) et ORF-B (C) dilués au 1/100. Un marquage des tubes polaires dévaginés est observé. A : contraste de phase. B : superposition DAPI et IFA. Les deux noyaux du diplocaryon sont visualisés à l'intérieur du tube polaire (D). Les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés Alexa Fluor 488 sont dilués au 1/1000.

(12,3%) ainsi que huit résidus cystéine, caractéristiques des protéines PTP2 du genre *Encephalitozoon* (**Fig. 35B** et **Tableau 12B**). En dépit de la très grande divergence observée au niveau de leurs séquences, nous avons émis l'hypothèse que les produits de ces deux gènes sont, de par leur position et leurs caractéristiques (composition en aa, pI, nombre de résidus cystéine), des orthologues des gènes *ptp1* et *ptp2*.

I.1.2. Les produits des ORF-A et ORF-B sont localisés au niveau du tube polaire d'*A. locustae*

Afin de mieux caractériser les produits des ORFs A et B d'*A. locustae*, des protéines recombinantes ont été produites chez *E. coli*. Pour l'ORF-A, nous avons choisi d'exprimer 3 régions différentes : une correspondant à la protéine entière (sans le peptide signal, aa 21 à 355) et deux autres couvrant les régions N-terminale (aa 21 à 222) et C-terminale (aa 207 à 355). Dans le cas de l'ORF-B, le choix s'est porté sur la protéine totale sans son peptide signal (aa 20 à 287). Les séquences codant ces différentes parties ont été amplifiées et clonées dans un vecteur pGEX-4T1-His. Après transformation de bactéries *E. coli* BL21⁺ avec ces différentes constructions, l'expression des protéines recombinantes est induite par ajout d'IPTG et analysée en SDS-PAGE. Pour l'ORF-A, dans le cas de la protéine de fusion N-terminale une protéine surnuméraire de 50 kDa est obtenue (**Fig. 36, pistes 2 et 3**) alors que l'expression de la partie C-terminale est au contraire très faible (non montré). L'expression de la protéine totale (sans le peptide signal) n'a donné aucun résultat. Pour l'ORF-B, une protéine de 55 kDa est observée (**Fig. 36, pistes 4 et 5**). Afin d'obtenir des anticorps polyclonaux spécifiques, chaque protéine recombinante a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA et injectée à des souris.

Des frottis de spores d'*A. locustae* ont été incubés avec les anticorps obtenus contre les protéines recombinantes correspondant aux ORFs A et B. Un marquage spécifique des tubes

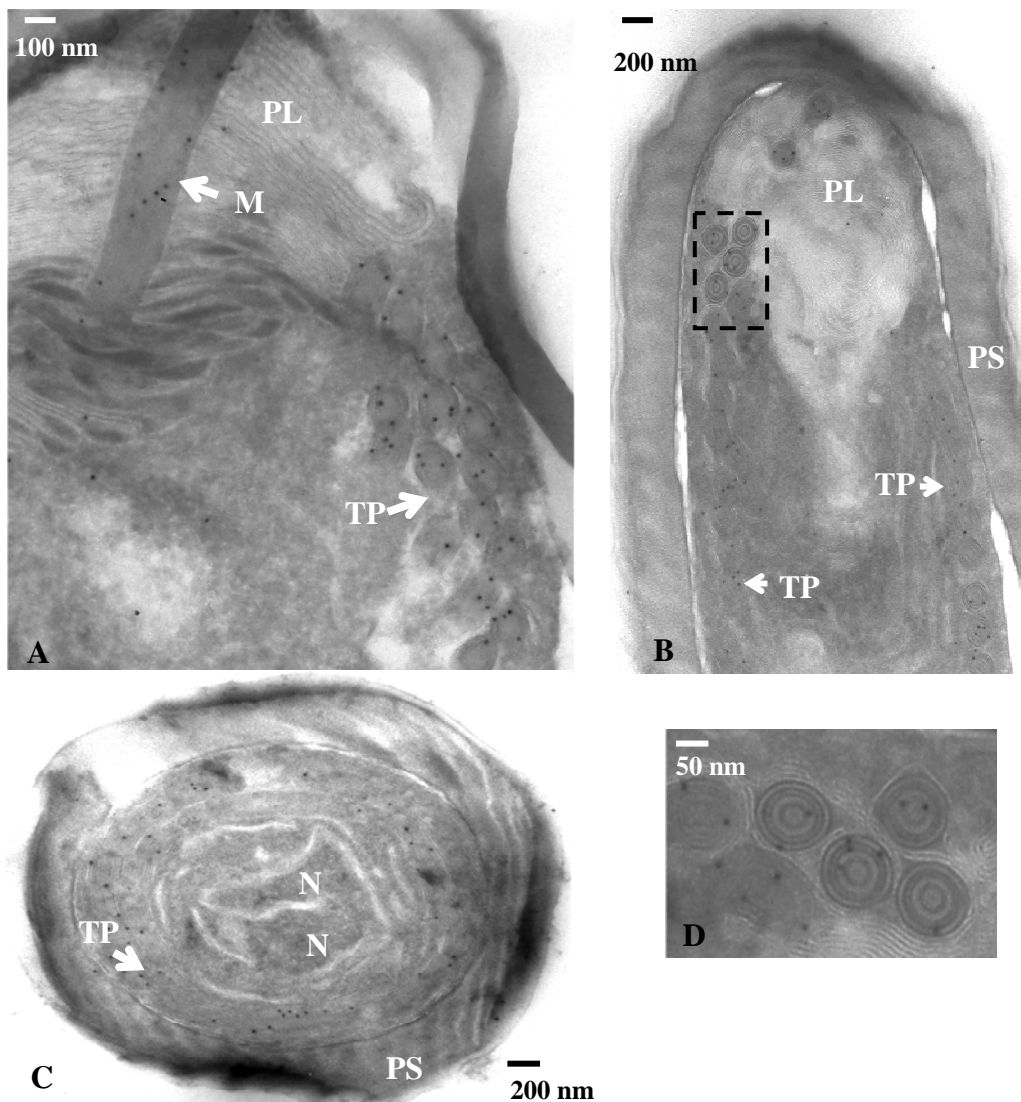


Figure 38. Immunomarquage du tube polaire d'*A. locustae* en microscopie électronique à transmission avec les anticorps dirigés contre l'ORF-A (dilution 1/50). (A-D) Les billes d'or sont localisées au niveau du manubrium (M) et au niveau des sections transversales et longitudinales du tube polaire enroulé autour du sporoplasme. **D** correspond à un agrandissement d'une région de B montrant plusieurs couches concentriques au niveau de sections transversales du tube polaire. Les anticorps secondaire anti-IgG de souris couplés à des billes d'or (10 nm) sont dilués au 1/100. TP : tube polaire ; PL : polaroplaste lamellaire; N : noyau ; PS : paroi sporale.

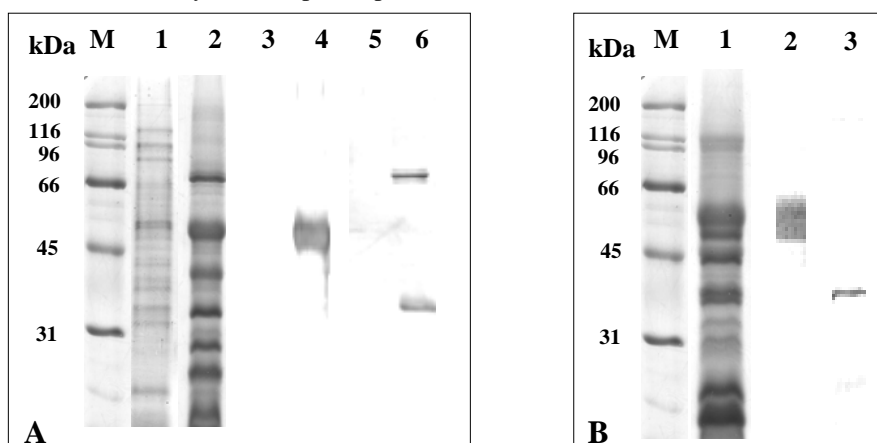


Figure 39. AIPTP1 et AIPTP2 sont solubles en présence d'agents réducteurs. (A) Détection de PTP1 et PTP2 à partir d'extraits différentiels de protéines sporales d'*A. locustae*. Les immunomarquages réalisés à l'aide des anticorps anti-AIPTP1 (3, 4) et anti-AIPTP2 (5, 6) sont montrés en parallèle avec les extraits protéiques séparés en SDS-PAGE (10%) et colorés au bleu de Coomassie (pistes 1, 2). Pistes 1, 3, 5 : protéines solubles en présence de SDS 2,5%. Pistes 2, 4, 6 : fraction insoluble en SDS traitée avec du DTT 100 mM. (B) Les anticorps anti-AIPTP1 et anti-AIPTP2 réagissent avec des protéines sporales de *P. grylli*. Piste 1 : Extrait de protéines sporales de *P. grylli* solubilisées en présence de SDS 2,5% et DTT 100 mM coloré au bleu de Coomassie. Pistes 2 and 3: Immunomarquages avec les anticorps anti-AIPTP1 et anti-AIPTP2. M: marqueur de masse moléculaire en kDa (Biorad). Les anticorps anti-AIPTP1 sont dilués au 1/1000, les anticorps anti-AIPTP2 au 1/500. Les anticorps secondaires (anti-IgG de souris) couplés à la phosphatase alcaline sont dilués au 1/10000.

polaires dévaginés est observé dans les 2 cas (**Fig. 37B et C**). La faible perméabilisation de la paroi sporale ne permet pas de visualiser les tubes polaires enroulés à l'intérieur des spores d'*A. locustae*. Des expériences d'immunolocalisation en microscopie électronique sur des cryocoupes de spores d'*A. locustae* ont également été réalisées. Les anticorps obtenus contre chaque protéine recombinante donnent un marquage des sections longitudinales et transversales des tubes polaires enroulés à l'intérieur des spores (**Fig. 38A-D**) ainsi que du manubrium (**Fig. 38D**). Cependant, le marquage ne semble pas être spécifique d'une couche concentrique particulière. L'ensemble de ces résultats nous a permis de déduire que les ORFs A et B codaient respectivement pour des protéines de type PTP1 et PTP2. Ces deux protéines ont donc été appelées AlPTP1 et AlPTP2.

I.1.3. AlPTP1 et AlPTP2 ne sont solubles qu'en présence de fortes concentrations d'agents réducteurs

Les études antérieures réalisées sur les protéines du tube polaire ont montré que ces protéines sont solubles en présence de fortes concentrations d'agents réducteurs (100 mM DTT ou 50% 2-mercaptoéthanol). Des extraits de protéines sporales d'*A. locustae* ont donc été préparés en présence ou en absence de DTT. En Western blot, le sérum obtenu contre la protéine recombinante AlPTP1 (partie N-terminale) reconnaît une protéine d'environ 50 kDa uniquement dans la fraction des protéines solubles en DTT (**Fig. 39A, piste 4**) ce qui est supérieur à la taille attendue (34 kDa). Le sérum dirigé contre la protéine recombinante AlPTP2 reconnaît deux bandes protéiques également solubles en présence de DTT : une protéine de 35 kDa proche de la taille attendue (29 kDa) et une protéine de 70 kDa.

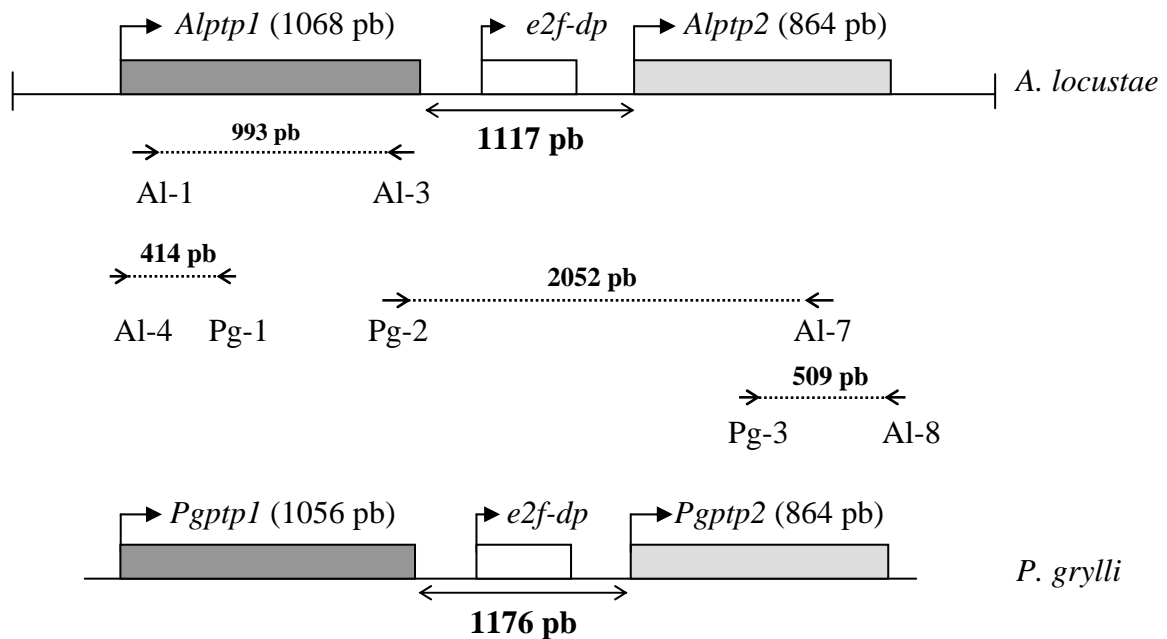


Figure 40. Représentation schématique du cluster *ptp1-ptp2* chez *A. locustae* et *P. grylli*. Les positions des amorces PCR utilisées pour l'amplification des gènes *ptp1* et *ptp2* chez *P. grylli* sont indiquées. Les amorces Al ont été déterminées à partir de la séquence d'*A. locustae*, les amorces Pg à partir des séquences de *P. grylli*. Un premier fragment de 1 kb de *Pg-ptp1* a été amplifié à l'aide des amorces Al-1 et Al-3 déterminées à partir de la séquence de *Alptp1*. L'extrémité 5' de *Pgptp1* a ensuite été complétée. L'identification de *Pgptp2* a été réalisée grâce à l'utilisation du couple Pg-2/Al-7 où Pg-2 est spécifique de l'extrémité 3' de *Pgptp1*. L'extrémité 3' *Pgptp2* a ensuite été complétée à l'aide des amorces Pg-3 et Al-8. L'espace entre les deux gènes *ptp1* et *ptp2*, long de 1176 pb chez *P. grylli*, contient un homologue du facteur de dimérisation, E2F du complexe E2F-DP comme c'est le cas chez *A. locustae*.

I.1.4. Conservation de la synténie des gènes *ptp1* et *ptp2* chez *Paranosema grylli*

Nous avons appliqué les sérums dirigés contre les protéines recombinantes AIPTP1 et AIPTP2 à des frottis de spores et des profils électrophorétiques de protéines sporales de *Paranosema grylli*, une autre microsporidie parasite d'insectes phylogénétiquement proche d'*A. locustae*. En IFA, un marquage des tubes polaires dévaginés est observé (non montré). En Western blot, les anticorps dirigés contre les protéines AIPTP1 et AIPTP2 reconnaissent respectivement des protéines d'environ 50 kDa et 35 kDa (**Fig. 39B, pistes 2 et 3**). Contrairement à *A. locustae*, aucune protéine de 70 kDa n'est identifiée. Ces résultats suggèrent que les protéines PTP1 et PTP2 sont relativement conservées entre *A. locustae* et *P. grylli*.

Une stratégie PCR a donc été mise en place pour pouvoir amplifier les gènes *ptp1* et *ptp2* chez *P. grylli* en utilisant des amorces déduites des séquences *Alptp1* et *Alptp2* (**Fig. 40**). Le couple d'amorces Al-1 / Al-3 a permis dans un premier temps d'amplifier la majeure partie du gène *Pgptp1*. L'extrémité 5' manquante a été caractérisée à l'aide de l'amorce Al-4 désignée 40 nucléotides en amont de l'ATG, montrant ainsi que les régions flanquantes sont aussi probablement très conservées entre les 2 espèces. *Pgptp1* a un cadre de lecture ouvert de 1056 pb et code pour une protéine de 351 aa. L'hypothèse étant que les gènes *ptp1* et *ptp2* sont également localisés dans un environnement proche sur un même chromosome chez *P. grylli*, la combinaison des deux amorces suivantes a été testée : Pg-2 déterminée dans la séquence spécifique de *Pgptp1* et Al-7 déterminée dans la région 3' codante de *Alptp2* (**Fig. 40**). Ce couple d'amorce nous a permis d'amplifier un fragment de 2 kb qui contient notamment une partie d'une séquence codante orthologue de *Alptp2* que nous avons appelée *Pgptp2*. L'extrémité 3' de *Pgptp2* a été amplifiée en utilisant une amorce déterminée dans la région flanquante non codante de *Alptp2* (Al-8). La séquence ainsi obtenue de 864 pb code

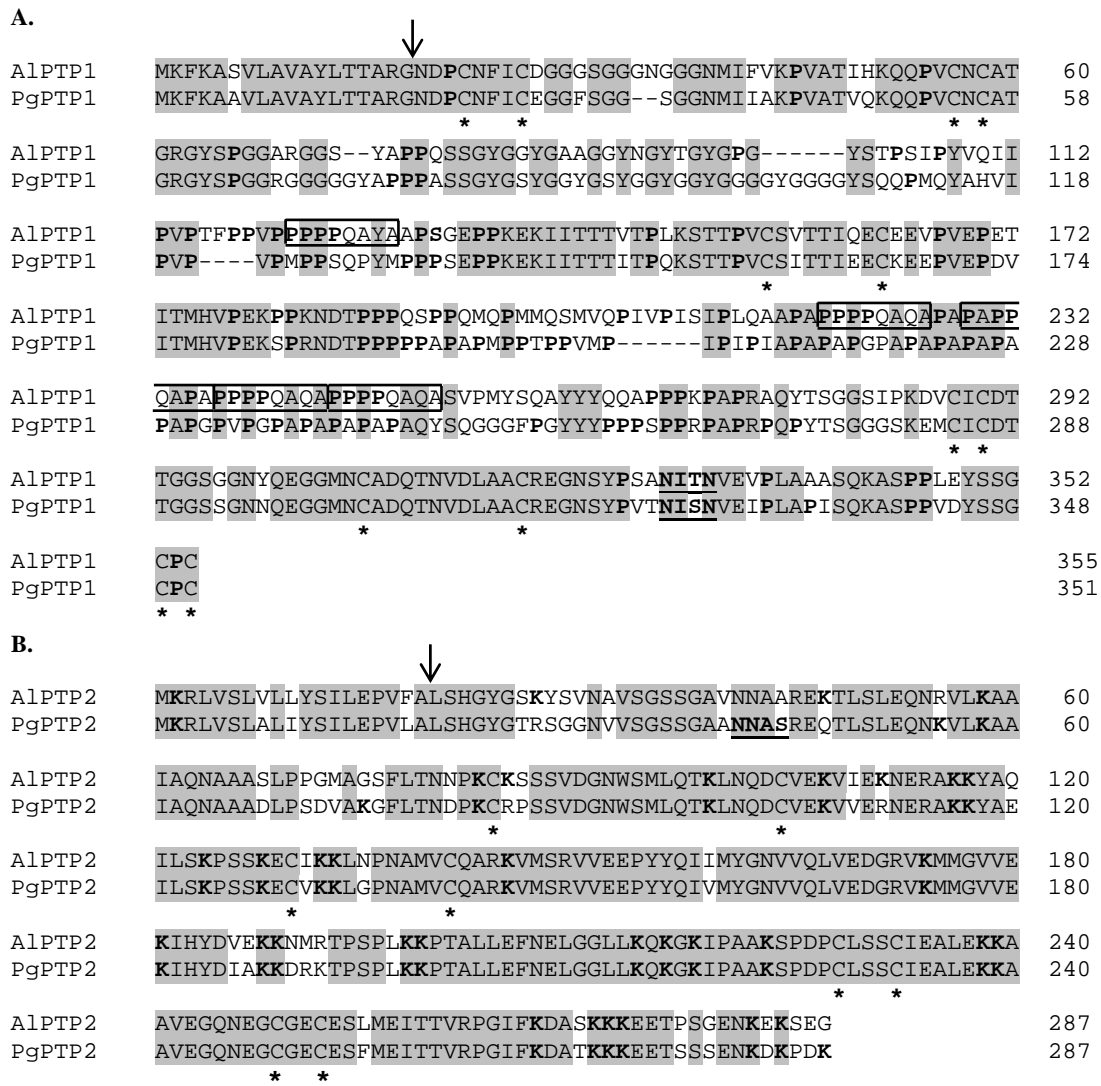


Figure 41. Alignement des séquences en acides aminés des protéines PTP1 (A) et PTP2 (B) d'*A. locustae* et *P. grylli*. (A) Les protéines de type PTP1 présentent des parties N et C-terminales très similaires et des répétitions internes riches en proline divergentes. Les cystéines en positions conservées sont indiquées par des astérisques. Les résidus proline sont indiqués en gras. Chez AlPTP1, les répétitions internes riches en proline sont encadrées. (B) Pour PTP2, les 8 résidus cystéine conservés sont indiqués par des astérisques et les résidus lysine, aa majeur sont en gras. Les flèches indiquent les sites de clivage des peptides signaux. Les sites potentiels de N-glycosylation prédits sont soulignés. Les aa identiques sont surlignés en gris, le nombre d'aa est indiqué à droite. Al : *A. locustae*; Pg : *P. grylli*.

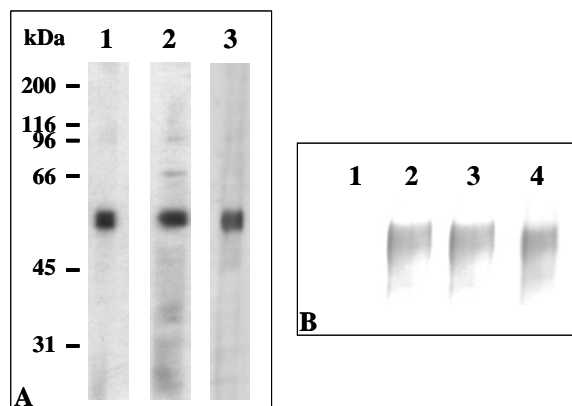


Figure 42. AlPTP1 est une protéine mannosylée. (A) Western blots de protéines sporales d'*A. locustae* solubilisées en présence de SDS 2,5% et DTT 100 mM incubés en présence des lectines Con A (piste 1) et GNA (piste 2) ou avec les anticorps anti-AlPTP1 (piste 3, dilution 1/1000). Une bande protéique de 50 kDa est reconnue dans les trois cas. (B) Les échantillons récoltés après purification sur colonne d'affinité ConA sont séparés sur SDS-PAGE 10% et PTP1 est détectée par immunomarquage avec l'anti-AlPTP1 (dilution 1/1000). Les protéines liées à ConA sont éluées avec des concentrations croissantes d'inhibiteur spécifique de la ConA, l' α -D-méthylmannopyranoside. 1 : protéines non liées à la ConA et éliminées par lavage. 2, 3 et 4 correspondent aux éluats obtenus respectivement avec 0,1 M, 0,2 M et 0,5 M d' α -D-méthylmannopyranoside. Les lectines ConA et GNA couplées à la biotine sont utilisées au 1/1000. Les anticorps anti-biotine sont utilisés au 1/1000. Les anticorps secondaires anti-IgG de chèvre couplés à la peroxydase sont dilués au 1/10000, les anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline sont dilués au 1/10000.

pour une protéine de 287 aa. La région située entre les gènes *Pgptp1* et *Pgptp2*, d'une longueur de 1176 nt, contient la séquence codant pour le facteur de dimérisation du complexe de transcription E2F/DP qui présente 92% d'identité avec celui identifié chez *A. locustae*.

I.1.5. Analyse comparative des protéines PTP1 et PTP2 d'*A. locustae* et de *P. grylli*

I.1.5.1. PTP1s : des protéines O-mannosylées riches en proline

Les protéines AlPTP1 (355 aa) et PgPTP1 (351 aa) présentent 67% d'identité. Elles sont principalement caractérisées par des extrémités N- et C-terminales conservées et une partie interne très divergente (**Fig. 41A**). Un peptide signal dont le site de clivage est prédit entre G18 et N19 est également retrouvé dans chacune de ces protéines. Après clivage de ce peptide signal, les protéines AlPTP1 et PgPTP1 ont des masses moléculaires prédites respectivement de 34 462 Da et 33 392 Da et un pI acide (**Tableau 12A**). L'aa majoritaire est la proline (19,8% chez *A. locustae* et 21,6% chez *P. grylli*). Douze cystéines sont présentes en positions conservées essentiellement dans les régions N- et C-terminales, une étant retrouvée comme chez le genre *Encephalitozoon* en position C-terminale de chaque protéine. La présence d'un nombre relativement important de résidus cystéine est en accord avec le fait que ces protéines ne sont solubles qu'en présence d'agents réducteurs.

Comme cela a été montré au sein du genre *Encephalitozoon*, la région interne des protéines de type PTP1 est constituée de motifs répétés très divergents d'une espèce à l'autre. AlPTP1 présente en effet dans sa région centrale cinq répétitions (consensus PPPPQAQA) dont quatre sont arrangées en tandem entre les résidus 219 et 252 (**Fig. 41A**). PgPTP1 contient des répétitions de plus petite taille constituées majoritairement de résidus proline et alanine (**Fig. 41A**).

Protéine	Longueur (nombre d'aa)		pI	aa majoritaires (%)		Nombre de résidus cystéine	Résidu C- terminal	Nombre de sites potentiels de glycosylation	
	Précurseur	Protéine mature		Pro	Gly			O-Glyc	N-Glyc
A.									
EcPTP1	395	373	4,7	13,4	11,8	17	C	37	3
EiPTP1	371	349	4,5	13,7	8,3	17	C	56	3
EhPTP1	453	431	4,4	14,6	12,9	21	C	32	0
AIPTP1	355	337	5,2	19,8	10,6	12	C	19	1
PgPTP1	351	333	5,2	21,6	14,7	12	C	19	1
Protéine	Longueur (nombre d'aa)		pI	aa majoritaires (%)		Nombre de résidus cystéine	Résidu C- terminal	Nombre de sites potentiels de glycosylation	
	Précurseur	Protéine mature		Lys	Glu			O-Glyc	N-Glyc
B.									
EcPTP2	277	264	8,6	12,1	9,5	8	E	3	1
EiPTP2	275	262	8,6	11,8	6,2	8	E	4	1
EhPTP2	272	259	8,6	10,8	9,5	8	E	5	2
AIPTP2	287	268	9,1	12,3	9,3	8	G	1	0
PgPTP2	287	268	8,9	12,3	8,6	8	K	2	1

Tableau 12. Caractéristiques majeures des protéines PTP1 (A) et PTP2 (B) d'*E. cuniculi* (Ec), *E. hellem* (Eh), *E. intestinalis* (Ei), *A. locustae* (Al) et *P. grylli* (Pg). L'aa le plus abondant est la proline pour PTP1 et la lysine pour PTP2. La protéine mature correspond à la protéine après clivage du peptide signal N-terminal. Le pI, le pourcentage en acides aminés, le nombre de sites de O- et N-glycosylation sont déduits des séquences des protéines matures. Les numéros d'accèsion des protéines EcPTP1, EiPTP1, EhPTP1 et EcPTP2 sont respectivement : NP_585781, CAI54279, AAC32812 et NP_585780.

Alors qu'un seul site potentiel de N-glycosylation est observé dans les séquences AIPTP1 et PgPTP1, 19 sites de O-glycosylation sont prédits pour chacune d'elles, suggérant que ces protéines pourraient être glycosylées. L'application des lectines ConA et GNA, spécifiques des liaisons entre résidus mannoses, à des Western blot de protéines totales d'*A. locustae* montre une réaction très forte avec une bande protéique d'environ 50 kDa, pouvant correspondre à la bande reconnue par les anticorps dirigés contre la protéine AIPTP1 (**Fig. 42A**). De plus, un marquage des tubes polaires dévaginés est obtenu en incubant des spores d'*A. locustae* avec la lectine ConA-FITC (non montré). Une purification sur colonne d'affinité ConA a donc été réalisée à partir d'un extrait de protéines sporales d'*A. locustae* en éluant les protéines à l'aide d'un gradient croissant de l'inhibiteur spécifique de ConA, l' α -D-méthylmannopyranoside. Les anticorps anti-AIPTP1 appliqués aux différents éluats révèlent la présence de la protéine PTP1 (**Fig. 42B**). La liaison de AIPTP1 à la lectine ConA pouvant être rompue par addition d'une forte concentration d' α -D-méthylmannopyranoside, on peut conclure que AIPTP1 est probablement mannosylée. La présence d'une mannosylation ainsi que la richesse en proline pourraient expliquer le défaut de migration observé sur les gels de polyacrylamide pour AIPTP1.

1.1.5.2. PTP2s : des protéines riches en lysine

AIPTP2 et PgPTP2 sont des protéines basiques dont les séquences sont nettement plus conservées que celles des protéines PTP1 : de taille identique (287 aa), elles présentent 85,4% d'identité (**Fig. 41B, Tableau 12B**). Après clivage du peptide signal, les protéines matures présentent des tailles similaires de 29 170 Da pour AIPTP2 et 29 211 Da pour PgPTP2 ainsi que des pIs très proches (respectivement 9,1 et 8,9). L'aa majoritaire est la lysine (12,3%). Les huit résidus cystéine retrouvés dans ces deux protéines sont en positions conservées. Très peu de sites potentiels de O-glycosylation sont présents (1 pour AIPTP2 et 2 pour PgPTP2).

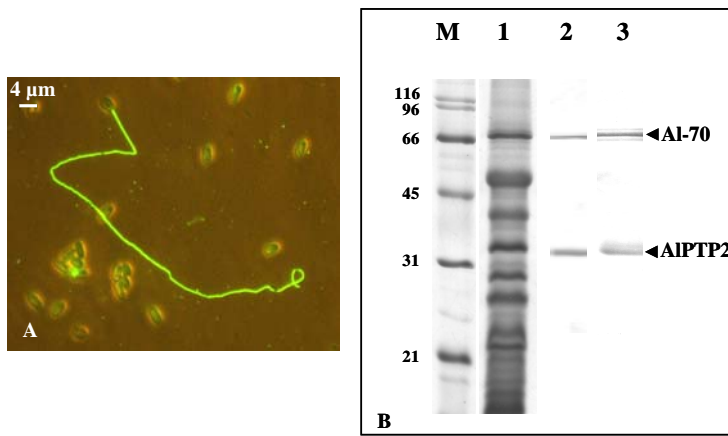


Figure 43. Les anticorps dirigés contre la bande protéique de 70 kDa donnent un marquage du tube polaire en IFA (A) et réagissent également avec AIPTP2 (B). Protéines sporales d'*A. locustae* solubilisées en SDS 2,5% et DTT 100 mM et colorées au bleu de Coomassie (piste 1) ou incubées avec les anticorps anti-Al-70 (piste 2) et anti-AIPTP2 (piste 3) dilués au 1/500. En IFA, les anticorps primaires sont dilués au 1/100. Les anticorps anti-IgG de souris couplés Alexa Fluor 488 sont dilués au 1/1000. Les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline sont utilisés au 1/10000. M : marqueur de poids moléculaire en kDa (Biorad).

	↓		
1712	MKGIIWYMLLISILQPVLSSSSWSSSSRSSSYGGGGGGYSGGGGYSGGGGYTGGGYTGGG	60	
1048 (AIPTP2)	MKRLVSLVLLYSILEPVALSHGYGSKYSVN-----	31	
1329	MKGIIWYMLLISILQPVLSSSSWSSSSRSSSYGGGGGGYSGGGGYSGGGGYSG-----GGG	56	
1712	YTSGGYTSGGYTGGGYSGGSAKIMMGGHGTMSGTSSAGTGTGAGT-----	106	
1048 (AIPTP2)	-----	31	
1329	YTSGGYTSGGYTGGGYSGGSAKIMMGGHGTMSGTSSAGTGTGAGTGSSAGTGTGAGTGS	116	
1712	-----GSGAGTSGSGTGS	120	
1048 (AIPTP2)	-----	31	
1329	GAGTSGSGTGSAGTSGSGMGSGAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGS	176	
1712	GAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGS	180	
1048 (AIPTP2)	-----	31	
1329	GAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGS	236	
1712	GAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSVETGSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGS	240	
1048 (AIPTP2)	-----	31	
1329	GAGTSGSGTGSVETGSGSGTGSVETGSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGSAGTSGSGTGS	296	
1712	GGGETSSSSNAVVSSTGVSHSTVSSPAHGGISSGVSIIVPLPVMAQVAATTAKPETS	300	
1048 (AIPTP2)	-----	31	
1329	GGGETSSSSNAVVSSTGVSHSTVSSPAHGGISSGVSIIVPLPVMAQVAATTAKPETS	356	
1712	QQHTSAGTSAASRNATREQILSLEQNKVLKAAIAQNAASLPPDMAGSFLTNNPKCKSSS	360	
1048 (AIPTP2)	---AVSGSSGAVNNAAREKTLNLSLEQNKVLKAAIAQNAASLPPDMAGSFLTNNPKCKSSS	88	
1329	QQHTSAGTSAASRNATREQILSLEQNKVLKAAIAQNAASLPPDMAGIFLTNNPKCKSSS	416	
1712	VDGNWSMLQTKLNQDCVEKVIKNERAKKYAQILSKPPSKECIKKLNPAMVCQARKVMS	420	
1048 (AIPTP2)	VDGNWSMLQTKLNQDCVEKVIKNERAKKYAQILSKPPSKECIKKLNPAMVCQARKVMS	148	
1329	VDGNWSMLQTKLNQDCVEKVIKNERAKKYAQILSKPPSKECIKKLNPAMVCQARKVMS	476	
1712	RVVEEPPYYQIIMYGNVVQLVEDGRVKMMGVVEKIHVDVEKKNMRTPSPLKKPTALLEFNE	480	
1048 (AIPTP2)	RVVEEPPYYQIIMYGNVVQLVEDGRVKMMGVVEKIHVDVEKKNMRTPSPLKKPTALLEFNE	208	
1329	RVVEEPPYYQIIMYGNVVQLVEDGRVKMMGVVEKIHVDVEKKNMRTPSPLKKPTALLEFNE	536	
1712	LGGLLKQKGIIPAAKSPDPCLSCTEALAKKAAVEGQNEGCGECESLMEITTVRPGIFKD	540	
1048 (AIPTP2)	LGGLLKQKGIIPAAKSPDPCLSCTEALAKKAAVEGQNEGCGECESLMEITTVRPGIFKD	268	
1329	LGGLLKQKGIIPAAKSPDPCLSCTEALAKKAAVEGQNEGCGECESLMEITTVRPGIFKD	596	
1712	ASKKKGKDSYSENKKSSEDQDNEKEEES	568	
1048 (AIPTP2)	ASKKKEETPSGENKEKSEG-----	287	
1329	GHR-----	599	

Figure 44. Alignement entre AIPTP2 (CDS 1048) et les produits des CDS 1712 et 1329. Le nombre d'aa est indiqué à droite. Les résidus identiques sont surlignés en gris. 1712 et 1329 présentent 84,4% d'identité entre elles et respectivement 44,5% et 38,5% d'identité avec AIPTP2. La différence majeure avec AIPTP2 vient de la présence d'une extension riche en glycine et sérine du côté N-terminal. 1712 et 1329 se différencient par la présence, en N-terminal, d'une insertion/délétion de 60 aa riche en sérine et glycine. La flèche indique le site de clivage du peptide signal de 19 aa chez ces trois protéines. Le peptide spécifique de 1712 (AAIAQNAASLPPDMAGSFLTNNPK, positions 331 à 355) identifié par spectrométrie de masse est souligné : il présente une masse différente (2470,2539 Da) qui permet de différencier 1712 des protéines 1329 et AIPTP2. Les séquences des CDS sont obtenues à partir de la nouvelle base de données d'*A. locustae* (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01?page=orfs>).

Un seul site de N-glycosylation est prédit pour PgPTP2 alors que AIPTP2 n'en possède aucun. De plus, l'application des anticorps anti-AIPTP2 aux protéines éluées de la colonne d'affinité ConA ne donne aucun marquage (non montré), suggérant que cette protéine n'est pas glycosylée.

I.1.6. Plusieurs gènes *ptp2* existent chez *A. locustae*

Comme nous l'avons montré précédemment, les anticorps dirigés contre la protéine recombinante AIPTP2 reconnaissent une protéine de 35 kDa correspondant à AIPTP2 et une protéine de 70 kDa (**Fig. 39A, piste 6**). Afin de préciser la nature de la protéine de 70 kDa (AI-70), des anticorps ont été produits contre cette bande protéique purifiée par séparation électrophorétique. En IFA, le sérum obtenu marque spécifiquement le tube polaire dévaginé des spores d'*A. locustae* (**Fig. 43A**). De la même manière que les anticorps anti-AIPTP2, les anticorps dirigés contre AI-70 réagissent avec les deux bandes de 35 et 70 kDa suggérant que ces deux antigènes possèdent des épitopes conservés (**Fig. 43B, pistes 2 et 3**). Au début de notre travail aucune séquence homologue à AIPTP2 n'était disponible parmi les contigs d'*A. locustae*. L'annotation du génome d'*A. locustae* étant en cours, une nouvelle base de données contenant 2600 CDS a récemment été mise en ligne. L'interrogation de cette nouvelle base de données avec la séquence AIPTP2 a révélé la présence de 4 CDS (822, 1048, 1329 et 1712) codant des protéines de la même famille. Le CDS noté 1048 correspond au gène codant la protéine AIPTP2. Le CDS 822 correspond à une séquence partielle (nt 282 à 864) de *Alptp2* (100% d'identité entre 1048 et 822). Les 2 autres, 1712 et 1329, codent respectivement pour des protéines de 568 et 599 aa présentant 84,4% d'identité entre elles. Ces protéines se différencient de AIPTP2 par la présence d'une extension N-terminale riche en sérine et glycine (positions 32 à 303 pour 1712 et positions 32 à 359 pour 1329, **Fig. 44**). Ces deux protéines possèdent un site potentiel de clivage d'un peptide signal entre les positions S19 et

Protéine	Taille (nombre d'aa)		pI	aa majoritaires (%)				Nb de résidus cystéine	Nb de sites potentiels de glycosylation	
	Précurseur	Protéine mature		K	G	S	E		O-Glyc	N-Glyc
AIPTP2	287	268	9,1	<u>12,3</u>	7,1	9,3	9,3	8	1	0
1712	568	549	8,4	6,7	<u>22</u>	16,4	5,5	8	43	0
1329	599	580	8,7	5	<u>25,3</u>	16,9	4,3	9	42	0

Tableau 13. Caractéristiques des protéines de type PTP2 identifiées chez *A. locustae*. Les protéines matures correspondent aux protéines après clivage du peptide signal. Le pI, les pourcentages en aa, le nombre de résidus cystéine ainsi que le nombre de sites potentiels de O- et N- glycosylation sont calculés à partir des protéines matures. La majorité des sites potentiels de O-glycosylation sont situés dans la partie N-terminale riche en sérine et glycine et absente chez AIPTP2. Nb : nombre. aa : acide aminés. Al : *A. locustae*. Le CDS 822 correspondant à la séquence partielle de AIPTP2 n'est pas présenté dans ce tableau.

	CDS		
	1712	1329	1048 (AIPTP2)
Nb de peptide identifiés	7/37	5/37	6/37
Taux de couverture	18%	13%	16%
Masses des peptides (Da)			
1201,6530	+	+	-
1287,6379	+	+	+
1743,0106	+	+	+
2470,2539	+	-	-
2713,3154	+	+	+
2730,3311	-	-	+
3110,4084	+	-	+
3228,4915	+	+	+

Tableau 14. Tableau récapitulatif de l'analyse par spectrométrie de masse de la bande de 70 kDa. Les peptides identifiés sont comparés à ceux obtenus *in silico* pour chaque protéine. Les masses des peptides caractérisés sont indiquées en dalton (Da). Le peptide d'une masse de 2470,2539 est spécifique de 1712. Le CDS 822 correspondant à la séquence partielle de AIPTP2 n'est pas présenté dans ce tableau.

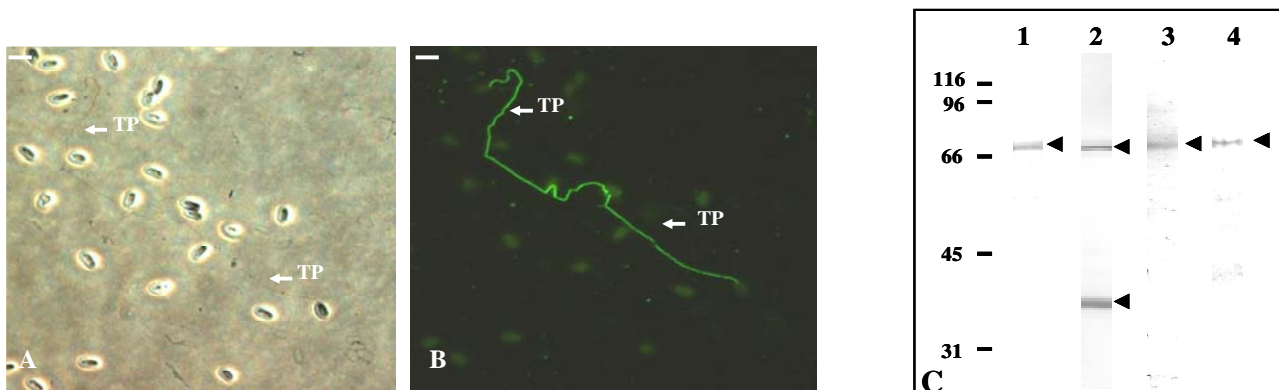


Figure 45. Les tubes polaires dévaginés d'*A. locustae* sont spécifiquement marqués par les anticorps dirigés contre la protéine 1712 recombinante (B) et la protéine de 70 kDa correspond à la protéine 1712. (A) Contraste de phase. (B) Marquage en IFA avec les anticorps anti-1712. TP : tube polaire. Les anticorps primaires sont dilués au 1/100, les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés Alexa fluor 488 sont dilués au 1/1000. Echelle : 4 µm. (C) Les anticorps anti-1712 réagissent uniquement avec la protéine de 70 kDa chez *A. locustae* (piste 1). Une réaction croisée est observée avec des protéines sporales de 70 kDa chez *P. grylli* (piste 3) et *Nosema bombycis* (piste 4). Les protéines ont été extraites en présence de SDS 2,5% et de DTT 100 mM puis analysées en SDS-PAGE (10%). Les anticorps primaires sont dilués au 1/500, les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline sont utilisés au 1/10000.

Y20. Les protéines matures ont des masses moléculaires attendues de 53 166 Da et 54 430 Da et présentent comme AIPTP2 un pI basique (8,4 et 8,7). L'aa le plus abondant n'est pas la lysine mais la glycine (22% et 25,3%, **Tableau 13**). Comme le montre la **figure 44**, la différence de taille entre 1712 et 1329 est due à une insertion/délétion de 60 aa riche en sérine et glycine. La partie C-terminale des protéines codées par les CDSs 1712 (aa 364 à 568) et 1329 (aa 421 à 599) présente environ 88% d'identité avec la protéine AIPTP2.

Afin de montrer que la protéine de 70 kDa correspond au produit de l'un de ces 2 CDSs, cette protéine a été extraite d'un gel de polyacrylamide après SDS-PAGE et soumise à une analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les masses des peptides générés par digestion trypsique ont été comparées à celles obtenues par digestion *in silico* des 2600 CDS de la base de données d'*A. locustae*. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le **tableau 14**, les meilleurs scores étant obtenus pour les CDS 1712, 1329 et 1048 (AIPTP2). En effet, parmi les 37 peptides générés au cours de l'analyse, 7 correspondent à 1712, 6 à 1048 et 5 à 1329. Le peptide ayant une masse de 2470,2539 Da (AAIAQNAAASLPPDMAGSFLTNNPK) est spécifique de la protéine 1712 (**Fig. 44 et Tableau 14**). Ceci s'explique par le fait que deux aa sont variables par rapport à 1329 (AAIAQNAAASLPPDMAGIFLTNNP, 2496,8638 Da) et AIPTP2 (AAIAQNAAASLPPGMAGSFLTNNPK, 2412,7458 Da, **Fig. 44**). De plus, un autre peptide (3110,4084 Da) n'est pas retrouvé dans la protéine 1329 ce qui suggère que la bande protéique de 70 kDa contient le produit du CDS 1712. De façon surprenante, un peptide d'une masse de 2730, 3311 Da (KAAIAQNAAASLPPGMAGSFLTNNPKCKS), spécifique de AIPTP2 a également été identifié (**Tableau 14, Fig. 44**).

Nous avons ensuite entrepris de produire des anticorps spécifiques de la protéine 1712 afin de confirmer sa localisation au niveau du tube polaire. Pour cela, la séquence codant la partie N-terminale spécifique riche en glycine et sérine (résidus 19 à 306), région absente dans

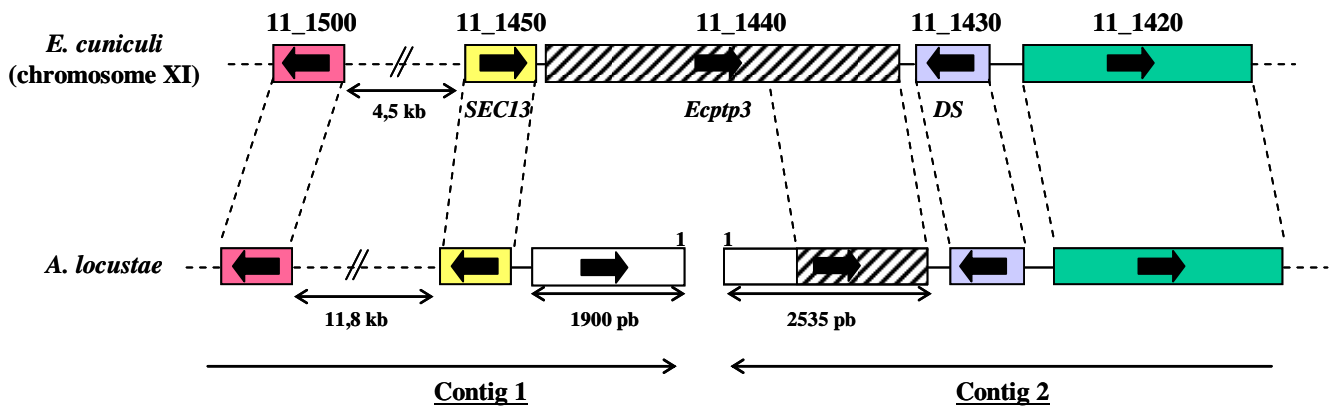


Figure 46. Comparaison d'une région du chromosome XI d'*E. cuniculi* contenant le locus *SEC13-ptp3-DS* avec une partie des contigs 1 et 2 d'*A. locustae*. Une conservation de la synténie de plusieurs gènes est observée. Les gènes homologues en positions conservées entre les contigs 1 et 2 d'*A. locustae* et le chromosome XI d'*E. cuniculi* sont représentés par des rectangles de couleur identique reliés par des pointillés. Les séquences ne présentant aucune homologie avec *E. cuniculi* sont représentées par des rectangles blancs. Les flèches indiquent le sens de transcription. Sur le contig 2, en amont du gène codant DS, un cadre de lecture ouvert occupant les positions 1-2535 présentent des homologies avec la partie C-terminale de EcPTP3 (rectangle hachuré). Les 240 premiers aa sont constitués de répétitions dégénérées ne présentant aucune homologie avec EcPTP3. Sur le contig 1, la région 1-1900 code pour une protéine partielle de 623 aa présentant de nombreux motifs répétés. ECU11_1420 code pour une protéine de type Hsp101 (NP_586448). Un orthologue est identifié sur le contig 2. ECU11_1500 code pour une sérine/thréonine kinase de type Nima (NP_586456). L'orthologue de cette protéine est retrouvé sur le contig 1.

AlPTP3------YKDAAHAEAGSRAQDPTHPPGMSAKERAQPS	
EcPTP3AKAAEQQIINNEGKSVFSKVLSTGDISAEAAKAREEAERAMAEILRHQREARKAEVMKML	600
AlPTP3	-----DTEEDLG	
EcPTP3	GPMGMNSSVKEAVEHMTAAGLNLVVGSDDLNELNKKYEEVAHQSNIEELLRETATSNLE	660
AlPTP3	IIGTIPDDAKSVEIQNGHMDLPLKTFNSNEKPKNEGELAAKKQGRMADRLRNTVTRDNVP	
EcPTP3	VKEVLPPTTSRVGLISEGKIKLPLKGFNSNEPKTEETIVQSRQRNRRNQVRNKVIGTPVE	720
AlPTP3	SPLNTVKGGDGTVFNIPESAQKLIKIDDTVYYPESAKAEMEKEGLDTSPLKHYRNLGERK	
EcPTP3	SGLNVVEMEDG-YMHISEAAKALKINKGVFYPESAKGIMEKQKLDTSLELHKFNTGERA	779
AlPTP3	NKPIGEGYYAADASGKEMDLPSPFLKSPPKVLSGDDGLDTPKADALDYGKRIEMTPWE	
EcPTP3	GLDKGVGYEADASGFTLPLPSELNVPVSTMTNEEKSLNIGHAFELEIEDGELIQTPWI	839
AlPTP3	HYNKQMHSEVN--FPSKLPVIPAAVEKALRNAEKDAEALAMTKKEVITNPSGKQYVRITP	
EcPTP3	EFVKDMRPMVNGRMAHEAEVAAASEMKSRVEEEKAKNLEGITTEVYTNPDGSKFVEVSS	899
AlPTP3	FIGVPEQVDMEDVVKSAEDGN----IMPGKSGQDRGTGYFDPEESIGEGKPRSLNIEEH	
EcPTP3	FIGVPEIMTMDQAVESLKSVMGSSVAVSEAEAKKQTPPEVPLDMAVTNSVKGSEESFVSSV	959
AlPTP3	ASPASQNTSEDAYGRKELSNKMDSDTKDTPSKTNSFNQRSSPSKESILNKTAEKTREKK	
EcPTP3	LSTIQKIGNGKALAKRNAFNKGVDEKAAIVDEYNKELINEHLSPSSTVEARVRSNIISK	1019
AlPTP3	NNLDCRDPANEAKVLAVIDENSDAFSSMTQMPPEEFMSAYSNIPEKTIR---VFLRYG	
EcPTP3	AESYARSMGISTQSFLNMSQLPDSSEIKEMISYNEAPPARKDVAETHFYNQIASILPDS	1079
AlPTP3	KERNNPEYQKEYIS----AYDDLKTIYGQKSEMMLKILSGAIVAKERCPTPIRVVSKNVV	
EcPTP3	KTANTGSVTEMIFNNISTVTHEPNTVGGEILEQMTVPNLKTLQVETKKTPTGTTQVSVS	1139
AlPTP3	KIPIRKKVLYPKAKSLHKPVKVERKKIVLLKPTVVEKNVLPVMOVNIQKGVVKEKPR	
EcPTP3	VPNDPGKIQLGKLVKFGNPTTTPSSGRPASNQAVAPANVVPVPGPMVPSGRNPLKPGAR	1199
AlPTP3	WVKEKTRPHWVQEIIPKSKROVIKTNVLDSTSMEKASRI-----	
EcPTP3	LPANNGPVSNAAPAARIPAGQPDHIMRGSFHSFNNPQAPGIGATPSPAVGYSGKIAR	1256

Figure 47. Alignement entre les séquences C-terminales de PTP3 d'*E. cuniculi* (aa 540-1256) et l'extrémité du contig 2 d'*A. locustae*. La position des aa est indiquée à droite. Les résidus identiques sont surlignés en gris foncé, ceux similaires sont surlignés en gris clair. Les aa soulignés indiquent les positions des amorces utilisées pour amplifier et cloner AlPTP3 dans le vecteur d'expression pGEX-4T1-His. La séquence de AlPTP3-Cterm a été obtenue à partir de la base de donnée d'*A. locustae* (<http://jbpc.mbl.edu/Nosema/Contigs/Contig2.html>). La séquence protéique de EcPTP3 (ECU11_1440) a été obtenue à partir du numéro d'accèsion Q8MTP3.

la protéine AIPTP2, a été amplifiée et clonée dans le vecteur d'expression pGEX-4T1-His. Cette protéine a été purifiée et injectée à une souris. En IFA, un marquage des tubes polaires dévaginés des spores d'*A. locustae* est obtenu confirmant la localisation de 1712 au niveau de cette structure (**Fig. 45A**). Ces mêmes anticorps, appliqués à des Western blot de protéines sporales d'*A. locustae*, réagissent spécifiquement avec la bande de 70 kDa (**Fig. 45C, piste 1**). Il est à souligner que la taille de la protéine est supérieure à celle calculée d'après la séquence de 53 kDa. Comme attendu, aucune réaction croisée n'est obtenue avec AIPTP2, ce sérum étant dirigé contre la partie N-terminale, spécifique des protéines 1712 et 1329. Ces résultats indiquent donc que plusieurs protéines de type PTP2 existent chez *A. locustae*. Ces anticorps anti-1712 ont été également appliqués à des frottis de spores et à des Western blot de différentes espèces microsporidiennes. Les premiers résultats montrent un marquage des tubes polaires dévaginés sur des frottis de spores de *P. grylli*, *Nosema bombycis* et *Brachiola algerae*. Une protéine ayant une taille apparente proche de 70 kDa est détectée chez ces 3 espèces microsporidiennes parasites d'insectes (**Fig. 45C, pistes 3 et 4**, résultat non montré pour *B. algerae*). Aucune réaction croisée n'est observée avec le genre *Encephalitozoon*.

I.1.7. Mise en évidence de séquences partielles de protéines de type PTP3 chez *A. locustae*

PTP3 est une protéine de grande taille (1256 aa, 150 kDa) précédemment identifiée chez *E. cuniculi* et dont le gène est localisé sur le chromosome XI (ECU11_1440). En amont, porté sur le même brin, est retrouvé un gène codant un transporteur protéique de type SEC13 (ECU11_1450, **NP_586451**). En aval, sur le brin complémentaire se trouve un gène codant un homologue de la diphtine synthase (ECU11_1430, **NP_586449, Fig. 46**). Aucun gène de type *ptp3* n'est actuellement annoté dans le génome d'*A. locustae*. Par contre des orthologues de *sec 13* et de la *diphtine synthase* sont identifiés aux extrémités respectives des contig 1 et 2.

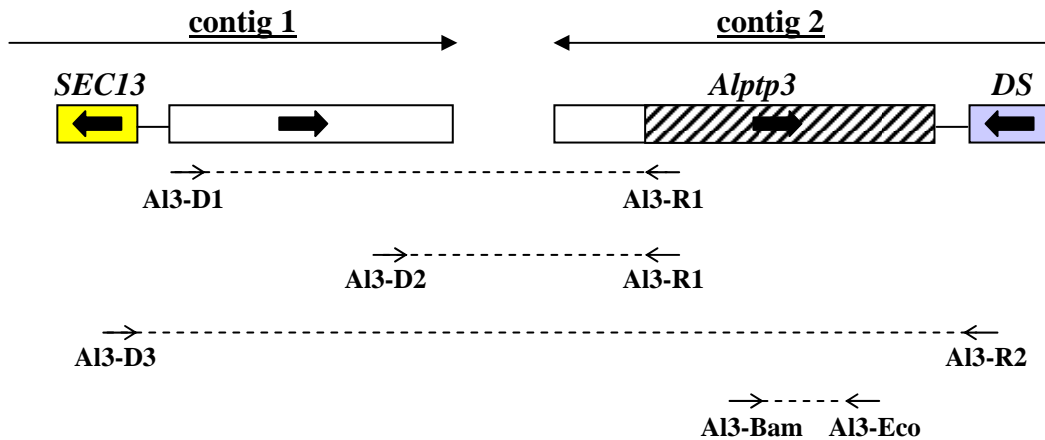


Figure 48. Représentation schématique des amorces utilisées pour l'identification du gène *ptp3* chez *A. locustae*. Les amorces A13-D1 (aa 1 à 7) et A13-D2 (425 à 431) sont localisées sur le contig 1 dans les régions répétées ne présentant aucune homologie avec EcPTP3. L'amorce A13-R1 (aa 243 à 249) est localisée sur le contig 2 au début de la région présentant une homologie avec EcPTP3. A13-D3 désignée dans l'extrémité C-terminale de SEC13 est utilisée avec A13-R2 déterminée dans l'extrémité C-terminale de DS. Les amorces A13-Bam (aa 302 à 307) et A13-Eco (aa 520 à 525), désignées dans la partie conservée avec EcPTP3, ont été utilisées pour le clonage et l'expression d'une protéine recombinante chez *E. coli*.

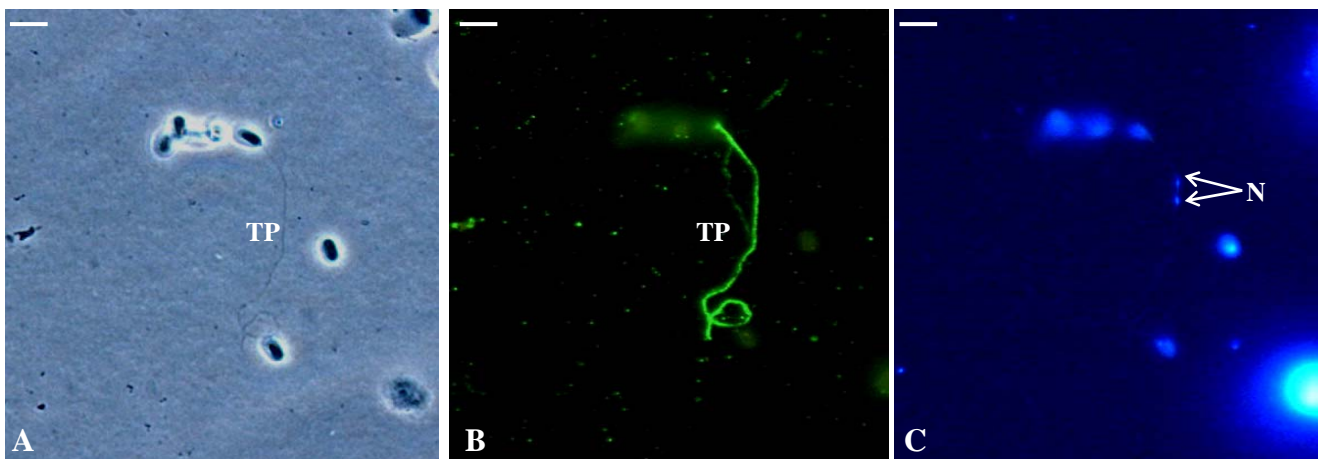


Figure 49. Les anticorps dirigés contre la partie C-terminale conservée de AIPTP3 réagissent avec les tubes polaires dévaginés. (A) contraste de phase. (B) anticorps anti-AIPTP3. (C) DAPI montrant le passage du diplocaryon à travers le tube polaire. Echelle : 4 μ m. TP : tube polaire. N : deux noyaux du diplocaryon. Les anticorps primaires sont utilisés au 1/100, les anticorps secondaire anti-IgG de souris couplés Alexa Fluor 488 au 1/1000.

Sur le contig 2, plusieurs gènes dont les orthologues sont situés sur le chromosome XI d'*E. cuniculi* sont également présents confirmant une conservation de la synténie entre ces deux génomes microsporidiens. A l'extrémité de ce contig, en amont du gène codant la diphtine synthase, porté sur le brin complémentaire, se trouve un grand cadre de lecture ouvert de 2535 pb sans codon ATG. La traduction de cet ORF (845 aa) révèle qu'il s'agit probablement de la partie C-terminale d'une protéine apparentée à PTP3, les 605 derniers aa présentant 27,3% d'identité avec EcPTP3 (résidus 567 à 1256, **Fig. 47**). Les 240 premiers résidus issus de cette séquence correspondent à des répétitions dégénérées AGGMAGG ne présentant aucune homologie avec EcPTP3 ni avec des séquences des bases de données. Nous avons ensuite analysé la séquence de 1900 nt à l'extrémité du contig 1 en aval de *sec 13*. Cette séquence semble coder la partie N-terminale d'une protéine présentant un codon ATG suivi de 623 résidus contenant de nombreuses répétitions (RGHGSG, AGAGEAA et GAAAGKMA) mais aucune homologie avec EcPTP3. A la vue de ces premiers résultats, nous avons voulu vérifier si cette séquence pouvait correspondre à la partie N-terminale de PTP3 en supposant que l'organisation des gènes autour de *ptp3* entre *E. cuniculi* et *A. locustae* soit conservée. Pour cela, plusieurs couples d'amorces ont été déterminés (**Fig. 48**) : situées sur le contig 1, A13-D1 (aa 1 à 7) et A13-D2 (résidus 425 à 431) ont été utilisées avec une amorce reverse (A13-R1) localisée au niveau du contig 2 (aa 243 à 249). Aucune amplification n'a pu être obtenue. Une amorce désignée dans l'extrémité N-terminale de SEC13 (A13-D3) associée à une amorce spécifique de la partie C-terminale de la diphtine synthase (A13-R2) ne nous a également donné aucun produit d'amplification ce qui nous empêche de conclure sur la présence possible du gène *ptp3* entre les gènes *sec13* et *ds* chez *A. locustae*.

Afin de vérifier si la séquence identifiée au niveau du contig 2 code une protéine du tube polaire, des amorces ont été choisies dans la partie C-terminale présentant des homologies avec EcPTP3 (**Fig. 47**). La protéine recombinante produite a été purifiée et injectée à une

ECU07_1090	MELGLILMFASAFVSAKD-RELEEFVEKDIKVFSSYP PAQVLG MEE DQ GVLV SHSKYV NP	59
ECU07_1070	MELLSLFLLPATWGHTKDPVEIKLFLKPD LRVRVKG IPLANTSIEEKDG -----	49
ECU07_1080	MSLALFVGTVLSYPLYLDSL TNKP IRITPVGNKYL SLSEFV RDFGPNPFRTV SALEPG NG	60
ECU07_1090	SKYKFVTRARLVKSGERYV VIF GENNICK EGNS VVKCKEER - PWDIDRKEFGYTISTDNK	118
ECU07_1070	----- RYAITIG - NSYLSGDGVV DISR EF - YWDVYDRQLGTVICSE EQ	91
ECU07_1080	YN---- TRSQINRNGGVFKVRIGGS WLC RRKKDLTKCTEKADFW S ISRGGDGFII S QEGY	116
	* * *	
ECU07_1090	CITKGPDESIEMKPC VNTDD QIFGFKLADLGGCGS VE SL LGSEKPKSTTTNVN IFQ PESE	178
ECU07_1070	CLTHAEDG-LEMRPCLDP SD FRS ----- ASQLFQIESIPGIPKDSN VIY RMD	138
ECU07_1080	CLSTGDGDKLGLERC CDG SRSHVFFFKDMG ---- VEECLDS VDL DARPRTEAEMVKQLK	171
	* * *	
ECU07_1090	CLPSVMIKADGDVEKIE END VHVLHKEGAH THV IEEAGHPLYEESAP SKRR VVVS-HRTK	237
ECU07_1070	LVGKVEKLV D PLNNRIAEL VDR MDSFG ----- TDPEEQEK C-----	174
ECU07_1080	LKKKLRDLGKKDK DA QAQKIREKLEEKNN ----- FEKYAEKNLPDLNGK DDS KEVLK	222
ECU07_1090	RSHLPGTRR TYL GHHHFP HH LPHHYRNRTL FERK PVVF	276
ECU07_1070	-----	174
ECU07_1080	KLWNFGWRRPRFG T FKFP W SFP FC KKLW -----	251

Figure 50. Alignement entre les protéines déduites des CDS 07_1070, 07_1080 et 07_1090. Les aa identiques sont grisés. Les résidus cystéine en positions conservées sont indiqués par des astérisques. Les peptides signaux prédits sont encadrés. Les répétitions histidine ainsi que les deux sites potentiels de N-glycosylation (NPSK et NRTL) de 07_1090 sont en gras. Pour 07_1080, les deux répétitions KKLW sont également soulignées. Le nombre d'aa est indiqué à droite. Les numéros d'accension de 07_1070, 07_1080 et 07_1090 sont les suivants : NP_586036, NP_586037 et NP_586038.

souris. Le sérum appliqué à des frottis de spores d'*A. locustae* donne un marquage des tubes polaires dévaginés (**Fig. 49B**). La séquence identifiée au niveau du contig 2 code donc bien pour une protéine du tube polaire et correspond probablement à un orthologue de PTP3.

I.2. PTP4 et PTP5, deux nouvelles protéines du tube polaire

I.2.1. Identification chez *E. cuniculi*

Nous avons entrepris de rechercher de nouvelles protéines du tube polaire chez *E. cuniculi*. Cette étude a été initiée avec l'analyse du protéome de cette microsporidie. A l'aide de différentes stratégies d'extractions protéiques, séparations électrophorétiques en une ou deux dimensions et analyse en spectrométrie de masse, 177 protéines d'*E. cuniculi* ont pu être identifiées dont 26,5% représentent des protéines à fonction inconnue (**Brosson et al., 2006**). Parmi elles, celles possédant un peptide signal potentiellement clivable, caractéristique des protéines sécrétées, ont été étudiées. C'est le cas de l'antigène codé par le CDS 07_1090 qui ne présente aucune homologie de séquence avec les bases de données si ce n'est avec 2 autres CDS d'*E. cuniculi* situés en amont sur le même chromosome et portés par le même brin d'ADN (CDS 07_1080 et 07_1070). La protéine codée par 07_1090 (276 aa) présente respectivement 21,9% et 17,6% d'identité avec les produits des CDS 07_1080 (251 aa) et 07_1070 (174 aa, **Fig. 50**). Des expériences de RT-PCR à partir d'ARN extraits de cellules HFF infestées nous ont permis de vérifier que ces trois CDS sont transcrits (non montré).

I.2.1.1. Immunodétection des protéines codées par 07_1090 (EcPTP4) et 07_1080 (EcPTP5)

Afin d'étudier la localisation des trois antigènes, des protéines recombinantes ont été produites chez *E. coli*. Ces protéines correspondent aux résidus 19 à 223 pour 07_1090, 13 à 251 pour 07_1080 et 17 à 174 pour 07_1070. Après purification, les antigènes recombinants ont été injectés à des souris afin de produire des anticorps. Les anticorps ont été appliqués à

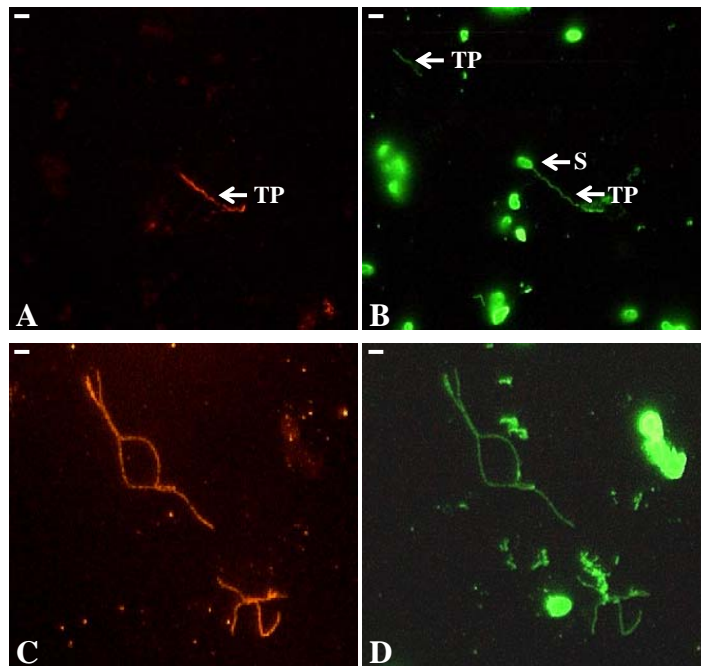


Figure 51. Les protéines codées par 07_1090 (EcPTP4) et 07_1080 (EcPTP5) sont localisées au niveau du tube polaire. Des frottis de spores d'*E. cuniculi* ont été incubés avec les anticorps dirigés contre les protéines recombinantes EcPTP4 (A) et EcPTP5 (C) puis avec un sérum de lapin infesté par *E. cuniculi* dilué au 1/500 (B et D). Les anticorps dirigés contre 07_1090 reconnaissent seulement les tubes polaires qui sont associés à la spore (A et B). Ceux dirigés contre 07_1080 reconnaissent l'ensemble des tubes polaires dévaginés associés à la spore ou libres (C et D). Les anticorps anti-EcPTP4 et anti-EcPTP5 sont utilisés au 1/100. Les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés Alexa Fluor 546 et anti-IgG de lapin couplés Alexa Fluor 488 sont utilisés au 1/1000. Echelle : 1 µm.

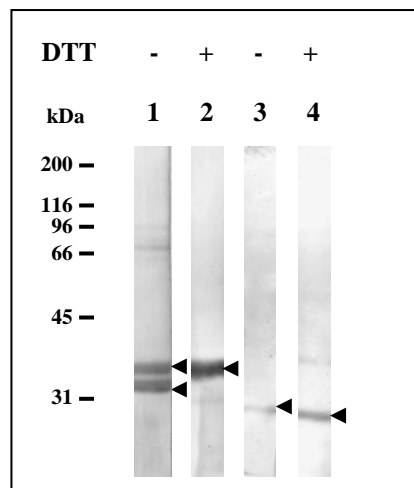


Figure 52. Immunodétection en Western blot des protéines EcPTP4 et EcPTP5. Les protéines sporales ont été extraites de façon différentielle avec du SDS 2,5% (pistes 1 et 3) puis avec du SDS 2,5% / 100 mM DTT (pistes 2 et 4). Les profils protéiques ont été incubés avec les anticorps spécifiques de EcPTP4 (pistes 1 et 2) et spécifiques de EcPTP5 (pistes 3 et 4). Les flèches indiquent les protéines reconnues. Les anticorps primaires sont utilisés au 1/500 et les anticorps secondaires (anti-IgG de souris) couplés à la phosphatase alcaline au 1/10000.

des frottis de spores d'*E. cuniculi*. Aucun résultat n'a pu être obtenu avec le sérum dirigé contre 07_1070 alors que ceux dirigés contre 07_1080 et 07_1090 donnent un marquage des tubes polaires dévaginés (**Fig 51**). Un double marquage réalisé avec un sérum de lapin infesté par *E. cuniculi*, montre que seuls les tubes polaires accrochés à une spore sont marqués par les anticorps anti-07_1090 (**Fig. 51A et B**), alors que les anticorps anti-07_1080 reconnaissent l'ensemble des tubes polaires dévaginés (**Fig. 51C et D**). Les CDS 07_1090 et 07_1080 codent donc pour deux nouvelles protéines du tube polaire que nous avons nommées EcPTP4 et EcPTP5. La nature de 07_1070 et son appartenance au tube polaire reste à étudier puisqu'aucun marquage n'a pu être obtenu.

Les anticorps ont ensuite été appliqués à des Western blot de protéines sporales d'*E. cuniculi*. Le sérum dirigé contre EcPTP4 reconnaît deux bandes protéiques dans l'extrait SDS seul (35 et 40 kDa) ce qui est supérieur à la taille attendue (29,7 kDa). En présence d'agent réducteur (100 mM DTT), seule la bande 40 kDa est détectée (**Fig. 52, pistes 1 et 2**). Les anticorps dirigés contre EcPTP5 mettent en évidence une bande protéique de 30 kDa ce qui est proche de la taille prédite (27,7 kDa). Cette protéine est majoritairement retrouvée dans les extraits obtenus en présence de DTT (**Fig. 52, pistes 3 et 4**).

1.2.1.2. Description des protéines EcPTP4 et EcPTP5

EcPTP4 est une protéine de 276 aa qui présente un peptide signal potentiellement clivable de 16 aa. La protéine mature (29 739 Da, pI 7,5) comprend un segment N-terminal acide de 40 résidus (pI 4,81) et une extrémité C-terminale basique de 80 aa (pI 10,60). Les aa chargés représentent 30% de la protéine mature, l'aa majoritaire étant le glutamate.

EcPTP5 est une protéine de 251 aa. La protéine mature après clivage du peptide signal prédit de 12 aa a une masse moléculaire de 27 660 Da et un pI basique (9,6), en accord avec la richesse en résidus lysine (12,5%).

Protéine	Localisation	Taille (nombre d'aa)		pI	aa majoritaires (%)			Nb de résidus cystéine	Nb de sites potentiels de glycosylation	
		Précurseur	Protéine mature		E	K	D		O-Glyc	N-Glyc
07_1090	Tube polaire (EcPTP4)	276	260	7,5	<u>10,4</u>	8,85	5	6	2	2
07_1080	Tube polaire (EcPTP5)	251	239	9,6	6,3	<u>12,5</u>	7,5	6	1	0
07_1070	?	174	158	4,8	8,3	5,7	<u>10,7</u>	4	0	1

Tableau 15. Principales caractéristiques des protéines codées par les CDS 07_1090, 07_1080 et 07_1070. Les protéines matures correspondent aux protéines après clivage du peptide signal. L'ensemble des caractéristiques sont déduites des séquences des protéines matures. L'aa majoritaire est souligné pour chaque protéine. Les numéros d'accès des séquences protéiques de 07_1070, 07_1080 et 07_1090 sont respectivement NP_586036, NP_586037 et NP_586038. Ec : *E. cuniculi*. aa : acides aminés. Nb : nombre.

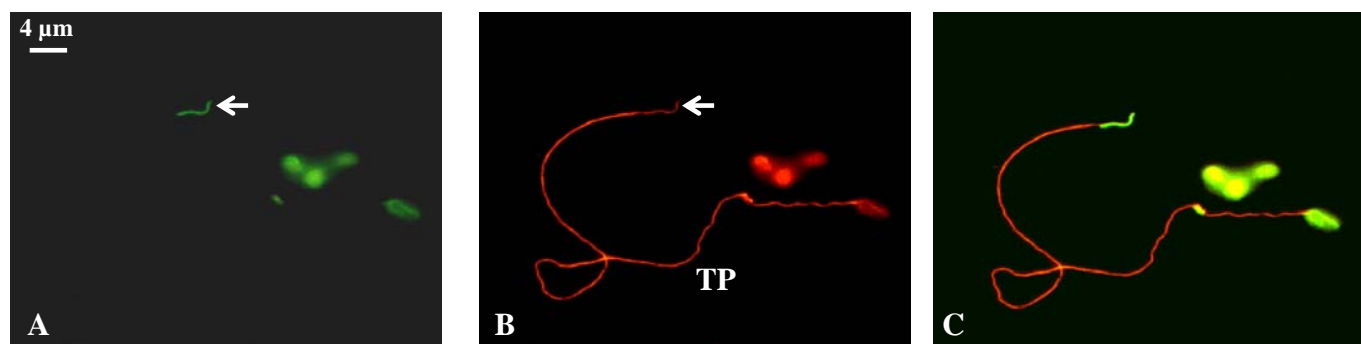


Figure 53. Le sérum dirigé contre la protéine AIPTP4 recombinante reconnaît uniquement la partie terminale du tube polaire (A, flèche). Un double marquage est réalisé avec le sérum anti-AIPTP2 qui réagit avec l'ensemble du tube polaire (B). (C) Superposition des deux images. Les anticorps primaires sont dilués au 1/100, les anticorps secondaires (anti-IgG de souris couplés Alexa 488 ou Alexa 546) sont utilisés au 1/1000.

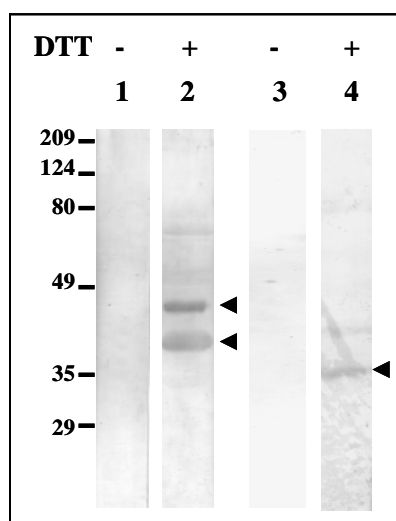


Figure 54. Immunodétection en Western blot des protéines AIPTP4 et AIPTP5. Les protéines sporales ont été extraites de façon différentielle avec du SDS 2,5% (pistes 1 et 3) puis avec du SDS 2,5% / DTT 100 mM (pistes 2 et 4). Les profils protéiques ont été incubés avec les anticorps spécifiques de AIPTP4 (pistes 1 et 2), et spécifiques de AIPTP5 (pistes 3 et 4). Les flèches indiquent les protéines reconnues. Les anticorps sont dilués au 1/500. Les anticorps secondaires, anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline, sont dilués au 1/10000.

07_1070 code pour une protéine de 174 aa qui possède aussi un peptide signal potentiel de 16 aa. La protéine mature a une taille de 17 984 Da et un pI acide de 4,87. L'aspartate est l'aa majoritaire.

Comme le montre l'alignement présenté sur la **figure 50**, quatre résidus cystéine sont en positions conservées entre ces 3 protéines. Les principales caractéristiques de ces 3 protéines sont regroupées dans le **tableau 15**.

I.2.2. Identification chez *A. locustae* et *P. grylli*

Chez *A. locustae*, les CDS 968 (726 pb, 242 aa) et 969 (1143 pb, 381 aa) localisés sur le contig 615 et organisés en tandem semblent coder respectivement pour des orthologues des protéines EcPTP5 et EcPTP4. Aucun orthologue de 07_1070 n'a pu être mis en évidence dans les séquences d'*A. locustae*. Sur ce même contig, les gènes entourant les CDS 968 et 969 ne présentent pas d'orthologue situés sur le chromosome VII d'*E. cuniculi*.

I.2.2.1. Immunodétection des protéines AlPTP4 et AlPTP5

Afin de vérifier que les produits des CDS 969 et 968 sont bien localisés au niveau du tube polaire, des protéines recombinantes correspondant aux régions aminoacides 65 à 376 pour le CDS 969 et 13 à 234 pour le CDS 968 ont été produites chez *E. coli*. Après purification, les deux protéines recombinantes ont été injectées à des souris afin de produire des anticorps. En IFA, les anticorps dirigés contre le produit du CDS 969 donnent un marquage restreint à la partie terminale des tubes polaires dévaginés (**Fig. 53A et C**). Les anticorps dirigés contre la protéine codée par le CDS 968 donnent au contraire un faible marquage de toute la longueur des tubes polaires dévaginés (non montré). Les CDS 968 et 969, qui semblent donc être des orthologues des gènes *Ecptp5* et *Ecptp4*, ont été nommés respectivement *Alptp5* et *Alptp4*.

A.			
EcPTP4	-MELGLILMFASAFVSAKDRLEEFVEKDIKVFFSSYPAQVLGMEEDQGVLVSHSKYVNP	59	
AlPTP4	MLLFVFICTLYSENTNGKINELISYFLDKDLHILFSAYMHMELAEKTVTGEISGVNRLVDA	60	
EcPTP4	SKYKQVTRARLVKSGERYVVIFGENNICKEGNSVVKCKE-ERPWDIDRKEFGYTISTDNK	119	
AlPTP4	REFKYDDRVTITKNGPGYEIKIGKSKICRNKTDVVKCQDGSSVNIIEPRTFGFNLSQDGL	120	
	* * *		
EcPTP4	CITKGPDESIEMKPCVNTDDQIFGFKLA-----	147	
AlPTP4	CITQIDENPLKLRCTGDDQLFTFKVAGGRDRCEEALFDDEGRVEKKMIIPDIHIYPV	180	
	* * *		
EcPTP4	-DLGGCGSVESLLGSEKPKSTTTNVNIFQPESECLPSVMIKADG-----	190	
AlPTP4	SDVHEMGHSESIRTSEYSIASSDALDYETTTEKETIPEIRSRQKTPVIIHEHRDSDFVL	240	
EcPTP4	-----DVEKIEENDVHVLHKEGARTHVIEEAGHPLYEESAPSKRRVVSHTRT	237	
AlPTP4	PRRKIRILRNAYINREHSKNHDVLPKHALKRREVPVFHRHIIRKDTLPTHRYISPSYGN	300	
EcPTP4	KRSHLPGTRR-----TYLGHHHPHHHLPHHYRNRTLFERKPVVF-----	276	
AlPTP4	FSPRRQKSDDSQSVKVSLDLENNDLNLHLHDDPSFDDLHLQKAPGVFVERRKHTKYK	360	
EcPTP4	-----	276	
AlPTP4	HRKENMYLERGVRNTDKFLFQ	381	
B.			
EcPTP5	MSLALFVGTVLSYPLYLDSLTKNPIRITPVGNKYLSLSEFVRDFGNPFRTVSALEPGNG	60	
AlPTP5	--MIILYALTVFSEHIDDIINKELRIVFPSYLEYFLADNMRDLGDEPFVVVSEDSYTS	58	
EcPTP5	YNTRSQINRNGVFKVRIGGSWLCRRKKDLTKCTEKADFWSISRGGDGFIIISQEGYCLST	120	
AlPTP5	LSYVSKLQDRGMFAITVGEWVKCERSKRIVKCAEDTLWEVRPVKYGFNIVRNENCVTF	118	
	* * *		
EcPTP5	GDGDKLGLERCDGKSRSHVFFFKDMGVEECLDSVDLDARPRTEAEMVKQLKLLKKLRLDLG	180	
AlPTP5	GE-EGLVMPCTMSKRQVDFQVIPEILOCFERSGNLLEPPATNEERLRRLLG--RKMK	175	
	* * *		
EcPTP5	KKDKDAAQKIREKLEEKNNFEKYAEKNLPDLNGKDDSKVLKKLWNFGWRRPRFGTFKFP	240	
AlPTP5	RPSPALVNEINRANIAPKTFEDFLKKMRFDGKKMERAQDTLKKLWEKTYMKKLPQMWKGG	235	
EcPTP5	WFSFPFCKKLW	251	
AlPTP5	WSKLFCT----	242	

Figure 55. Alignement des séquences en acides aminés de PTP4 (A) et PTP5 (B) d'*E. cuniculi* et *A. locustae*. Les positions des aa sont indiquées à droite. Les résidus identiques sont surlignés en gris foncé et les résidus similaires en gris clair. Les résidus cystéine en positions conservées sont indiqués par des astérisques. Les peptides signaux potentiellement clivables sont soulignés. Les sites potentiels de N-glycosylation sont en gras et soulignés. Les séquences des CDS 969 et 968 codant pour les protéines AlPTP4 et AlPTP5 sont obtenues à partir de la nouvelle base de données d'*A. locustae* (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01?page=orfs>). Les numéros d'accèsion de 07_1080 (EcPTP5) et 07_1090 (EcPTP4) sont NP_586037 et NP_586038.

Les anticorps ont ensuite été appliqués à des profils protéiques de spores d'*A. locustae*. Les anticorps anti-AIPTP4 reconnaissent deux bandes protéiques de 40 et 45 kDa solubles en présence de DTT (**Fig. 54, piste 2**), la taille attendue étant de 45 kDa. Les anticorps dirigés contre AIPTP5 réagissent avec une bande protéique proche de 35 kDa dans l'extrait DTT (**Fig. 54, piste 4**), ce qui est légèrement supérieur à la taille attendue (26 kDa).

1.2.2.2. Caractéristiques des protéines AIPTP4 et AIPTP5

La protéine AIPTP4 est composée de 381 aa (**Tableau 16A**) et possède un peptide signal dont le site de clivage est prédit entre les résidus G17 et K18. La protéine mature présente un pI basique (8,5) et une masse moléculaire de 42 428 Da. La lysine et l'aspartate sont les deux aa les plus abondants. Parmi les six résidus cystéines, 4 sont en positions conservés avec EcPTP4 (**Fig. 55A**).

AIPTP5 est une protéine de 242 aa. Les 12 premiers résidus présentent les caractéristiques d'une séquence potentiellement clivable. Dans la protéine mature de 230 résidus (26 965 Da, pI 8,9), les 100 premiers aa constituent un segment acide (5,2). Les deux aa les plus représentés sont le glutamate et la lysine. Six résidus cystéines sont présents dont 5 en positions conservées avec EcPTP5 (**Fig. 55B, Tableau 16B**).

AIPTP4 contient trois sites potentiels de N-glycosylation, deux sont prédits pour EcPTP4. Ces deux protéines présentent également deux sites potentiels de O-glycosylation (**Tableau 16A**). Comme EcPTP5, AIPTP5 ne présente aucun site potentiel de N-glycosylation. Un site potentiel de O-glycosylation est prédit pour EcPTP5 uniquement (**Tableau 16B**).

1.2.2.3. Identification de protéines de type PTP4 et PTP5 chez P. grylli

Nous avons ensuite voulu voir si l'organisation des gènes *ptp4* et *ptp5* était conservée chez *Paranosema grylli*. Ce travail a été envisagé par une stratégie PCR en utilisant des amorces déterminées dans les gènes *ptp4* et *ptp5* d'*A. locustae* (**Fig. 56**). Le séquençage d'un

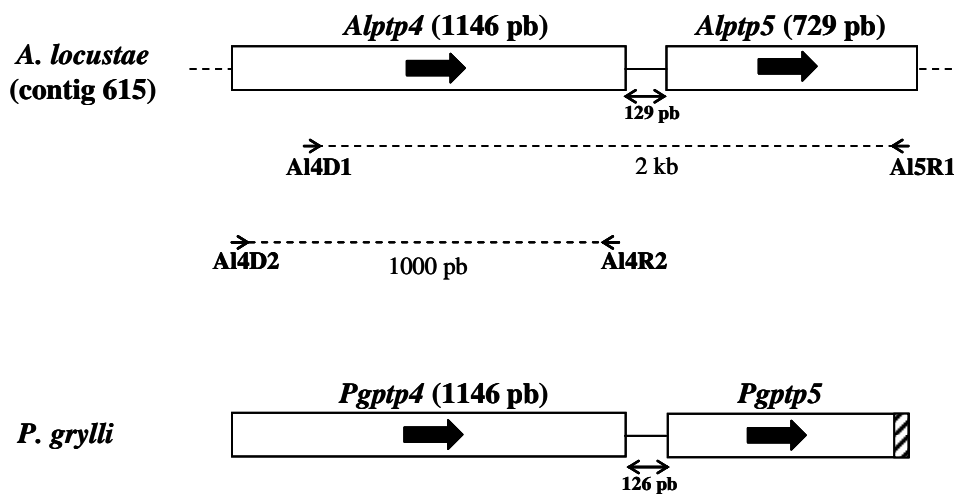


Figure 56. Stratégie PCR utilisée pour amplifier les gènes *ptp4* et *ptp5* chez *P. grylli*. Les amorces Al4D1, Al4D2 et Al4R2 sont déterminées à partir de la séquence de *Alptp4*. Al5R1 est une amorce reverse spécifique de *Alptp5*. Une première amplification réalisée avec les deux amorces Al4D1 et Al5R1 a permis d'obtenir un fragment d'environ 2 kpb chez *P. grylli*. La séquence 5' de *Pgptp4* a été caractérisée grâce à l'utilisation du couple d'amorce Al4D2, désignée au niveau de l'ATG de *Alptp4*, et Al4R2. La zone hachurée correspond à la séquence 3' manquante de *Pgptp5* non déterminée par PCR.

Protéine	Taille (nombre d'aa)		pI	aa majoritaires (%)					Nb de résidus cystéine	Nb de sites potentiels de glycosylation	
	Précurseur	Protéine mature		E	S	K	R	D		O-Glyc	N-Glyc
A.											
EcPTP4	276	260	7,5	<u>10,4</u>	7,3	8,8	5,8	5,0	6	2	2
AlPTP4	381	364	8,5	7,4	7,7	<u>8,5</u>	8,2	<u>8,5</u>	5	2	3
PgPTP4	381	366	9,2	7,6	<u>9,6</u>	9	8,2	6,8	5	0	3
Protéine	Taille (nombre d'aa)		pI	aa majoritaires (%)					Nb de résidus cystéine	Nb de sites potentiels de glycosylation	
	Précurseur	Protéine mature		K	L	G	R	E		O-Glyc	N-Glyc
B.											
EcPTP5	252	239	9,6	<u>12,5</u>	9,6	8,8	7,5	6,3	6	1	0
AlPTP5	242	230	8,9	<u>9,1</u>	8,7	5,2	8,3	<u>9,1</u>	6	0	0

Tableau 16. Principales caractéristiques des protéines PTP4 (A) et PTP5 (B) identifiées chez *Encephalitozoon cuniculi* (Ec), *Antonospora locustae* (Al) et *Paranosema grylli* (Pg). Les protéines matures correspondent aux protéines après clivage des peptides signaux. Le pI, le nombre de sites de glycosylation et les pourcentages en aa sont calculés à partir des protéines matures. Le ou les aa majoritaires sont soulignés. La séquence de PgPTP5 n'étant pas complète, les caractéristiques de cette protéine n'ont pas été incluses dans ce tableau récapitulatif. Les numéros d'accèsion de EcPTP5 (ECU07_1080) et EcPTP4 (ECU07_1090) sont les suivants : NP_586037 et NP_586038. aa : acides aminés. Nb : nombre.

fragment de 2 kb nous a permis d'identifier des séquences partielles des gènes *ptp4* et *ptp5* confirmant une organisation en tandem conservée chez *P. grylli*. Le début de *Pgptp4* a été déterminé en utilisant une amorce localisée au niveau de l'ATG de la séquence *Alptp4*. Nous n'avons cependant pas pu obtenir la séquence complète de *Pgptp5*.

PgPTP4 qui présente 75,1% d'identité avec AlPTP4 est constituée du même nombre d'aa. Après clivage du peptide signal, la protéine mature a une masse moléculaire de 42 456 Da et un pI basique (9,2). AlPTP4 et PgPTP4 ont des parties N-terminales très conservées (aa 1 à 180, 92,2% d'identité) tandis que les parties C-terminales sont plus divergentes. Les principales caractéristiques des protéines PTP4 d'*E. cuniculi*, d'*A. locustae* et de *P. grylli* sont regroupées dans le **tableau 16A**.

PgPTP5, comme AlPTP5 présente un peptide signal de 12 aa. Sur la partie amplifiée, AlPTP5 et PgPTP5 présentent 82,6% d'identité suggérant que ces deux protéines sont plus conservées que AlPTP4 et PgPTP4.

II. Etudes des interactions PTP1-PTP2 et PTP4-PTP5 par co-expression chez *E. coli*

Plusieurs arguments laissent supposer l'existence d'interaction(s) entre les protéines PTP1 et PTP2 d'*E. cuniculi*: (i) leur présence dans un complexe multiprotéique mis en évidence par des expériences de cross-linking chimiques; (ii) leurs propriétés de solubilité identiques, ces 2 PTPs étant solubles en présence de fortes concentrations en agents réducteurs ; (iii) l'organisation en tandem des gènes *ptp1* et *ptp2* (synténie conservée chez *E. intestinalis*, *E. hellem*, *A. locustae* et *P. grylli*) dont l'expression semble être co-réglée au cours du cycle de développement (**Peuvel et al., 2002**). Afin de caractériser de telles interactions, nous avons choisi une méthode qui consiste à co-exprimer les protéines d'intérêt chez *E. coli*. Une des protéines est fusionnée à un épitope de 6 résidus histidine et peut ainsi

Protéine	Région amplifiée (positions en aa)	Taille calculée des protéines recombinantes (kDa)		Taille observée des protéines recombinantes (kDa)	
		pEATN-H	pEK	pEATN-H	pEK
EcPTP1 entière	23 à 395	40	37,6	50	50
EcPTP1-N	23 à 178	18,5	16,2	20	20
EcPTP1-C	174 à 395	24,9	22,5	25	25
EcPTP2	14 à 277	31,3	28,9	37	37
AIPTP1	19 à 355	37	34,8	50	50
AIPTP2	20 à 287	31,2	29,2	35	35
EcPTP4	17 à 276	32,3	29,8	40	40
EcPTP5	13 à 251	30,2	27,7	31	31

Tableau 17. Clonages réalisés pour les expériences de co-expression chez *Escherichia coli*. Les séquences nucléiques de *Ecptp1* (ECU06_0250), *Ecptp2* (ECU06_0240), *Ecptp4* (ECU07_1090) et *Ecptp5* (ECU07_1080) ont été obtenues à partir des numéros d'accès suivants : NM_001041403, NM_001041402, NM_001041660 et NM_001041659. Ec : *E. cuniculi* et Al : *A. locustae*.

Vecteur pEATN-H	Vecteur pEK	Interaction testée	Co-purification
EcPTP1	EcPTP2	EcPTP1 / EcPTP2	+
EcPTP1-N	EcPTP2	EcPTP1-N / EcPTP2	+
EcPTP1-C	EcPTP2	EcPTP1-C / EcPTP2	-

EcPTP2	EcPTP1	EcPTP2 / EcPTP1	+
EcPTP2	EcPTP1-N	EcPTP2 / EcPTP1-N	+
EcPTP2	EcPTP1-C	EcPTP2 / EcPTP1-C	-

AIPTP1	AIPTP2	AIPTP1 / AIPTP2	+
AIPTP2	AIPTP1	AIPTP2 / AIPTP1	+

EcPTP4	EcPTP5	EcPTP4 / EcPTP5	-
EcPTP5	EcPTP4	EcPTP5 / EcPTP4	ND

Tableau 18. Etude des interactions entre PTPs par la technique de co-expression chez *E. coli*. Les résultats obtenus (co-purification sur colonne Ni-NTA en conditions natives) pour les différentes combinaisons testées sont mentionnés dans le tableau. (+) : co-purification, (-) : absence de co-purification. ND : non déterminé.

être purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. La présence d'interactions est alors détectée par co-purification de l'autre protéine étudiée qui ne possède pas cet épitope histidine.

II.1. Les différentes interactions étudiées

Nous avons réalisé des études de co-expression des protéines PTP1 et PTP2 d'*E. cuniculi*. A titre comparatif, cette étude a été effectuée à partir des protéines PTP1 et PTP2 d'*A. locustae*. Nous nous sommes également intéressés aux interactions pouvant exister entre PTP4 et PTP5 d'*E. cuniculi* qui, comme PTP1 et PTP2, sont codées par des gènes en tandem dont l'organisation est conservée chez différentes espèces microsporidiennes.

Les séquences des gènes *ptp1*, *ptp2*, *ptp4* et *ptp5* d'*E. cuniculi* et des gènes *ptp1* et *ptp2* d'*A. locustae* ont donc été amplifiées, à l'exception de la région codant pour le peptide signal prédit, puis clonées dans les vecteurs d'expression pEATN-H et pEK (**Tableau 17**). Dans un second temps, de façon à préciser les régions impliquées dans les interactions PTP1-PTP2 d'*E. cuniculi*, deux parties de PTP1 (régions aa 23-178 et 174-395) ont été clonées et co-exprimées avec la protéine PTP2 entière. Les différents gènes ont été clonés dans chaque vecteur afin de tester les co-expressions dans les 2 sens et de confirmer les éventuelles interactions mises en évidence.

Avant de réaliser les expériences de co-expression, l'expression individuelle de chaque protéine recombinante est vérifiée par SDS-PAGE et en Western blot (en conditions dénaturantes). Des protéines recombinantes aux tailles attendues ont été obtenues dans la plupart des cas (**Tableau 17**). Un exemple est présenté sur la **figure 57** dans le cas des protéines PTP4 et PTP5 (**pistes 2 et 3**). A cette étape, nous avons également vérifié que seules les protéines présentant un épitope histidine pouvaient être purifiées sur colonne de nickel. La co-expression des protéines d'intérêt est ensuite réalisée et les échantillons sont analysés par SDS-PAGE et Western blot (**Fig. 57, pistes 4 à 6**). Une fois ces contrôles réalisés, et dans le

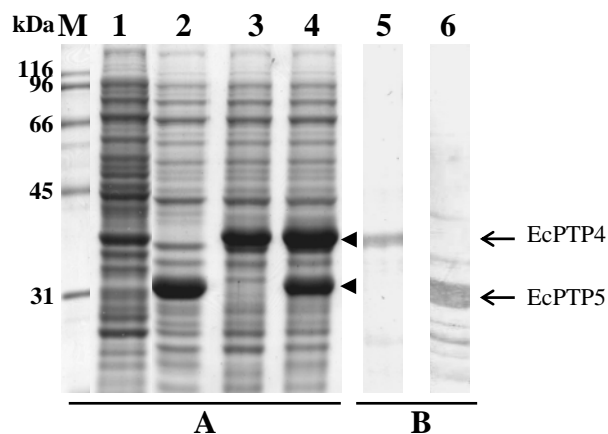


Figure 57. Exemple de l'analyse en conditions dénaturantes de la co-expression des protéines EcPTP4 et EcPTP5 chez *E. coli* (souche BL21-DE3). (A) SDS-PAGE 10% des protéines bactériennes extraites en tampon de Laemmli (coloration au bleu de Coomassie) après expression individuelle des protéines EcPTP4 (piste 3) et EcPTP5 (piste 2) et co-expression de ces deux protéines (piste 4). (B) Immunomarquage sur Western blot des protéines recombinantes produites au cours de la co-expression avec les anticorps anti-EcPTP4 (piste 5) et anti-EcPTP5 (piste 6) dilués au 1/500. Les anticorps anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline sont utilisés au 1/10000. M : marqueurs de poids moléculaire (Biorad). Piste 1 : témoin non induit. Piste 2 : pEK-EcPTP5. Piste 3 : pEATN-EcPTP4. Pistes 4, 5 et 6 : co-expression pEK-EcPTP5/pEATN-EcPTP4.

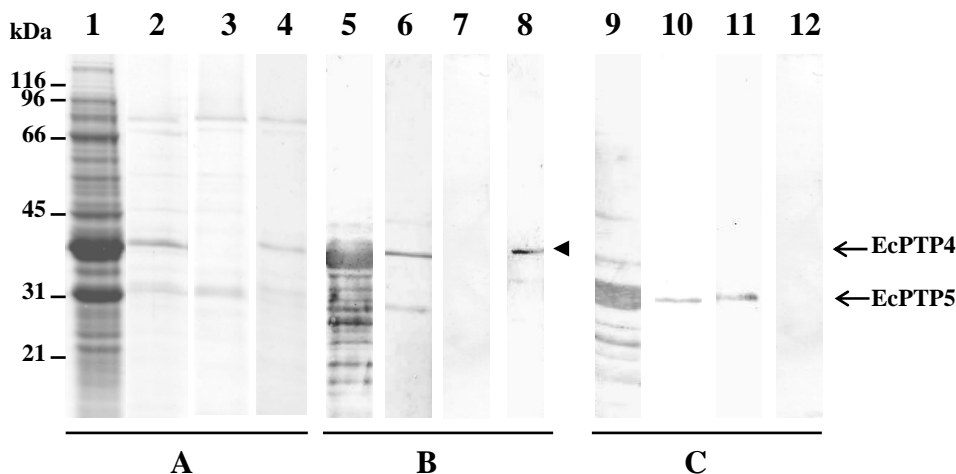


Figure 58. Analyse des fractions obtenues lors de la purification en conditions natives des protéines pEATN-EcPTP4 et pEK-EcPTP5 co-exprimées chez *E. coli*. (A) SDS-PAGE (12%) coloré au bleu de Coomassie. (B et C) Immunomarcages des différentes fractions à l'aide d'anticorps anti-EcPTP4 (B) et anti-EcPTP5 (C). 1, 5 et 9 : lyse des protéines bactériennes en conditions non dénaturantes montrant que les protéines d'EcPTP4 et EcPTP5 sont solubles. 2, 6 et 10 : premier passage sur la colonne. 3, 7 et 11 : lavage de la colonne (20 mM d'imidazole). 4, 8 et 12 : éluat (250 mM d'imidazole). Les anticorps primaires sont dilués au 1/500, les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline sont utilisés au 1/10000.

but d'analyser les interactions, les protéines co-exprimées sont solubilisées en conditions non dénaturantes avant d'être purifiées sur colonne de nickel. La purification de chaque protéine en conditions natives a ensuite été confirmée par SDS-PAGE et en Western-blot.

II.2. Identification des premières interactions

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 18**.

L'étude des interactions entre les protéines EcPTP4 et EcPTP5 montre que les deux protéines sont solubles en conditions natives (**Fig. 58, pistes 5 et 9**). L'analyse du dernier lavage avant élution montre encore la présence de EcPTP5 (**Fig. 58, piste 11**) mais seule la protéine EcPTP4 présentant l'épitope histidine est identifiée dans l'éluat final (**Fig. 58, pistes 8 et 12**). Aucune interaction n'est donc détectée entre EcPTP4 et EcPTP5. L'étude des interactions entre ces deux protéines n'a pu être réalisée que dans un seul sens (pEATN-EcPTP4 et pEK-EcPTP5) car EcPTP4 présente, dans sa partie C-terminale 2 répétitions de 3 histidines, qui lui permettent d'être purifiée sur colonne Ni-NTA même lorsqu'elle est exprimée en vecteur pEK.

L'étude des interactions entre les protéines PTP1 et PTP2 d'*A. locustae* montre que ces deux protéines sont correctement co-exprimées et qu'elles sont solubilisées en conditions natives (**Fig. 59, pistes 1 et 4**). Aucune protéine n'est détectée dans la dernière fraction de lavage (**Fig. 59, pistes 2 et 5**) ce qui nous permet de valider les résultats observés dans la dernière fraction correspondant à l'élution finale. Les pistes 3 et 6 présentent l'analyse des protéines d'intérêt dans l'éluat final : les anticorps anti-AIPTP1 reconnaissent une bande à 50 kDa, les anticorps anti-AIPTP2 une bande à 35 kDa, ces protéines correspondant respectivement aux protéines AIPTP1 et AIPTP2. L'ensemble de ces résultats montre que la protéine AIPTP1 s'est fixée correctement à la colonne par l'intermédiaire de l'épitope histidine. AIPTP2 est retrouvée dans l'éluat final suggérant que cette protéine a pu être

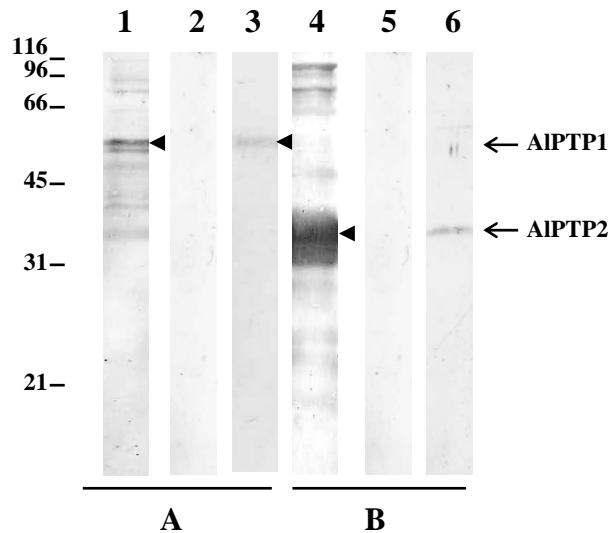


Figure 59. Analyse de la purification en conditions natives des protéines AIPTP1 et AIPTP2 après co-expression. Immunomarquages des différentes fractions obtenues lors de la purification des protéines pEATN-AIPTP1 et pEK-AIPTP2 sur colonne de nickel après co-expression, à l'aide d'anticorps anti-AIPTP1 (**A**) et anti-AIPTP2 (**B**) dilués au 1/1000. 1 et 4 : solubilisation des protéines bactériennes en conditions non dénaturantes. 2 et 5 : dernier lavage de la colonne avant élution (20 mM d'imidazole). 3 et 6 : éluat « final » réalisé avec 250 mM d'imidazole. Les protéines AIPTP1 et AIPTP2 sont présentes dans l'éluat « final ». Des résultats identiques sont obtenus avec les protéines PTP1 et PTP2 d'*E. cuniculi*. Les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline sont utilisés au 1/10000.

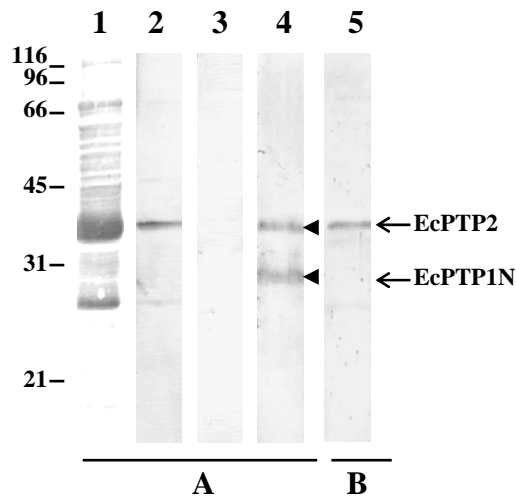


Figure 60. Analyse de la purification en conditions natives des protéines EcPTP1N et EcPTP2 après co-expression. Immunomarquages des différentes fractions obtenues après co-expression et purification des protéines pEATN-EcPTP1N et pEK-EcPTP2 sur colonne de nickel à l'aide de l'anticorps monoclonal spécifique de EcPTP1 et EcPTP2 dilué au 1/1000 (**A**) et avec un anticorps spécifique de EcPTP2 (EcK2) dilué au 1/1000 (**B**). 1 : solubilisation des protéines bactériennes en conditions non dénaturantes. 2 : premier passage sur la colonne montrant qu'une fraction de PTP2 ne s'est pas fixée sur la colonne. 3 : lavage de la colonne (20 mM d'imidazole). 4 et 5 : éluat « final » (250 mM d'imidazole). Les protéines EcPTP1N et EcPTP2 sont présentes dans l'éluat « final ». Les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline sont utilisés au 1/10000.

retenue sur la colonne par interaction avec la protéine AIPTP1. Des résultats similaires sont obtenus pour les protéines PTP1 et PTP2 d'*E. cuniculi* (non montré). Les protéines PTP1 et PTP2 semblent donc interagir.

Afin de préciser les domaines impliqués dans les interactions PTP1-PTP2, nous avons cherché à mettre en évidence des interactions entre la protéine EcPTP2 entière et deux régions de EcPTP1 : une correspondant à la partie N-terminale (EcPTP1N, aa 23 à 178) et une autre correspondant à la partie C-terminale (EcPTP1C, aa 174 à 395). **La figure 60** présente certaines fractions collectées à partir de la colonne de nickel révélées avec un anticorps monoclonal spécifique de EcPTP1 et EcPTP2 (Mab102). Cet anticorps reconnaît deux bandes protéiques à des tailles de 28 kDa (EcPTP1N) et à 37 kDa (EcPTP2), après élution en présence de 250 mM d'imidazole (**Fig. 60A, piste 4**). L'utilisation d'anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre EcPTP2 confirme la présence de EcPTP2 dans l'éluat alors que cette protéine n'est pas fusionnée avec un épitope histidine (**Fig. 60B, piste 5**). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'interactions entre EcPTP2 et la région N-terminale de EcPTP1 (aa 23 à 178). Des résultats identiques sont obtenus lorsque EcPTP2 est exprimée en pEATN fusionnée à l'épitope histidine et EcPTP1-N en pEK.

Après co-expression de la protéine EcPTP2 et de la partie C-terminale de la protéine EcPTP1 (EcPTP1C, aa 174 à 395) et purification sur colonne de nickel, seule la protéine possédant l'épitope histidine est retrouvée dans l'éluat final ce qui indique que la partie C-terminale de EcPTP1 n'est pas impliquée dans les interactions avec EcPTP2 (non montré).

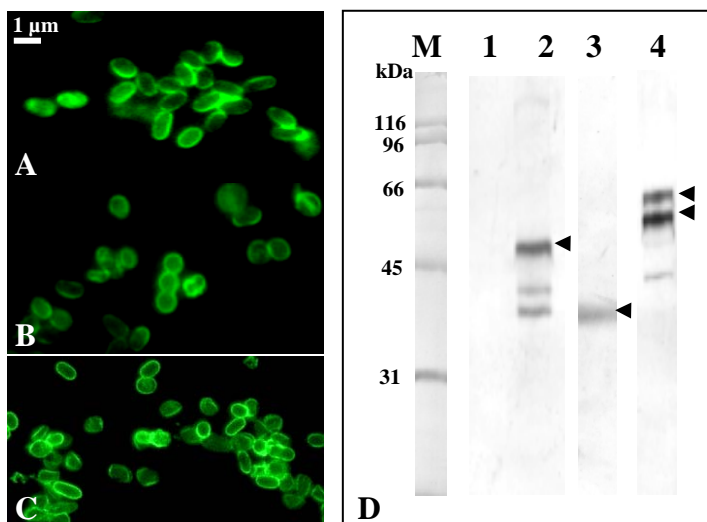


Figure 61. Immunomarquages en IFA (A, B, C) et en Western Blot (D) avec l'anticorps monoclonal 1E4. En IFA, 1E4 marque la paroi sporale d'*E. intestinalis* (B) et réagit aussi avec *E. cuniculi* (A) et *E. hellem* (C). (D) En Western blot, une bande à 40 kDa est marquée dans l'échantillon *E. intestinalis*, taille attendue pour EiSWP1 (piste 3). Une bande majeure de 50 kDa est reconnue pour *E. cuniculi*, ce qui correspond à la taille prédite pour EcSWP1. Des bandes de taille inférieure (40 et 42 kDa) pourraient correspondre à des produits de dégradation (piste 2). Sur Western blot de protéines de cellules HFF infestées par *E. hellem* deux bandes à 55 et 60 kDa sont mises en évidence (piste 4). Les protéines de cellules HFF saines et infestées sont extraites en tampon de Laemmli contenant 2,5% de SDS et 100 mM de DTT puis analysées en SDS-PAGE 10%. M : marqueurs de taille en kDa (Biorad). 1 : HFF saines. 2 : HFF infestées par *E. cuniculi*. 3 : HFF infestées par *E. intestinalis*. 4 : HFF infestées par *E. hellem*. Le Mab1E4 est utilisé au 1/1000, les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline sont dilués au 1/10000.

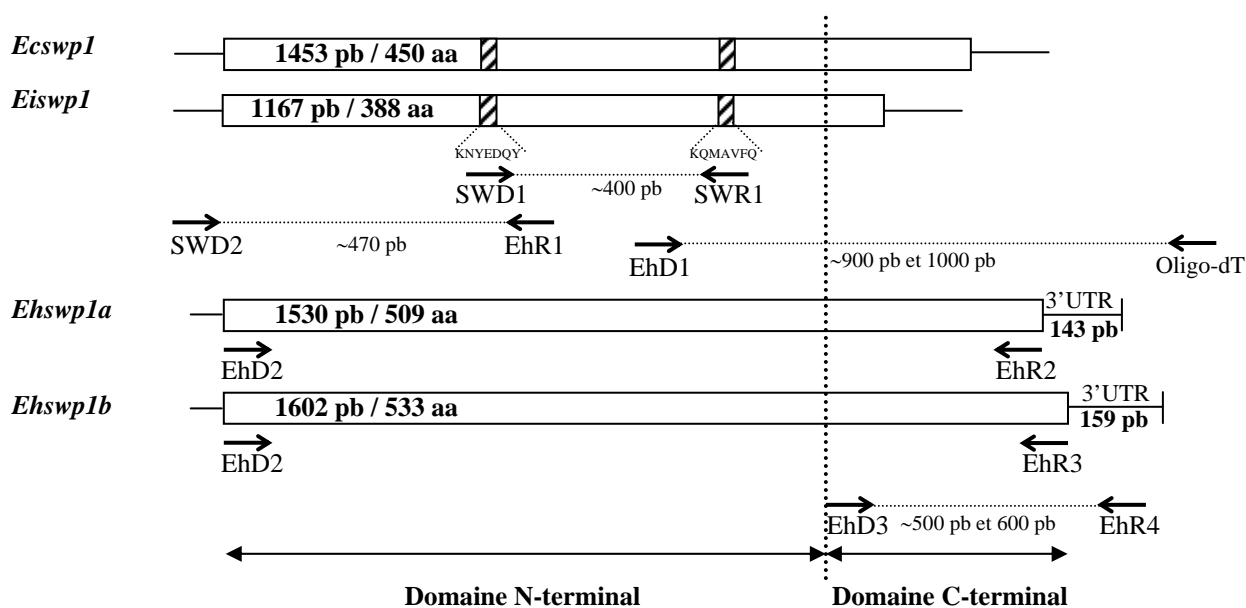


Figure 62. Représentation schématique de la position des amorces utilisées pour l'amplification des gènes *Ehswp1a* et *Ehswp1b*. SWD1 et SWR1 sont des amorces dégénérées déduites à partir de l'alignement EcSWP1-EiSWP1 : un premier fragment de 400 pb a été amplifié. L'extrémité 5' a été complétée en utilisant les deux amorces SWD2 et EhR1. L'identification de l'extrémité 3' a été réalisée par RT-PCR à l'aide d'un oligodT couplé à un adaptateur et une amorce directe EhD1. Deux gènes ont été identifiés : *Ehswp1a* (1530 pb) et *Ehswp1b* (1602 pb). La totalité des séquences de ces deux gènes a été confirmées à l'aide des couples d'amorces EhD2-EhR2 pour *Ehswp1a* et EhD2-EhR3 pour *Ehswp1b*. EhD3 et EhR4 ont été utilisées pour l'étude du polymorphisme de l'extrémité codant la partie C-terminale chez quatre isolats d'*E. hellem*. Les zones hachurées représentent deux régions conservées entre EcSWP1 et EiSWP1 utilisées pour déterminer les amorces dégénérées. Les séquences nucléiques de *Ecswp1* et *Eiswp1* sont obtenues à partir des numéros d'accèsion NM_001042116 et AF355750. Les séquences protéiques de EcSWP1 (ECU10_1660) et EiSWP1 sont obtenues à partir des numéros d'accèsion NP_586283 et AAL27283.

III. Identification de deux protéines de type SWP1 dans la paroi sporale d'*Encephalitozoon hellem*

III.1. Stratégie d'identification de gènes *swp1* chez *Encephalitozoon hellem*

Dans une étude antérieure, des anticorps monoclonaux (Mabs) ont été produits contre des spores d'*Encephalitozoon intestinalis* et *E. hellem*. La plupart s'est révélée être spécifique d'antigènes de la paroi ou du tube polaire (Lujan *et al.*, 1998). Deux d'entre eux, 1E4 et 11B2, marquant la paroi d'*E. intestinalis*, réagissaient également avec *E. cuniculi* et *E. hellem*. L'immunocriblage d'une banque d'ADNc avec le Mab 11B2 a ensuite permis d'identifier la séquence complète d'une protéine majeure de l'exospore d'*E. intestinalis* (EiSWP1, Hayman *et al.*, 2001) qui présentait de fortes homologues avec la protéine SWP1 précédemment mise en évidence chez *E. cuniculi* (Bohne *et al.*, 2000).

Nous avons dans un premier temps utilisé les Mabs 1E4 et 11B2 en IFA et en Western blot sur des profils protéiques de cellules infestées par chacune des trois espèces du genre *Encephalitozoon*. En IFA, un marquage de la paroi est confirmé pour les 3 espèces (Fig. 61A-C). L'anticorps 1E4 réagit avec une bande de 40 kDa d'*E. intestinalis* ce qui correspond à la taille attendue pour EiSWP1 (Fig. 61D, piste 3). Une réaction croisée est observée avec une bande d'environ 50 kDa chez *E. cuniculi*, taille prédite pour EcSWP1. Deux autres bandes d'*E. cuniculi* de plus petite taille (40 et 42 kDa) sont également marquées (Fig. 61D, piste 2). Sur les extraits protéiques de cellules infestées par *E. hellem*, deux bandes majeures de 55 et 60 kDa sont reconnues confirmant que des protéines de type SWP1 existent chez *E. hellem* (Fig. 61D, piste 4).

La stratégie utilisée pour identifier le(s) gène(s) *Ehswp1* est basée sur des amplifications PCR successives (Fig. 62). Dans une première étape, deux peptides conservés (KNYEDQY et KQMAVFQ) déduits de l'alignement entre les protéines SWP1 d'*E. cuniculi* et d'*E. intestinalis* ont été choisis pour dessiner des amorces dégénérées : un fragment de 400 pb a

Protéine	Taille (nombre d'aa)		pI	% en aa					Nb de résidus cystéine	Nb de sites potentiels de glycosylation	
	Précurseur	Protéine Mature		S	G	A	T	E		O-Glyc	N-Glyc
EcSWP1	450	432	5,2	<u>18,9</u>	14,1	6,5	7,6	3,9	11	41	0
EiSWP1	388	370	5	<u>14</u>	6,2	8,6	8,9	5,6	10	19	1
EiSWP2	1002	984	4	5	17,2	3	7,8	<u>25</u>	10	3	1
EhSWP1a	509	491	4,6	8,9	6,3	10,1	<u>11</u>	10,6	12	2	3
EhSWP1b	533	515	4,9	8,9	6,0	9,3	9,9	<u>10,3</u>	12	1	3

Tableau 19. Principales caractéristiques des protéines SWPs identifiées au sein du genre *Encephalitozoon*. Les protéines matures correspondent à celles obtenues après clivage du peptide signal prédit de 18 aa. Le pI, la richesse en aa ainsi que le nombre de sites potentiels de O- et N-glycosylation ont été déterminés à partir de la séquence des protéines matures. Pour chaque protéine, l'aa majoritaire est souligné. Les numéros d'accension des séquences en aa de EcSWP1, EiSWP1 et EiSWP2 sont les suivants : NP_586283, AAL27283 et AAL27282. Ec : *E. cuniculi*, Ei : *E. intestinalis* et Eh : *E. hellem*. Nb : nombre.

	▼		
EhSWP1a	MLKLSLLLGLANFTAILAGGERRRSGLLQCSAN GS RYFREQNLLGIKYKDDVKRLCGERP	60	
EhSWP1b	MLKLSLLLGLANFTAILAGGERRRSGLLQCSAN GS RYFREQNLLGIKYKDDVKRLCGERP	60	
	*		*
EhSWP1a	EGPHPSESSSCSSSCSEECGRRRFPGIRDCEYSSWDACSSSWDECTDSTPCTTPTPLR	120	
EhSWP1b	EGPHPSESSSCSSSCSEECGRRRFPGIRDCEYSSWDACSSSWDECTDSTPCTTPTPLR	120	
	* * * * *		* * * * *
EhSWP1a	CDAELRVPIINMGRIYEFLNKYEDQYESAVTLALNNILSQVSGFNPIFAGADYAALVEQ	180	
EhSWP1b	CDAELRVPIINMGRIYEFLNKYEDQYESAVTLALNNILSQVSGFNPIFAGADYAALVEQ	180	
	*		
EhSWP1a	LETLGVNVPANTAAELASIDSSESAALSRIIQNAQKIIISDLFARVGSVCYSIDITSLINS	240	
EhSWP1b	LETLGVNVPANTAAELASIDSSESAALSRIIQNAQKIIISDLFARVGSVCYSIDITSLINS	240	
	*		
EhSWP1a	GLFASQISSAFSNTQPVITIASNDLYAKQMAVQRIIPGTLPAAAVTAITNALQTRNNFA	300	
EhSWP1b	GLFASQISSAFSNTQPVITIASNDLYAKQMAVQRIIPGTLPAAAVTAITNALQTRNNFA	300	
EhSWP1a	TFFTTQATTLQTNVQNILTALTTLT NST STEF	360	
EhSWP1b	TFFTTQATTLQTNVQNILTALTTLT NST STEF	360	
EhSWP1a	NNSGSTGGDDTGDEGDGGEETPEEEEGD-----EEEE	394	
EhSWP1b	NNSGSTGGDDTGDEGDGGEETPEEEEGD-----EEEE	420	
EhSWP1a	DPVTALLNTIKEEGEKLGAAMEEVMTAIKEQGTTOGAEAVQEMMDAVKNEADTKKTETV	454	
EhSWP1b	<u>AIL</u> TALLNTIKEEGEKLGAAMKEVMDAVKSEADTKKTETVEDILNKVKDEVDTKKTETV	480	
	1		
EhSWP1a	DEILSKVKDEADTKKTETVTEIMDKVKTEADTKKTDVTEIMEKAKETWEAGKSS	509	
EhSWP1b	TEIMGKVKTEADGKKADTVTEIMNEVKTEGETEVDKIVKEFIEEAKTAYEEKE--	533	
	2	3	

Figure 63. Alignement des séquences en acides aminés de EhSWP1a et EhSWP1b. Le nombre d'aa est indiqué à droite. La flèche indique le site potentiel de clivage du peptide signal. Les résidus identiques sont grisés. Les 12 cystéines en positions conservées sont indiquées par des astérisques. Les trois sites de N-glycosylation prédits sont en gras. La séquence soulignée correspond à la région d'insertion/délétion. Des anticorps ont été produits contre cette région spécifique de EhSWP1b de manière à différencier les deux protéines. Les répétitions dégénérées dans la partie C-terminale sont encadrées et numérotées.

ainsi été amplifié. L'amplification d'un fragment de 470 pb correspondant à la partie 5' manquante a été réalisée en utilisant une amorce (SWD2) spécifique d'une partie 5' conservée déduite de l'alignement entre les régions en amont des codons d'initiation de la traduction de EcSWP1 et EiSWP1. En revanche, aucune séquence conservée n'est retrouvée au niveau de la région 3' en aval du codon stop. C'est pourquoi, cette région 3' a été recherchée par RT-PCR à partir d'ARN extraits de cellules infestées par *E. hellem* en utilisant un oligo-dT (**Fig. 62**). De façon surprenante, deux amplifiats de 900 et 1000 pb ont été obtenus. Le séquençage de ces produits révèle qu'il s'agit de 2 séquences présentant à la fois de fortes homologies entre elles et avec les protéines SWP1. Ces séquences nous ont également donné des informations sur les régions 3'UTR riches en A/T ayant des longueurs de 143 et 159 nucléotides. La queue polyA commence 8 nt en aval d'un signal potentiel de polyadénylation (AATAAA) retrouvé dans chaque séquence.

Les deux séquences entières ont été amplifiées avec un oligonucléotide commun situé au niveau de l'ATG (EhD2) couplé à une amorce spécifique de chaque séquence (EhR2 et EhR3). Après séquençage, les deux variants identifiés ont été appelés *Ehswp1a* et *Ehswp1b*. Ils présentent respectivement des régions codantes de 1530 pb et 1602 pb (**Fig. 62**). L'ensemble de ces résultats montre que deux gènes de type *swp1* existent chez *E. hellem*.

III.2. Principales caractéristiques des protéines SWP1s d'*E. hellem*

Ehswp1a et *Ehswp1b* codent respectivement pour des protéines de 509 aa et 533 aa. Après clivage du peptide signal prédit entre les positions A18 et G19, la protéine EhSWP1a mature a une masse moléculaire de 53 016 Da et un pI acide (4,6). La protéine EhSWP1b mature de 515 résidus a une masse moléculaire calculée de 56 023 Da et un pI de 4,9. Les protéines EhSWP1a et EhSWP1b contiennent trois aa majoritaires : thréonine, glutamate et alanine (**Tableau 19**). La comparaison des séquences totales des protéines EhSWP1a et

EiSWP1	MIKLSLLSLASFTAVLANQRPR---CQRCPVSSSKYFQQNNLLGSRFQNEVQRLCARRV	57
EiSWP2	MIKLSLLSLASFTAVLANQRPR---CQRCPVSSSKYFQQNNLLGSRFQNEVQRLCARRV	57
EcSWP1	MMKLSLLGLVFSFSAVLASENRRGN-CQMCPEG-TRYFEKNNLLGRRFKNDVRKLCGDGM	58
EhSWP1a	MLKLSLLGLANFTAILAGGERRRSGLLQCSAN NGSR YFREQNLLGIKYKDDVKRLCGERP	60
EhSWP1b	MLKLSLLGLANFTAILAGGERRRSGLLQCSAN NGSR YFREQNLLGIKYKDDVKRLCGERP	60
	* * *	
EiSWP1	REESS ESSSS SSSE-DCSRRRRRPHREWEDSCSSSYSSCS-----STDSCSSSAPCPPP	111
EiSWP2	REESS ESSSS SSSE-DCSRRRRRPHREWEDSCSSSYSSCS-----STDSCSSSAPCPPP	111
EcSWP1	SSDVHDESSSHSSSSSDCKPRRRRHRRYEDSCSFGSSDCDDSSSTYSSCVS SECS PPCRP	118
EhSWP1a	EGPHP ESSSS CSSSCSEECGRRRFPGRIRDDCEYSSWDACSS-----SWDECTDSTPCTTP	116
EhSWP1b	EGPHP ESSSS CSSSCSEECGRRRFPGRIRDDCEYSSWDACSS-----SWDECTDSTPCTTP	116
	* * *	
EiSWP1	VAQRCDIELKTPILMGERIYEFLKNYEDQYKAVLLFLTNILSQISGFNPFVPPGGYDA	171
EiSWP2	VAQRCDIELKTPILMGERIYEFLKNYEDQYKAVLLFLTNILSQISGFNPFVPPGGYDA	171
EcSWP1	VPLNCDYELKTPINMGERIYEFLKNYEDQYKAVLFLTRILSDYIDGFAPSYPSADYEP	178
EhSWP1a	TPLRCDALRVPINMGERIYEFLKNYEDQYESAVTLALNNILSQVSGFNPIIFAGADYAA	176
EhSWP1b	TPLRCDALRVPINMGERIYEFLKNYEDQYESAVTLALNNILSQVSGFNPIIFAGADYAA	176
	* * *	
EiSWP1	LIEQLKTLGVTVPANTAAELAIDAESSALTRAIQANAQKVISDLLTRVSAMCYLDIMS	231
EiSWP2	LIEQLKTLGVTVPANTAAELAIDAESSALTRAIQANAQKVISDLLTRVSAMCYLDIMS	231
EcSWP1	LIEQLKTLGVTVPANMAADLAALDAEATSLAGTIRANAQKVIQDLARVNTMCYLDLMS	238
EhSWP1a	LVEQLETLGVNVPANTAAELASIDSSESAALSRIIQGNQAKIISDLFARVGS MCYSDITS	236
EhSWP1b	LVEQLETLGVNVPANTAAELASIDSSESAALSRIIQGNQAKIISDLFARVGS MCYSDITS	236
	* * *	
EiSWP1	LVNSGILLASQVSSVFNNIQPIITITGNDLFAKQMAVFQKIPGTLPSAAITAITNALQ GNR	291
EiSWP2	LVNSGILLASQVSSVFNNIQPIITITAGNDLFAKQMAVFQKLS---KTLISTAVITNALQ GNR	288
EcSWP1	LVTSGLFASQVTSAFSNTQPIITITAGNDLFTKQMAVFQRLPGTLPSAAITAITNALQ ANK	298
EhSWP1a	LINSGLFASQISSAFSNTQPVIITIASNDLYAKQMAVFQRIIPGTLPAAAVTAITNALQ TNR	296
EhSWP1b	LINSGLFASQISSAFSNTQPVIITIASNDLYAKQMAVFQRIIPGTLPAAAVTAITNALQ TNR	296
	* * *	
EiSWP1	TNFVTF FFTTQTSNLQTSVQNSLTTLISELEKLATDTEFTAFAFANAETISALISRIFFTST	351
EiSWP2	AKFTR FY TTQTSNLQTSVQNS SK TLTSELKKLATDTEFTAFAFANAETSTPVRRIFRRSI	348
EcSWP1	NNFVTF FF TTQTTNLQTDVQNALTALITALTTLTSTTSTEFQFANSEIGALTGRIFGSSG	358
EhSWP1a	NNFAT FF TTQATTLQTNVQNILTALTALTTLT NSTS TEFTTFANSEIAAALARI FPATT	356
EhSWP1b	NNFAT FF TTQATTLQTNVQNILTALTALTTLT NSTS TEFTTFANSEIAAALARI FPATT	356
	* * *	
EiSWP1	TSSG-(33 aa)	388
EiSWP2	TSSG-(650 aa)	1002
EcSWP1	SGSG-(88 aa)	450
EhSWP1a	ASGD-(149 aa)	509
EhSWP1b	ASGD-(173 aa)	533

Figure 64. Alignement des domaines N-terminaux conservés des protéines SWPs identifiées chez les trois espèces du genre *Encephalitozoon*. La position des aa est indiquée à droite. Les 5 cystéines en positions conservées sont indiquées par des astérisques. Les aa grisés correspondent aux résidus identiques. Les deux peptides utilisés pour déterminés des amorces dégénérés sont soulignés. Le nombre d'aa entre parenthèse indique la taille du domaine C-terminal non aligné car trop divergent. Les sites potentiels de N-glycosylation sont soulignés et en gras. Ec : *E. cuniculi*, Ei : *E. intestinalis* et Eh : *E. hellem*. Les séquences des protéines EcSWP1 (ECU10_1660), EiSWP1 et EiSWP2 ont été obtenues à partir des numéros d'accèsion suivants : NP_586283, AAL27283 et AAL27282.

EhSWP1b montre 84,9% d'identité. Deux régions peuvent être distinguées : une région N-terminale conservée de 382 aa (100% d'identité en aa et en nt) et des parties C-terminales divergentes présentant seulement 54,7% d'identité (**Fig. 63**). Les extensions C-terminales sont riches en aa chargés (43,3% et 45%) et comprennent notamment trois répétitions dégénérées riches en K et E. La plus grande différence entre les deux protéines se situe au niveau d'une insertion de 26 résidus présente dans la partie C-terminale de EhSWP1b. L'alignement de ces séquences avec celles d'*E. cuniculi* et *E. intestinalis* montre que toutes les protéines de type SWP1 (EcSWP1, EiSWP1, EiSWP2, EhSWP1a, EhSWP1b) sont caractérisées par deux régions distinctes: une région N-terminale de 360 résidus (60% d'identité) et une extension C-terminale qui est variable à la fois en longueur et en composition en aa. Chez *E. hellem*, cette région est de 149 aa pour EhSWP1a et de 173 aa pour EhSWP1b (**Fig. 64**). Le pI des protéines EhSWP1a et EhSWP1b (4,5 et 5,2) est proche de ceux de EcSWP1 (5,2), EiSWP1 (5) et EiSWP2 (4). Cinq des 12 résidus cystéines présents chez EhSWP1a et EhSWP1b sont situés dans la région N-terminale en des positions conservées avec EcSWP1 et EiSWP1 ce qui suggère un rôle important de ces résidus dans l'établissement de ponts disulfure. L'algorithme NetN prédit 3 sites potentiels de N-glycosylation (NGSR, NSTS, NNSG) aux positions 15, 314 et 343 pour les deux protéines d'*E. hellem* alors qu'aucun n'est prédit pour EcSWP1 et un seul est présent pour les protéines EiSWP1 et EiSWP2 (**Fig. 64**). Au contraire des protéines EcSWP1 et EiSWP1 qui contiennent respectivement 41 et 19 sites potentiels de O-glycosylation, seuls deux sites sont prédits pour EhSWP1a (353 et 365) et un seul pour EhSWP1b (**Tableau 19**).

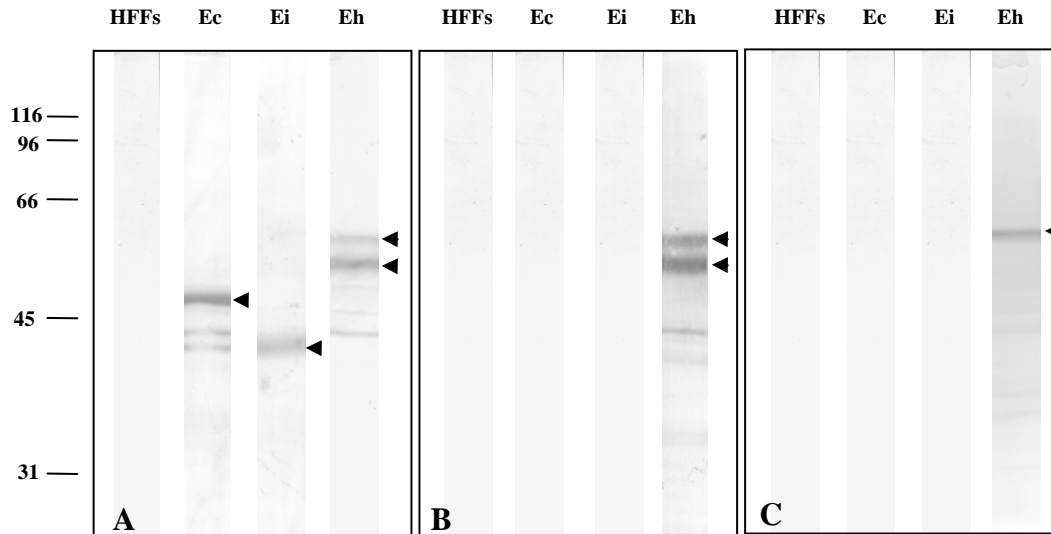


Figure 65. Détection des protéines de type SWP1 sur des Western blot de cellules HFF infestées par *E. cuniculi* (Ec), *E. intestinalis* (Ei) et *E. hellem* (Eh) à l'aide des anticorps polyclonaux anti-EhSWP1-N (A), anti-EhSWP1a-C (B) et anti-EhSWP1b-C (C). Seuls les anticorps anti-EhSWP1-N donnent une réaction croisée avec EcSWP1 et EiSWP1. Une bande de 50 kDa est reconnue pour *E. cuniculi*. Pour *E. intestinalis*, une bande de 40 kDa est reconnue. Deux bandes de 55 et 60 kDa sont identifiées pour *E. hellem*. Les anticorps anti-EhSWP1-N donnent le même type de marquage que l'anticorps monoclonal Mab1E4 (A). Les anticorps dirigés contre EhSWP1b-C reconnaissent uniquement la bande à 60 kDa (C). HFFs : HFF saines. Ec : HFF infestées par *E. cuniculi*. Ei : HFF infestées par *E. intestinalis*. Eh : HFF infestées par *E. hellem*. Les extraits protéiques ont été préparés en présence de DTT 100 mM. Les flèches indiquent les protéines SWP1 reconnues par les différents sera. Les masses moléculaires sont indiquées en kDa (Biorad). Les anticorps primaires sont testés au 1/500, les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline sont utilisés au 1/10000 (Promega).

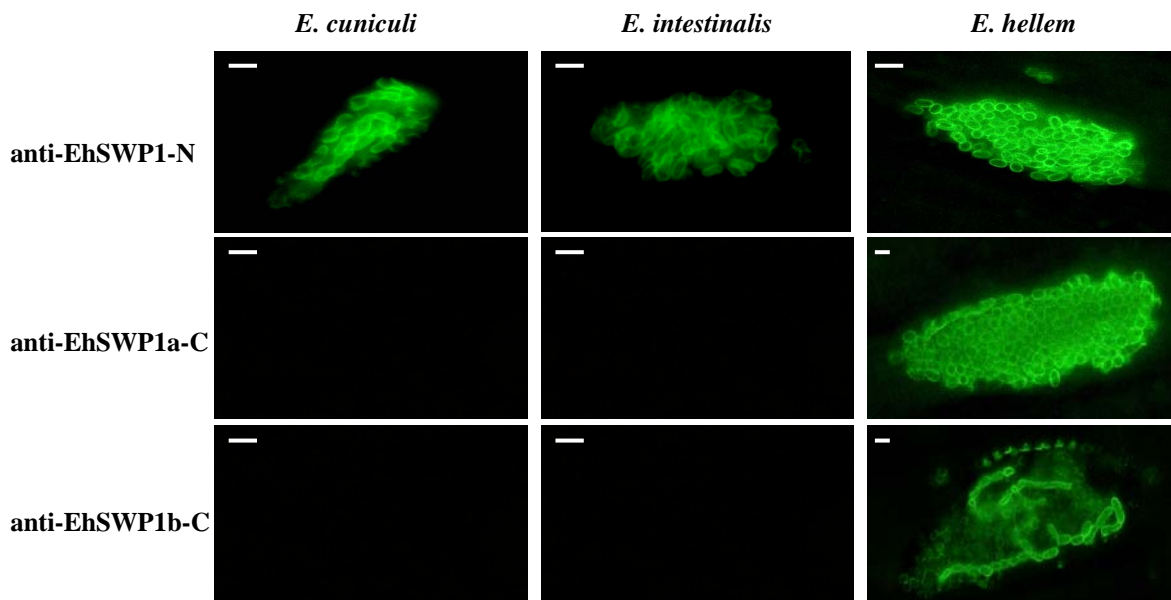


Figure 66. Les anticorps dirigés contre les protéines recombinantes donnent un marquage pariétal en IFA. Les anticorps polyclonaux ont été appliqués à des cellules infestées par *E. cuniculi*, *E. intestinalis* et *E. hellem* (dilution 1/100). Les anticorps dirigés contre la partie N-terminale conservée réagissent avec la paroi sporale des trois espèces du genre *Encephalitozoon*. Les sérums dirigés contre les parties C-terminales spécifiques ne marquent que la paroi d'*E. hellem*. Echelle : 1 μ m. Les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés Alexa Fluor 488 sont utilisés au 1/1000.

III.3. Immunolocalisation des protéines SWP1s

III.3.1. Expression de protéines recombinantes chez *E. coli* et production d'anticorps

Afin de mieux caractériser les antigènes EhSWP1a et EhSWP1b, l'expression de trois protéines recombinantes a été réalisée chez *E. coli* : une correspondant à la région N-terminale conservée (EhSWP1-N, aa 20 à 334), une seconde correspondant à la partie C-terminale spécifique de EhSWP1a (EhSWP1a-C, aa 358 à 509) et une troisième comprenant l'insertion de 26 aa spécifique de EhSWP1b (EhSWP1b-C, aa 388 à 423, **Fig. 63**).

L'anticorps 1E4 réagit avec la protéine recombinante EhSWP1-N alors que celles correspondant aux parties C-terminales ne sont pas reconnues (non montré). L'épitope reconnu par cet anticorps est donc situé dans la partie N-terminale conservée entre les protéines SWPs, ce qui est en accord avec les marquages de paroi observés chez les trois espèces du genre *Encephalitozoon*. Les trois protéines recombinantes ont été purifiées sur colonne Ni-NTA puis injectées à des souris pour produire des anticorps spécifiques.

III.3.2. EhSWP1a et EhSWP1b sont solubles en présence de DTT

Les anticorps dirigés contre les protéines recombinantes EhSWP1-N et EhSWP1a-C reconnaissent deux bandes majeures de 55 et 60 kDa sur des extraits protéiques de cellules HFF infestées par *E. hellem* (**Fig. 65A et B**). Ce marquage est identique à celui précédemment obtenu avec l'anticorps monoclonal 1E4 (**Fig. 65D**). Les anticorps dirigés contre l'insertion de 26 résidus (anti-EhSWP1b-C) réagissent seulement avec la bande protéique de 60 kDa (**Fig. 65C**) indiquant que cette bande protéique correspond à la protéine EhSWP1b alors que la bande à 55 kDa non reconnue par ce sérum correspond à EhSWP1a. Il est à souligner que les anticorps anti-EhSWP1a-C sont dirigés contre les 151 derniers résidus de EhSWP1a, séquence qui présente 54,2% d'identité avec EhSWP1b. Il n'est donc pas étonnant que ces

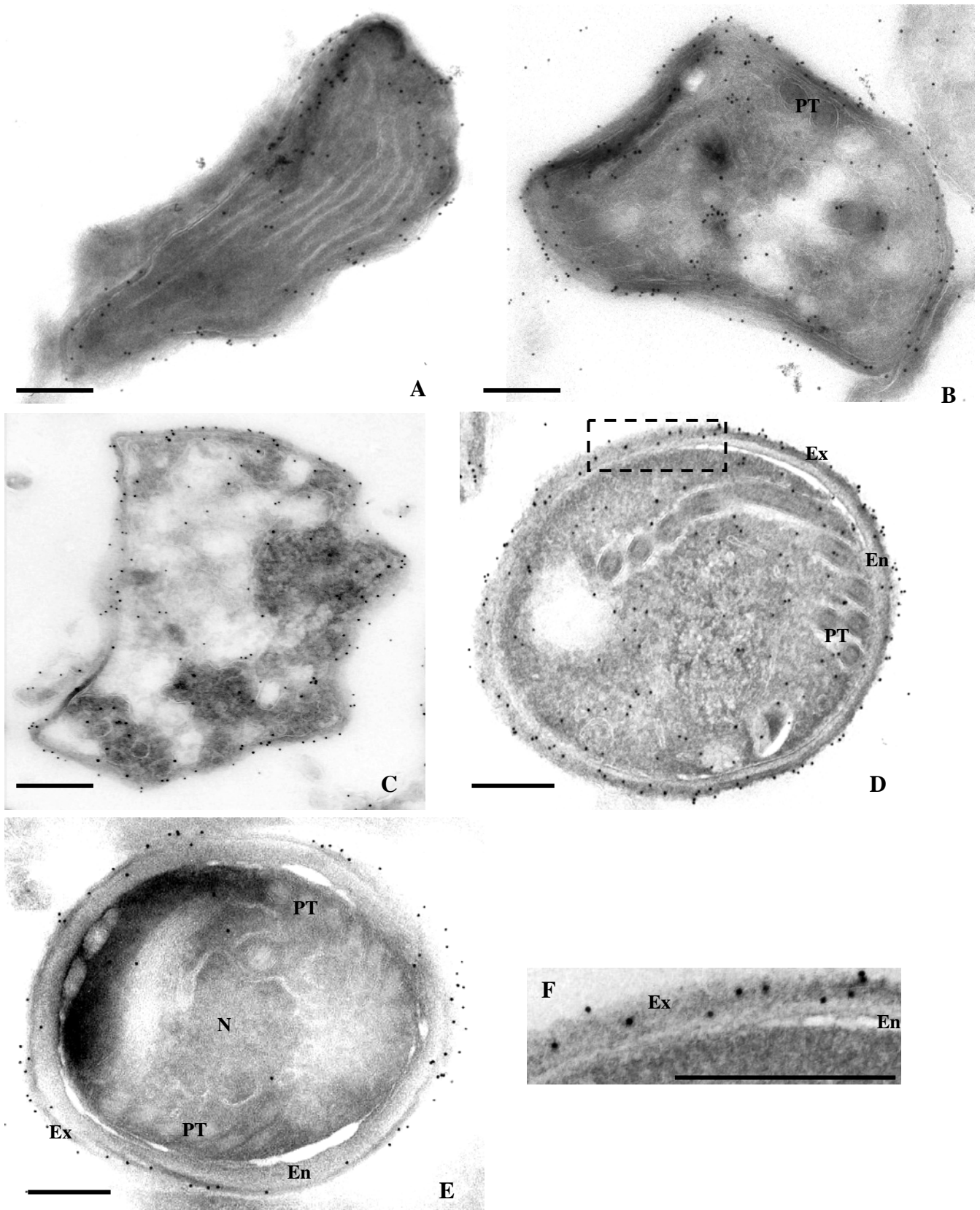


Figure 67. EhSWP1a et EhSWP1b sont localisées au niveau de l'exospore. Les anticorps anti-EhSWP1b-C réagissent avec l'exospore de différents stades de développement d'*E. hellem*. Au niveau des sporontes (A-C), un fort marquage est observé à la périphérie. Pour les spores matures (D et E), les anticorps réagissent avec la paroi au niveau de la couche externe dense aux électrons appelée exospore. Les anticorps anti-EhSWP1b-C ont été dilués au 1/50. Les anticorps secondaire anti-IgG de souris couplés billes d'or (10 nm) sont utilisés au 1/100. F correspond à un agrandissement d'une partie de l'image D. Echelle : 200 nm. Ex : exospore, En : endospore, TP : tube polaire. Un marquage identique est obtenu avec les anticorps anti-EhSWP1a-C et anti-EhSWP1-N.

anticorps réagissent avec les deux protéines EhSWP1a et EhSWP1b. Lorsque les protéines sont extraites en absence d'agent réducteur, aucune bande n'est détectée (non montré).

Les trois anticorps ont également été appliqués à des lysats de cellules HFF infestées par *E. cuniculi* ou *E. intestinalis*. Comme attendu, le sérum dirigé contre la partie N-terminale conservée réagit avec SWP1 d'*E. cuniculi* (50 kDa) et d'*E. intestinalis* (40 kDa, **Fig. 65A**). A l'inverse, les anticorps dirigés contre les parties C-terminales spécifiques ne donnent aucune réaction croisée avec *E. cuniculi* et *E. intestinalis* (**Fig. 65B et 65C**).

III.3.3. EhSWP1a et EhSWP1b sont localisées au niveau de l'exospore

En IFA, un marquage de la paroi des spores d'*E. hellem* est obtenu avec les anticorps produits contre les 3 protéines recombinantes (**Fig. 66**). Sur des cellules HFF infestées par *E. hellem*, une réactivité de l'ensemble des stades présents dans la vacuole parasitophore est observée dès 24h post-infestation suggérant une mise en place précoce de la paroi (non montré). Les anticorps spécifiques de EhSWP1b-C donnent uniquement un marquage de la surface des stades jeunes localisés en périphérie de la vacuole (**Fig. 66**). Ces résultats suggèrent une expression différente des deux protéines ou une perte de l'accessibilité de l'épitope reconnu par les anticorps anti-EhSWP1b-C lors de la mise en place de la paroi. Seuls les anticorps dirigés contre la partie N-terminale conservée montrent une réaction croisée avec la paroi des 2 autres espèces du genre *Encephalitozoon* (**Fig. 66**).

Une immunolocalisation en microscopie électronique sur des cryocoupes de cellules HFF infestées par *E. hellem* a été réalisée pour préciser la localisation des protéines EhSWP1a et EhSWP1b au niveau de la paroi sporale. Aucune différence de marquage n'est observée entre les deux anticorps ce qui suggère que l'épitope reconnu par les anticorps anti-EhSWP1b-C n'est pas accessible en IFA dans des stades de développement plus avancés. Dans les stades assimilés à des mérontes, les deux protéines sont localisées dans le

A.		
V242	TTASGDNNSGSGTGGDDTGDEGDGEGGEEETPEEEEGDEEEEDPVTALLNTIKEEGEKLGA	414
V257	TTASGDNNSGSGTGGDDTGDEGDGEGGEEETPEEEEGDEEEEDPVTALLNTIKEEGEKLGA	414
EhD	TTASGDNNSGSGTGGDDTGDEGDGEGGEEETPEEEEGDEEEEDPVTALLNTIKEEGEKLGA	414
V213	TTASGDNNSGSGTGGDDTGGE---GEEEDGGGEEESPEEEEDLLTALLNTIKEEGEKLGA	411
V242	AMEEVMTAIKEQGTQGAEAQEMMDAVKNEADTKKTETVDEILSKVKDEADTKKTETVT	474
V257	AMEEVMTAIKEQGTQGAEAQEMMDAVKNEADTKKTETVDEILSKVKDEADTKKTETVT	474
EhD	AMEEVMTAIKEQGTQGAEAQEMMDAVKNEADTKKTETVDEILSKVKDEADTKKTETVT	474
V213	AMEEVMTAIKEQGTAQGTEAVEEVMKAVKNEADTKKTETAQEI MDAVKNEVDTKKTETAQ	471
V242	EIMDKVKTEADTKKTDTVTEIMEKAKETWEAGKSS	509
V257	EIMDKVKTEADTKKTDTVTEIMEKAKETWEAGKSS	509
EhD	EIMDKVKTEADTKKTDTVTEIMEKAKETWEAGKSS	509
V213	EIMDAVKTEAEGKKTETVTEIMNKAKETWAGKSG	506
B.		
V242	TTASGDNNSGSGTGGDDTGDEGD--GEEEEESPEEEEEESRKQRSIQPKKGLRNKRQTLPV	412
V257	TTASGDNNSGSGTGGDDTGDEGD--GEEEEESPEEEEEESRKQRSIQPKKGLRNKRQTLPV	412
EhD	TTASGDNNSGSGTGGDDTGDEGD--GEEEEESPEEEEEESRKQRSIQPKKGLRNKRQTLPV	412
V213	TTASGDNNSGSGTGGDDTGDEGEEEDGEEEEESPEEEEEESRKQRSIQPKKGLRNKRQTLPV	414
V242	YPDRESPKAILTALLNTIKEEGEKLGAAMKEVMDAVKSEADTKKTETVEDILNKVKDEV	472
V257	YPDRESPKAILTALLNTIKEEGEKLGAAMKEVMDAVKSEADTKKTETVEDILNKVKDEV	472
EhD	YPDRESPKAILTALLNTIKEEGEKLGAAMKEVMDAVKSEADTKKTETVEDILNKVKDEV	472
V213	YPDRESPKAILTALLNTIKEEGEKLGAAMKEVMDAVKSEADTKKTETVEDILNKVKDEV	474
V242	DTKKTETVTEIMDKVKTEADGKKADTVTEIMNEVKTEGETEVDKIVKEFIEEAKTAYEEK	532
V257	DTKKTETVTEIMDKVKTEADGKKADTVTEIMNEVKTEGETEVDKIVKEFIEEAKTAYEEK	532
EhD	DTKKTETVTEIMDKVKTEADGKKADTVTEIMNEVKTEGETEVDKIVKEFIEEAKTAYEEK	532
V213	DTKKTETVTEIMDKVKTEADGKKADTVTEIMNEVKTEGETEVDKIVKEFIEEAKTAYEEK	534
V242	E	533
V257	E	533
EhD	E	533
V213	E	535

Figure 68. Les extrémités C-terminales de EhSWP1a et EhSWP1b présentent une variabilité inter-isolat. Alignement de la séquence en aa déduite après séquençage des régions codant l'extrémité C-terminale de SWP1a (A) et SWP1b (B) pour les quatre isolats d'*E. hellem* étudiés. Les séquences des isolats V242 et V257 sont identiques à EhD. Les aa divergents pour l'isolat V213 sont grisés. L'insertion de 26 résidus présente dans EhSWP1b par rapport à EhSWP1a est soulignée. Le nombre d'aa est indiqué à droite.

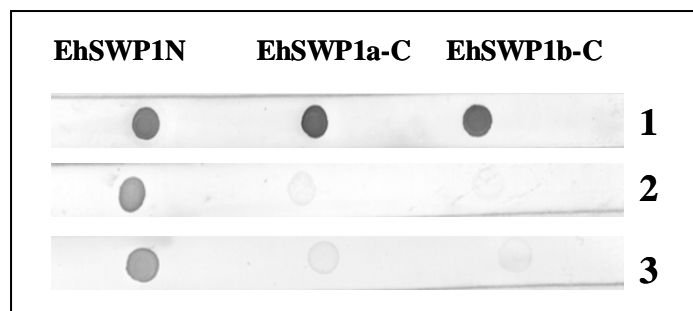


Figure 69. Les sera d'animaux infestés par *E. hellem* ne réagissent pas avec les protéines recombinantes spécifiques de l'extrémité C-terminale de EhSWP1a et EhSWP1b. Les protéines recombinantes EhSWP1-N, EhSWP1a-C et EhSWP1b-C ont été purifiées sur colonne Ni-NTA et déposées sur une membrane de PVDF. **1** : anti-histidine permettant de vérifier que les trois antigènes sont bien présents sur la membrane (dilution 1/500). **2 et 3** : sera de lapin (2) et de souris (3) infestés avec des spores d'*E. hellem* isolat EhDidier (dilution 1/500). Les anticorps secondaires anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline sont dilués au 1/10000.

cytoplasme suggérant une expression précoce de ces protéines. Dans les sporontes, un marquage est observé sur la périphérie des parasites traduisant les premiers dépôts de matériel pariétal (**Fig. 67A-C**). Un marquage cytoplasmique associé notamment au réticulum endoplasmique et correspondant à des protéines en cours de synthèse est également observé (**Fig. 67B-C**). Au cours de la maturation des parasites et de la formation de la paroi, le marquage à la surface des parasites augmente. Enfin, dans les spores matures, EhSWP1a et EhSWP1b sont retrouvés au niveau de l'exospore (**Fig. 67D-F**). Aucun marquage n'est en effet présent au niveau de l'endospore ou de la membrane plasmique.

III.4. Variabilité inter-isolat de la région C-terminale de EhSWP1a et EhSWP1b

Afin de déterminer si la séquence codant l'extrémité C-terminale des protéines EhSWP1a et EhSWP1b pouvait aussi être un bon outil de génotypage, le polymorphisme de cette région a été étudié par PCR et séquençage (**Fig. 68**). Trois nouveaux isolats humains d'*E. hellem* (V242, V257 et V213) ont ainsi été comparés à notre isolat de référence EhDidier. Les amorces utilisées pour cette étude sont représentées sur la figure x. Pour chaque isolat, deux produits PCR, d'environ 500 et 600 pb, sont obtenus traduisant la présence des deux gènes *swp1a* et *swp1b*. Des résultats similaires sont obtenus par RT-PCR indiquant que les deux gènes sont transcrits dans tous les isolats étudiés. L'analyse des séquences montre une divergence de l'isolat V213 alors que les isolats V242 et V257 sont identiques à EhDidier. Ainsi, la séquence SWP1a de l'isolat V213 présente un certain nombre de mutations ponctuelles à l'origine de nombreux changements en aa. Une délétion de 3 aa (GDG) est également mise en évidence (**Fig. 68A**). La séquence SWP1b est beaucoup plus conservée (96,7% d'identité) : seuls 4 aa sont variables entre V213 et les autres isolats (**Fig. 68B**). Malgré la divergence des séquences pour V213, aucune différence n'est visible en SDS-PAGE ou en Western blot (non montré).

Constructions	Taille des régions 5'(pb)	Gène rapporteur	Gène sélection	Taille des régions 3'(pb)	Sélection
p600-gfp	600	<i>gfp</i>	-	600	-
p1200-gfp	1200	<i>gfp</i>	-	600	-
p600(β -tub30aa)-gfp*	600+30 aa	<i>gfp</i>	-	600	-
p600- β tub-myc	600	<i>c-myc</i>	-	600	-
p1200- β tub-myc	1200	<i>c-myc</i>	-	600	-
pEnP1-myc	1200	<i>c-myc</i>	-	450	-
p600- β tubMut-myc	600	<i>c-myc</i>	<i>β-tubuline</i>	600	Albendazole
p600-TrpB-myc	600	<i>c-myc</i>	<i>trpB</i>	600	} Déplétion en tryptophane
p1200-TrpB-myc	1200	<i>c-myc</i>	<i>trpB</i>	600	
p600(β -tub30aa)-TrpB-myc*	600+30 aa	<i>c-myc</i>	<i>trpB</i>	600	
p600-MetAP1-myc	600	<i>c-myc</i>	<i>MetAP1</i>	600	} Fumagilline
p1200-MetAP1-myc	1200	<i>c-myc</i>	<i>MetAP1</i>	600	
p600(β -tub30aa)-MetAP1-myc*	600+30 aa	<i>c-myc</i>	<i>MetAP1</i>	600	

Tableau 20. Constructions plasmidiques réalisées pour les essais de transfection d'*E. cuniculi*. Les régions 5' amont de la β -tubuline testées sont de 600 pb ou 1200 pb pour les fusions transcriptionnelles. (*) Des fusions traductionnelles ont également été réalisées en introduisant, en plus de la séquence 5' amont non codante de 600 pb, la séquence codant les 30 premiers aa de la β -tubuline. Pour les transfections transitoires, nous avons utilisé comme gène rapporteur la GFP ou fusionné le gène de la β -tubuline d'*E. cuniculi* à l'épitope c-Myc. Dans le cas des essais de transfection stable, les gènes de sélection sont également fusionnés à l'épitope c-Myc. Pour chaque construction, la région 3' aval correspond aux 600 pb situées en aval du codon stop de la β -tubuline. Une autre construction a été testée, pEnP1-myc, qui présente une région de 1200 pb de la région 5' amont de EnP1 fusionnée à la séquence codante complète de *enp1*, elle-même fusionnée à l'épitope c-myc. La région 3' aval est constituée de 450 pb situées en aval du codon stop de *enp1*.

III.5. Utilisation des protéines SWP1s recombinantes pour des études de diagnostic sérologique

En IFA, des sera de lapins et de souris infestés expérimentalement par des spores d'*E. hellem* donnent une forte réaction contre la paroi et les tubes polaires dévaginés (non montré). Afin de montrer que les protéines SWP1s d'*E. hellem* pouvaient être de bons candidats utilisables en diagnostic sérologique, les différents sera ont été testés contre les trois antigènes recombinants produits chez *E. coli* : EhSWP1-N, EhSWP1a-C et EhSWP1b-C. Ces sera reconnaissent la protéine EhSWP1-N (**Fig. 69**). Cependant, aucune réaction n'est obtenue avec les deux antigènes spécifiques des parties C-terminales des protéines EhSWP1s (EhSWP1a-C et EhSWP1b-C).

IV. Essais de mise au point d'une technique de transfection d'*Encephalitozoon cuniculi*

L'une des principales technologies permettant une analyse fonctionnelle des gènes et de leurs produits est l'utilisation de la génétique inverse. Cependant, aucune technique de transfection des microsporidies n'a jusqu'alors été mise au point. Nous présenterons dans une première partie les constructions plasmidiques que nous avons réalisées et les stratégies envisagées pour développer une transfection stable. Enfin nous discuterons des essais de transfection et des résultats obtenus.

IV.1. Constructions réalisées pour des essais de transfection transitoire

L'étape préalable à la mise au point d'une technique de transfection est la réalisation de vecteurs plasmidiques qui doivent contenir :

- un gène rapporteur (ou un épitope) permettant de vérifier la fonctionnalité des constructions testées, l'efficacité de la transfection et/ou la localisation du transgène d'intérêt.

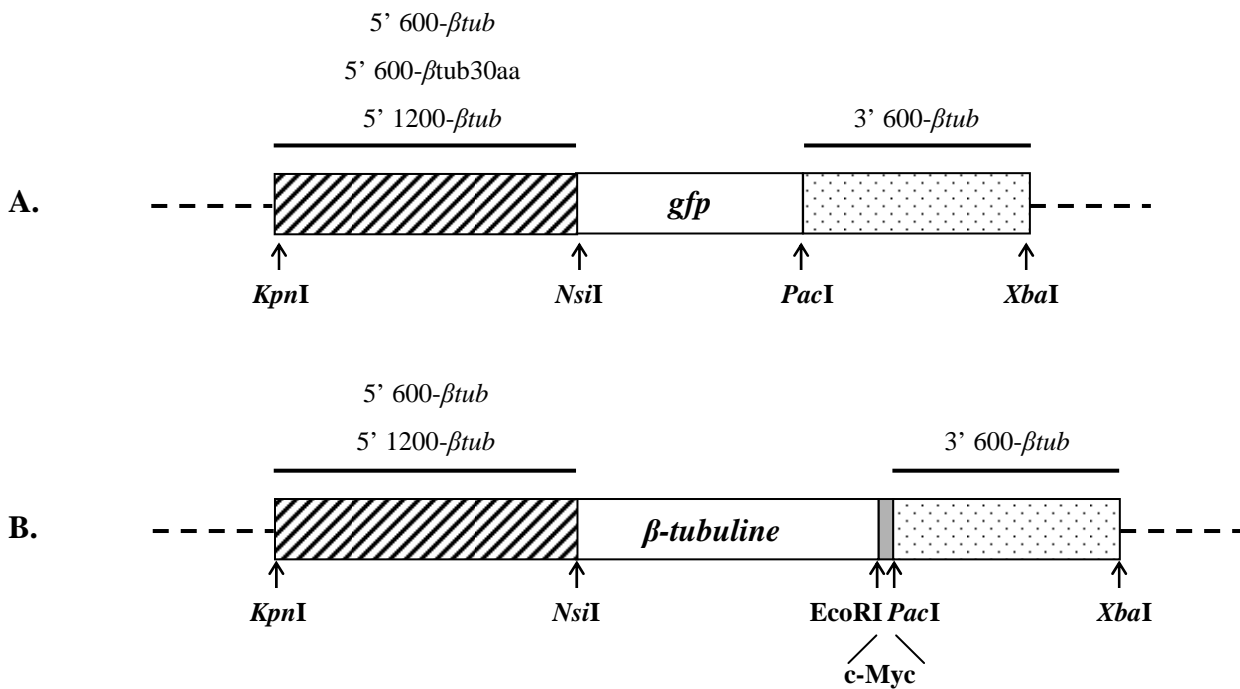


Figure 70. Représentation schématique des constructions réalisées pour la mise au point d'une transfection transitoire d'*E. cuniculi*. (A) Différentes régions 5' amont de la β -tubuline sont fusionnées au gène codant pour la GFP permettant une visualisation directe des transformants. (B) Le gène codant pour la β -tubuline est inséré à la place de la GFP. Les vecteurs utilisés sont dérivés du vecteur pTUB8-GFP utilisé pour la transfection de *T. gondii*. Les différents gènes rapporteurs ont été placés sous le contrôle d'une région 5' amont de la β -tubuline de taille variable (600 ou 1200 pb), cette région étant clonée entre les sites *KpnI* et *NsiI*. Des fusions traductionnelles ont été réalisées en utilisant la région 5' amont de la β -tubuline fusionnée à la séquence codant pour les 30 premiers aa de la β -tubuline. La région 3' aval contenant notamment les signaux de terminaison de la transcription est une région de 600 pb de la β -tubuline clonée entre les sites *PacI* et *XbaI*. L'épitope c-myc est introduit entre les sites *EcoRI* et *PacI* en phase avec la β -tubuline (B). Les gènes utilisés pour les transfusions stables seront introduits à la place de la β -tubuline gène rapporteur en amont de l'épitope c-myc entre les sites *NsiI* et *EcoRI*. Le numéro d'accèsion du gène codant pour la β -tubuline (ECU03_0820i) est : NM_001040955.

- des séquences de l'organisme à transformer permettant l'expression du gène rapporteur à savoir : (i) une région promotrice et les signaux d'initiation de la transcription et de la traduction qui seront placés en amont du gène rapporteur, (ii) les signaux d'arrêt de la transcription et de stabilisation des ARNm qui seront placés en aval du gène rapporteur.

Toutes les constructions que nous avons réalisées sont dérivées du plasmide pTUB8-GFP, vecteur utilisé pour la transfection de *Toxoplasma gondii* (**Fig. 70A et B, Tableau 20**). N'ayant pas de données précises sur les régions nécessaires et suffisantes à la transcription et à la traduction des gènes d'*E. cuniculi*, nous avons choisi de tester des régions de différentes tailles en amont du codon d'initiation de la traduction du gène de la β -tubuline. Deux régions de 600 et 1200 pb situées en amont de l'ATG du gène codant la β -tubuline ont ainsi été clonées entre les sites *KpnI* et *NsiI* en amont du gène *gfp* (**Fig. 70A, Tableau 20**). Deux types de constructions ont été réalisés : des fusions transcriptionnelles où seule la partie 5' en amont de l'ATG (600 pb ou 1200 pb) est fusionnée à la *gfp* et des fusions traductionnelles pour lesquelles la séquence codant les 30 premiers aa de la β -tubuline a été introduite en plus de la séquence 5' amont non codante de 600 pb. Cette séquence fusionnée à la *gfp* est appelée p600(β tub-30aa)-gfp (**Fig. 70A, Tableau 20**). D'autres fusions traductionnelles ont également été réalisées en clonant la séquence codante complète de la β -tubuline sous le contrôle des régions de 600 ou 1200 pb non pas en fusion avec la *gfp* mais avec un épitope c-Myc permettant de repérer les transformants potentiels (**Fig 70B, tableau 20**). Pour toutes les constructions réalisées, les 600 pb en aval du codon stop de la β -tubuline ont été clonées en aval du gène *gfp* ou de la séquence c-myc (**Fig. 70A et B**).

Une autre construction appelée pEnP1-myc a également été réalisée. Le gène *enp1* code pour une protéine localisée au niveau de la paroi sporale (ECU 01_0820, **XP_965917**). Nous avons montré au laboratoire que ce gène est fortement exprimé tout au long du cycle de développement (**Peuvel-Fanget et al., 2006**). La région promotrice de *enp1* pourrait donc

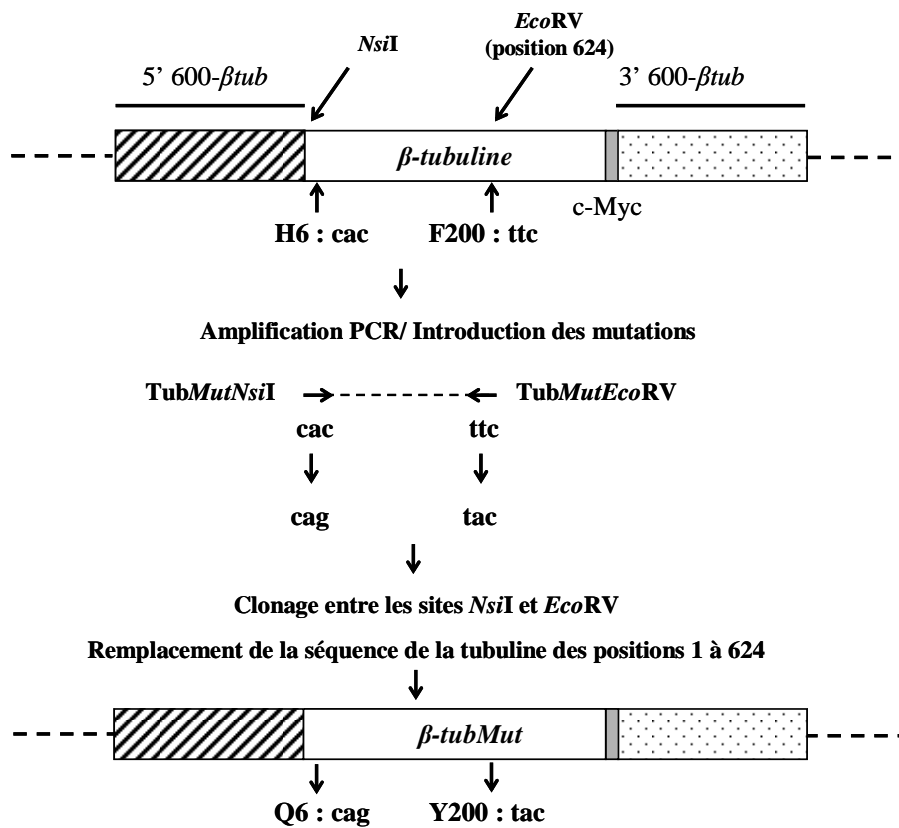


Figure 71. Représentation schématique de la stratégie utilisée pour créer une β -tubuline « résistante » à l'albendazole chez *E. cuniculi*. A partir de la construction p600- β tub-myc, une amplification PCR d'une partie de la β -tubuline a été réalisée en introduisant les deux mutations dans les amorces TubMutNsiI et TubMutEcoRV : cac (His) vers cag (Gln) dans l'amorce NsiI et ttc (Phe) vers tac (Tyr) dans l'amorce reverse EcoRV. La présence d'un site EcoRV en position 624 de la β -tubuline permet de remplacer seulement une partie de la séquence de la β -tubuline (position 1 à 624). Après digestion, la partie 5' sauvage de la β -tubuline est remplacée par la partie 5' mutante, les régions 5' amont et 3' aval étant inchangées. La construction est appelée p600- β tubMut-myc.

β Tub	MREI IHLQQTGQCGNQVGCKFWETISGEHGIDQTGRYVGTSDNQLERINVYYNEASSKKYV	60
β TubMut	MREI IQLQTGQCGNQVGCKFWETISGEHGIDQTGRYVGTSDNQLERINVYYNEASSKKYV	60
	*	
β Tub	PRAVLIDLEPGTMDAVRQGPFGELFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVMDVV	120
β TubMut	PRAVLIDLEPGTMDAVRQGPFGELFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVMDVV	120
β Tub	RKEAESSDCLQGFQITHSLGGGTGAGMGTLLLSKIREDFPDRMICTFSVVPSPKVS DTVV	180
β TubMut	RKEAESSDCLQGFQITHSLGGGTGAGMGTLLLSKIREDFPDRMICTFSVVPSPKVS DTVV	180
	* *	
β Tub	EPYNATLSIHQLVENADETF CIDNEALYDICFR TLKLNPNPGYGD LNHVSLVMSGVT TCL	240
β TubMut	EPYNATLSIHQLVENADETY CIDNEALYDICFR TLKLNPNPGYGD LNHVSLVMSGVT TCL	240
	* *	
β Tub	RFPGQLNADLRKLA VNMIPF PRLHFFVAGFAPLIAIGTQKFKTYSVSELTQQMFDSKNMM	300
β TubMut	RFPGQLNADLRKLA VNMIPF PRLHFFVAGFAPLIAIGTQKFKTYSVSELTQQMFDSKNMM	300
	*	
β Tub	TACDPRKG RYLTVAAMFRGKISMKD VDEQMSMVQSKNSSLFVEWIPSNVKTAVCDIAPT G	360
β TubMut	TACDPRKG RYLTVAAMFRGKISMKD VDEQMSMVQSKNSSLFVEWIPSNVKTAVCDIAPT G	360
β Tub	LEMSATFVGNTT SIQELFKRISDQFTVMFRRKAF LHWYTGE GMEMEFSEAESNMNDLLS	420
β TubMut	LEMSATFVGNTT SIQELFKRISDQFTVMFRRKAF LHWYTGE GMEMEFSEAESNMNDLLS	420
β Tub	EYQQYQDATIEDAE EFLVN	439
β TubMut	EYQQYQDATIEDAE EFLVF	439

Figure 72. Alignement entre la β -tubuline sauvage d'*E. cuniculi* et la β -tubuline « mutante » créer pour la résistance à l'albendazole. Les 6 aa impliqués dans la résistance aux benzimidazoles sont indiqués par des astérisques (H₆, C₁₆₅, F₁₆₇, E₁₉₈, F₂₀₀ et R₂₄₁). Les deux positions mutées (H₆ vers Q₆ et F₂₀₀ vers Y₂₀₀) sont surlignées en gris. La position des aa est indiquée à droite. Le numéro d'accension de la séquence protéique de la β -tubuline (ECU 03_0820i) est : NP_597591.

présenter des signaux promoteurs forts qui pourraient s'avérer intéressants pour la mise au point de la transfection chez *E. cuniculi*. Cette construction comporte une région 5' amont de *enp1*, constituée de 1200 pb situées en amont de l'ATG, de la séquence complète codant la protéine EnP1 qui est fusionnée à l'épitope c-myc. La région 3' aval correspond aux 450 pb en aval du codon stop du gène *enp1*.

IV.2. Stratégies utilisées pour la mise au point d'une transfection stable

La mise en place d'une transfection stable nécessite l'utilisation de gènes de résistance (sélection) à des drogues actives contre les cellules à transformer. Cependant, la plupart des gènes de sélections utilisés pour les eucaryotes libres ne sont pas utilisables en raison de leur toxicité envers la cellule hôte et de l'incapacité des parasites à se développer en dehors de ces cellules. Trois stratégies ont donc été envisagées : la création de « mutants résistants » à l'albendazole ou à la fumagilline, 2 molécules montrant une activité contre *E. cuniculi* et la complémentation à l'auxotrophie pour le tryptophane.

IV.2.1. Création d'une β -tubuline « résistante » à l'albendazole

Chez les champignons, l'activité benzimidazole est liée à 6 positions au niveau de β -tubuline. Afin de créer une « β -tubuline mutante » potentiellement résistante à l'albendazole, deux mutations ont été introduites par PCR dans la séquence codant la β -tubuline d'*E. cuniculi*. Ces deux mutations permettent de remplacer les résidus His6 par une Glutamine (Q) et Phe200 par une Tyrosine (Y). Le gène de la β -tubuline ainsi muté a été introduit entre les sites *NsiI* et *EcoRV* dans la construction p600- β tub-myc utilisée pour la transfection transitoire et décrite précédemment (**Fig. 71**). Un site *EcoRV* étant présent en position 624, seule une partie de la séquence codant la β -tubuline a été remplacée (**Fig. 71**). Le criblage des

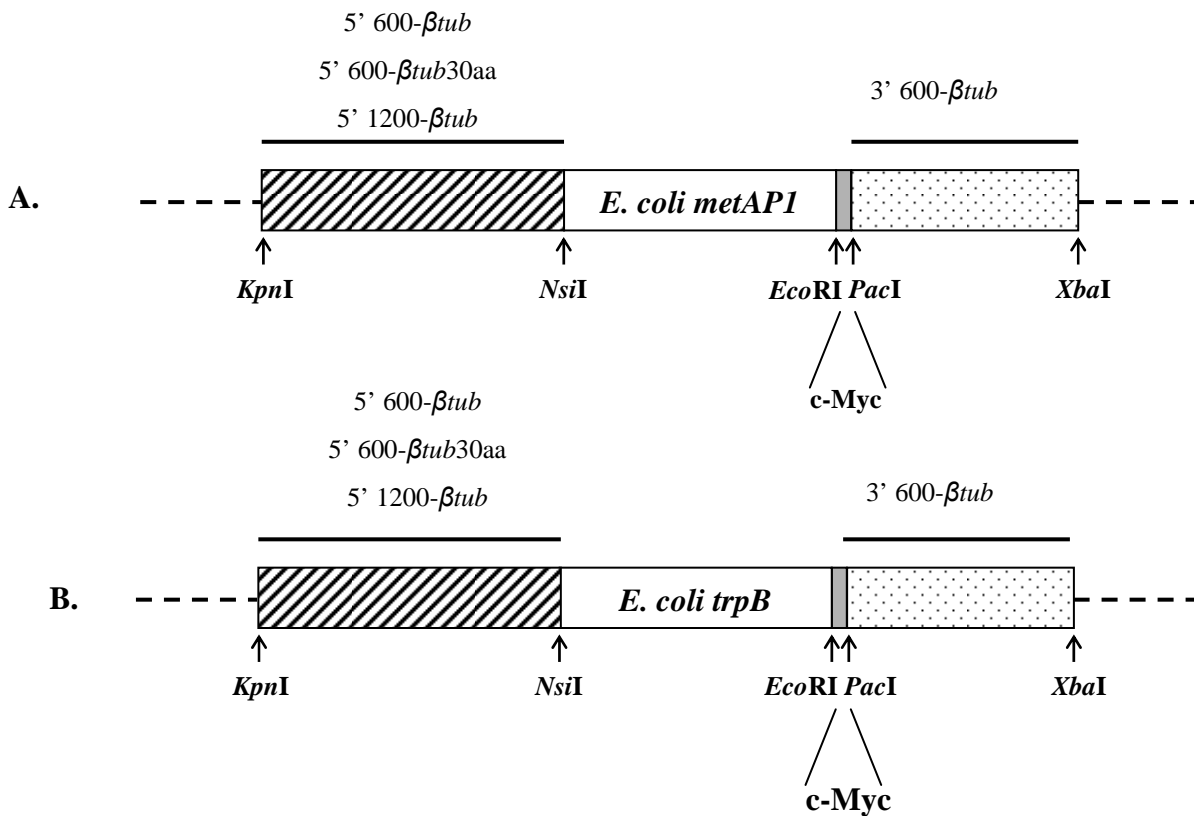


Figure 73. Représentation schématique des constructions utilisées pour les stratégies de transfection stable. (A) Stratégie de résistance à la fumagilline par complémentation à l'aide du gène codant la Méthionine Aminopeptidase de type I (MetAP1) d'*E. coli*. (B) Stratégie de complémentation de l'auxotrophie au tryptophane à l'aide du gène codant la tryptophane synthase β (TrpB) d'*E. coli*. Les gènes codant pour la MetAP1 et la TrpB sont introduits en aval des régions 5' amont de la β -tubuline (600 pb, 1200 pb) entre les sites *NsiI* et *EcoRI*. L'épitope c-Myc présent en aval du gène de sélection entre les sites *EcoRI* et *PacI* permettra de repérer les transformants. La région 3' aval correspond aux 600 pb situés en aval du codon stop de la β -tubuline. Des fusions traductionnelles ont également été réalisées en fusionnant le gène *metAP1* ou *TrpB* à la région 5' amont p600- β tub30aa. Le numéro d'accèsion du gène *metAP1* d'*E. coli* est U70214. La séquence du gène *trpB* d'*E. coli* est obtenue à partir du numéro d'accèsion NZ_AAMK01000005.

transformants pourra alors être réalisé en utilisant un anticorps anti-c-myc, l'épitope c-Myc étant fusionné en 3' du gène de la β -tubuline mutée (**Fig. 72 et Tableau 20**).

IV.2.2. Résistance à la fumagilline par complémentation avec la MetAP1 d'*E. coli*

Seul un gène codant une MetAP2 (méthionine aminopeptidase de type 2) a été identifié au sein du génome d'*E. cuniculi*. L'absence d'un gène codant une MetAP1 pourrait expliquer la capacité de la fumagilline à inhiber la croissance d'*E. cuniculi* car la perte de fonction de MetAP2 ne peut être compensée. Nous avons donc envisagé de compléter les microsporidies avec le gène codant la MetAP1 d'*E. coli* et de sélectionner les parasites en présence de fumagilline. Pour cela, la séquence codante de la β -tubuline a été remplacée par le gène codant la MetAP1 entre les sites *Nsi*I et *Eco*RI. Le gène codant la MetAP1 se trouve ainsi fusionné avec un épitope c-Myc et est sous le contrôle des « promoteurs » p600 ou p1200 de la β -tubuline. Le gène codant la MetAP1 a également été inséré en phase avec la séquence codant les 30 premiers aa de la β -tubuline pour donner la construction p600- β tub30aa-MetAP1-myc (**Fig. 73A et Tableau 20**).

IV.2.3. Complémentation de l'auxotrophie au tryptophane

Aucun gène impliqué dans la voie de biosynthèse du tryptophane n'a été mis en évidence dans le génome d'*E. cuniculi*, suggérant que ces parasites utilisent le tryptophane de la cellule hôte. De plus, nous avons montré, *in vitro*, qu'*E. cuniculi* est incapable de se développer dans des cellules prétraitées à l'IFN- γ et en présence de milieu déplété en tryptophane. La stratégie envisagée a donc consisté à priver les cellules hôtes en tryptophane par traitement à l'interféron γ . Cette molécule stimule l'activité de l'indoléamine 2,3 dioxygénase impliquée dans la dégradation du tryptophane (**Fig. 25**). La complémentation des

Plasmides	Quantité ADN (μg)	Voltage	Résistance
pEnp1-myc	30-100 μg linéaire ou circulaire	1500 à 3000V	99 Ω -156 Ω
p600-gfp p600- β tub30aa-gfp p1200-gfp	50-100 μg linéaire ou circulaire	2000 à 3000V	99 Ω
p 600- β tubMut-myc			
p600-TrpB-myc p600- β tub30aa-TrpB-myc	50-100 μg linéaire ou circulaire	1500 à 3000V double pulse : 1. 1000 à 2500 2. 250 à 450	
p600-MetAP-myc p600- β tub30aa-MetAP-myc			

Tableau 21. Tableau récapitulatif des essais d'électroporation réalisés chez *E. cuniculi*. Les essais ont été réalisés sur des stades extracellulaires ou des cellules MDCK infestées. Les vecteurs sont linéarisés par digestion par *KpnI* et *XbaI* ce qui permet de libérer le transgène.

microsporidies avec le gène codant la tryptophane synthase β d'*E. coli* (TrpB) pourrait ainsi permettre la synthèse de tryptophane directement par le parasite. Le gène *trpB* a donc été introduit sous le contrôle des régions 5' amont p600 ou p1200 de la β -tubuline. Comme pour la MetAP1, une fusion traductionnelle a également été réalisée avec les 30 premiers aa de la β -tubuline (**Fig. 73B, Tableau 20**). Dans tous les cas un épitope c-myc est présent en aval de TrpB. Les transformants pourront donc être mis en évidence en utilisant un anticorps anti-c-myc ou un anticorps anti-TrpB.

IV.3. Les différents essais réalisés

IV.3.1. Par électroporation

IV.3.1.1. Les différentes conditions testées

La majorité des essais de transfection a été réalisée par électroporation. Cette technique a été appliquée à des cellules infestées par *E. cuniculi* ou à des stades extracellulaires. Différentes conditions de choc électrique ont été testées en tampon « cytomix », en PBS ou en milieu MEM sans sérum. Nous avons utilisé des quantités d'ADN variables (de 30 à 100 μ g), sous forme circulaire ou linéaire (**Tableau 21**), la linéarisation des vecteurs étant réalisée en utilisant les sites de coupures uniques localisés en dehors des transgènes. Différents essais d'électroporation ont été réalisés préférentiellement à fort voltage (1500 à 3000V). L'application de deux chocs électriques successifs appelée « double pulse » a également été testée.

La fixation de cellules infestées pour mettre en évidence l'expression du transgène en immunofluorescence a lieu 24h, 48h, 72h à 120h après le choc électrique. L'utilisation de la RT-PCR et l'immunodétection en Western blot ont également été réalisés lorsqu'un développement des parasites est visible dans le cas de stratégies de transfection stables.

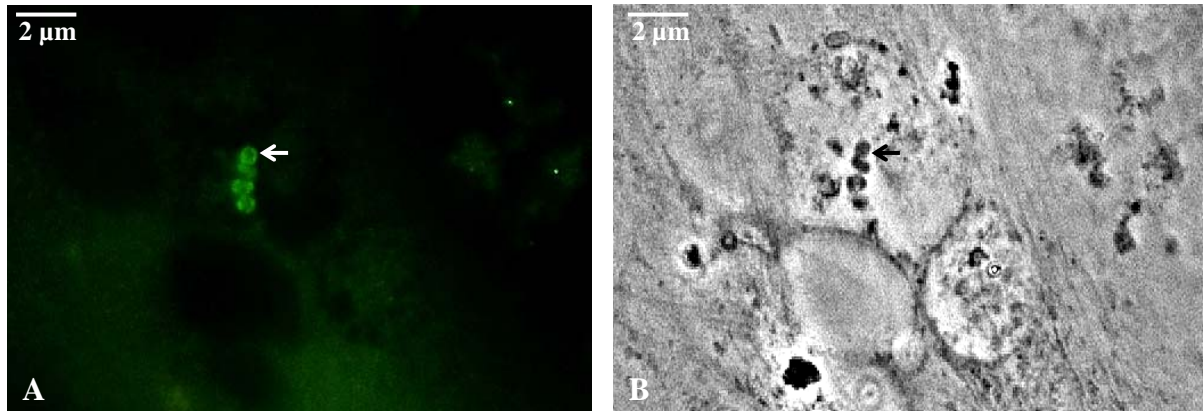


Figure 74. Mise en évidence de transformants transitoires obtenus après transfection de stades extracellulaires par électroporation avec la construction pEnp1-myc (100 μg). Les conditions du choc électrique sont les suivantes : 2500 V, 99 Ω, 25 μF. Les cellules ont été fixées 24h après transfection et les transformants sont détectés à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-c-Myc dilué au 1/1000 (A). B : contraste de phase.

IV.3.1.2. Analyse des transformants

Les premiers résultats d'électroporation montrent que les conditions testées ne modifient pas la capacité des microsporidies à envahir les cellules hôtes. La construction pEnP1-myc nous a permis d'obtenir des transformants transitoires de façon régulière montrant que des signaux nécessaires à la transcription et à la traduction du transgène sont présents (**Fig. 74**). Plusieurs constructions contenant la région 5' amont de 600 pb de la β -tubuline nous ont également permis de mettre en évidence des transformants transitoires en IFA après marquage avec l'anticorps anti-c-myc.

Cependant, les transformants obtenus sont, la plupart du temps, des stades de développement précoces et extracellulaires, incapables de ré-initier un cycle de développement, mais plus facilement « transformables » que les stades terminaux qui possèdent une paroi très épaisse (**Fig. 74**). Au cours de nos essais aucune activité GFP n'a pu être mise en évidence pour les constructions testées aussi bien en fusion transcriptionnelle qu'en fusion traductionnelle.

En ce qui concerne les essais de transfection stable, aucun transformant stable n'a pu être identifié. Seuls des stades extracellulaires adsorbés à la surface des cellules et correspondant à des transformants transitoires ont pu être observés. Après plusieurs jours de sélection, de petites vacuoles parasitophores contenant quelques stades parasites sont observées par comparaison à un témoin non transformé et traité avec la sélection. Ceci laissait penser que ces parasites pourraient exprimer le transgène permettant leur développement en présence de sélection. Cependant, cette expression n'a pu être mise en évidence par immunofluorescence. Une détection de l'expression du transgène par RT-PCR et en Western blot a donc été réalisée. Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de révéler ni la transcription ni la traduction du transgène. Ceci suggère que les conditions de sélections ne

sont pas assez drastiques pour inhiber totalement le développement des parasites non transformés.

Les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer une condition de choc électrique utilisable pour obtenir une grande efficacité de transformation. Le cytomix semble cependant être le tampon à utiliser même si peu d'essais ont été réalisés avec d'autres tampons. Nous ne pouvons pas non plus conclure quant à l'utilisation privilégiée de stades extracellulaires ou de cellules infestées en suspension ni quant à la stratégie de sélection à privilégier.

IV.3.2. Par magnétofection

Les essais de magnétofection ont été réalisés avec les deux constructions pEnp1-myc et p600- β tub-TrpB-Myc linéarisées en utilisant des quantités variables d'ADN de 10 à 30 μ g / μ L de billes. Le temps d'incubation des billes avec l'ADN est fixe (15 min). Nous avons testé différentes quantités du mélange ADN/billes à la surface des cellules et différents temps d'incubation sur la plaque magnétique (5 à 30 min). Les cellules infestées ont été fixées après 24h pour analyser l'expression du transgène. Les expériences de transfection par magnétofection n'ont pas permis de détecter des microsporidies exprimant Enp1-myc. La nécessité pour l'ADN de traverser trois membranes (membrane de la cellule hôte, de la vacuole parasitophore et des stades parasitaires) est une limite de cette technique.

IV.3.3. Par biolistique

L'électroporation nécessite de grande quantité d'ADN. C'est pourquoi nous avons envisagé une autre alternative moins consommatrice d'ADN, la biolistique. De plus, cette technique constitue une technique alternative pour des organismes réfractaires à la transformation. Les transfusions par biolistique ont été réalisées sur des cellules MDCK infestées par *E. cuniculi* à l'aide de micro-particules de tungstène M5 (0,2 μ m), qui sont les

plus petites disponibles utilisées de façon courante pour la transfection de petites structures biologiques (organelles, bactéries) et qui sont compatibles avec la taille d'*E. cuniculi* (2-2,5 x 1-1,5 µm). Pour la majorité des essais de biolistique, la construction pEnp1-myc, qui donnait les meilleurs résultats par électroporation, a été testée.

Pour une même quantité d'ADN (2,5 µg), nous avons testé différentes conditions. D'autres conditions ont ensuite été réalisées en augmentant la quantité d'ADN pour une distance entre le canon et l'échantillon de 19 cm (plateau 7). Les cellules ont été fixées après 24h pour analyser l'expression de Enp1-myc. Les résultats obtenus montrent que de nombreuses cellules au centre de la lamelle sont nécrosées. Seules les cellules en périphérie de lamelles, moins exposées à la projection des billes, présentent un phénotype normal. De plus, l'expression de la GFP dans les cellules de mammifères est très rarement mise en évidence. Ceci suggère que les conditions de vide appliquées lors de la transfection et permettant de disperser les billes de tungstène ne sont pas adaptées. Aucune conclusion quant à l'utilisation de cette technique pour la transformation des microsporidies ne peut être tirée.

En conclusion, l'électroporation semble la technique la plus pratique et la plus efficace pour la transfection d'*E. cuniculi*. L'ensemble des résultats obtenus montre cependant une efficacité de transfection transitoire très faible. Une absence de transfection stable quelle que soit la stratégie appliquée est également constatée.

Discussion

EhPTP1	MKGISKILSASIMVMKLGNVYSAVPLCSNTYDPSQ-----QQPSYVLIPSTPEAITNCA	54
EiPTP1	MKGISKVLSASIVLMKLGKVYSTTVLCGDSTQGLQG----TTQPSYVLVPSAPETIANCG	56
EcPTP1	MKGISKILSASIALMKLENVYSATALCSNAYGLTPGQQGMAQQPSYVLIPSTPGTIANCA	60
AlPTP1	MKFKASVLA VAYLTTARGNDPCNFICDGGGSGGGNGG---GNMIFVKPVATIHKQQPVCN	57
EhPTP1	YSPKNAYVPSPTTS--SSTPGTNNDNE--TSPT---TEDVG-TCKISVVKHCDTPGASS-	106
EiPTP1	YSPQNMVVPSTPTTMPSTVPGTTGESETPTSPTSSPTEDVG-TCKIAVVKHCDAPGTSS-	114
EcPTP1	SGSQDTYSPSPAAPTSPVTPGKTSENE--TSPS-APAEDVG-TCKIAVLKHCDA PGTTS G	116
AlPTP1	CATGRGYS PGGARGGSYAPPQSSG YGGYGAAGGYNGYTGYGPGYSTPSIPYVQIIPVPT-	116
EhPTP1	-TP-CEPEQTIP-AQPVTMATVTPAIIASVQTPSVSVIPVTQKVIQPATMIVPSSIIIP	163
EiPTP1	-TP-CEPEQTLAPSQPVAATIATPLVVASVQTPQA AVTILTPKAVSAQPATIIISPFNQAP	172
EcPTP1	TTPGSGPCETPEQQQPLSVISTTPAVPVTVESAQSPSVVPVVP-----VVAHQAVP	168
AlPTP1	-FPPVPPPPQAYAAPSGEPPKEKIIITTTV TPLKSTTPVCSVT-----TIQCEEV P	167
EhPTP1	GYYPNGTPAAPGQQQILSGSVLAPGASSCQLVPGNTPGQMLPGMTPGVSPCLPTQGGDG	223
EiPTP1	GYYNS---AIPG---QILTGNVLSPSASSCQVVP GTT-----	203
EcPTP1	GYYNNGTSGIPGQQ-QILSG-TLPPGATLCQGGAMPS-----	203
AlPTP1	VEPETITMHVPEKP----PKNDT P P P Q S P P Q M Q F M M Q-----	200
EhPTP1	SNQTIPGIVYPCQPGQGGSGSNQTIPGIVISPCQPGQGGSGSNQTIPGIVYPCQPGQGGSG	283
EiPTP1	-----GSSTPQQLPGAVS-----SG---TIP-----CQIVQGTQS	230
EcPTP1	-----TPGQQQILSGTLPPG--VTLCQG--QATPSTPGQQVLSGTL P	242
AlPTP1	----- SMVQPIVPI S I P-----LQAAPAP--	219
EhPTP1	SNQTIPG-VISPCQPGQGGSGSNQTIPGIVYPCQPGQNGDGSNQTIPGIVISPCQ-PGQGG	341
EiPTP1	SGN-----TPGQ-----QFLPGIV-PVGS LQPDQATSGTPTPSVSQSQ--SGQ--	270
EcPTP1	PGVTL CQGGATPSTPGQ-----QQVLSGTLLEP GATLCQDQGMPTSGVPGQQQVLSGTL P	295
AlPTP1	----- PP PQ-----AQAPAPAPPQAPAPPPPPQAQAPPPPPQAQASVPMYS--	258
EhPTP1	NGNGTTGQPGQCVSVPQTPNP IAMPPI S G I S G N G Y P T S T T Y T Q S L G Q L G P C I D V Q K P - T S	400
EiPTP1	-----QCCCTPPITNP-VMPTPMGISNGYPSSTAYAPTLGQLGPCIDTQKS-TS	318
EcPTP1	-----CCAPQIPNP-VMPPSMNISNGYPSSTAYSPNLGSLGSCVDIQKTGGT	342
AlPTP1	----- QAYYYQQA P P P K P A P R A Q Y T S G G S I P K D V C I C D T T G G S G G N Y Q E G G M N C A	308
EhPTP1	SCESQTNEKSTMQYAMEACAAPTPTVVI G N S E Y L V G P G M Y S S L T S P C N S C C Q C --	453
EiPTP1	SCEPK--EKPV AQY G M E A C A A P T P T A V L G N A E Y L L S P G M Y N S L N S P C N A C C Q Q C	371
EcPTP1	SCEQKP-EKSATQYAMEACATPTPTVI I G N S E Y L V G P G M Y N A I N S P C N T A V Q C C -	395
AlPTP1	DQTNVDLAACREGNSYPSANI TNVEVPLA A A S Q K A S P P L E Y S S G C P C-----	355

Figure 75. Alignement des séquences en acides aminés des protéines PTP1 d'*E. cuniculi* (Ec), *E. intestinalis* (Ei), *E. hellem* (Eh) et *A. locustae* (Al). Les acides aminés identiques sont grisés. La séquence d'AlPTP1, très divergente de celles du genre *Encephalitozoon*, est en gras. La position des aa est indiquée à droite.

Discussion

I. Conservation de la synténie entre génomes microsporidiens : un outil pour l'identification de protéines orthologues dont les séquences ont fortement divergé

I.1. Cas des gènes *ptp1* et *ptp2*

La comparaison des génomes d'*Antonospora locustae*, dont le séquençage est en cours de réalisation, et d'*Encephalitozoon cuniculi* révèle une conservation de la synténie pour de nombreux gènes. Ceci nous a permis de mettre en évidence des orthologues des protéines du tube polaire PTP1 et PTP2 dont les gènes sont présents dans un environnement proche, comme c'est également le cas pour les deux autres espèces du genre *Encephalitozoon* (Delbac *et al.*, 2001). La recherche de ces PTPs par homologie de séquence n'avait en effet pas permis de les identifier chez *A. locustae*, ces protéines étant caractérisées par une forte divergence au niveau de leurs séquences primaires comme le montre les alignements présentés sur les **figures 75 et 76**. Cette conservation de la synténie a également facilité l'identification de protéines de type PTP1 et PTP2 chez *Paranosema grylli*, une autre espèce microsporidienne parasite d'insectes, phylogénétiquement proche d'*A. locustae* (**Fig. 77**).

Ces résultats sont en accord avec une récente analyse du génome d'*A. locustae* qui montre que 13% des gènes étudiés sont dans un contexte chromosomique identique à *E. cuniculi*. De plus, 30% des gènes sont séparés par de petits réarrangements résultant d'une ou de plusieurs inversions (Slamovits *et al.*, 2004). Il est important de souligner que ces pourcentages sont probablement sous-estimés, cette étude ayant été réalisée uniquement à partir de gènes codant des protéines présentant des homologies de séquences avec *E. cuniculi*, ce qui n'est pas le cas, par exemple, des protéines PTP1 et PTP2. Les premières données de séquences de *Nosema bombycis*, microsporidie parasite du ver à soie, montrent également des

EiPTP2	-----MLLLLSAVAFVSATAVQ-----SGVVSQPTTPIPIILP--GQPMGGM	39
EcPTP2	-----MLLLLAITAVVSATMVHP-----SAVVPQPAAPLHVVP--PQQQMGGM	40
EhPTP2	-----MLLLFTVVTLVSAQA-----PVTPTQAAVPTQFLPGAQQKIGGV	40
AlPTP2	MKRLVSLVLLYSILEPVALSHGYGSKYSVNAVSGSSGAVNNAAREKTLTSLQNRVLKAA	60
EiPTP2	ANGCTNKKLDG--VEIMRRNMVEQQRNAEATKAMVERAN-----EKAVETFN--KEVSK	90
EcPTP2	VNGCTSKKLEG--AEIMRRNMIECQKRSEATKAMIERAN-----EKAVESFN--KEVSK	91
EhPTP2	DNRCANKQVEG--VQIFQGDMAADCPKRNSEANAMVQRAK-----QKALEIYN--KEISK	91
AlPTP2	IAQNAAASLPPGMAGSFLTNNPKCKSSSVDGNWSMLQTKLNQDCVEKVIKNERAKKYAQ	120
EiPTP2	GP-QKESGQCIEKAVQGTDRCILAGIIDKAVNKRKYRISDVENSTSLYRGD--KLIALIV	147
EcPTP2	GPSQKDDGGQCIEKAVQGTDRCILAGIIDKAVNKRKYRISDVENSTSLYRGD--KLIALIV	149
EhPTP2	GPTPKDSGQCIEKAVQGTDRCILAKIIDKAVNMLKYRISKVGNATALFRGN--KLISLIL	149
AlPTP2	ILSKPSSKECIKLLNPNAMVQARKVMSRVVEFPYYQIIMYGNVVQLVEDGRVKMMGVVE	180
EiPTP2	NVDYGLQPIIKPKKKKSKIMANLPQPKREMYFNQIGQLVGAKGTFPQDNKDECKPCE-PK	206
EcPTP2	NVDYGLQPIITPKPKKKKSKIMANLPQPKREMYFNQIGQLVGARGTFPQENKEDCKPCEGPK	209
EhPTP2	NVDYGLKPFPTVVVKKKTKRVF--PQGD-ELNFGIGQLIGVKGTFPQDNNDECKPCDSPK	206
AlPTP2	KIHVDVE-----KKNMRTSPSLKKTALLEFNELGGLLKQKGIKIPAAKS-----PDPCLS	230
EiPTP2	KTVETASERCNLGCELKGTSAIISKAIQKKEIKESPKEGDRNTTQEYDGEGSAAEDAEQQQ	266
EcPTP2	KTVETTSEKCNLGCCELKGTSAIISKAIQKKEVKDT-KEGEKSASQSDGEGTAEDAQVQQ	268
EhPTP2	KTVETVAEECNLGCQLKGTPLISRAIQKKEVKESKDGESSTQ--NGEGTDDDEDGQQ	264
AlPTP2	SCIEALEKKAAVEGQNEGCECESLMEITTVRPGIFKDASKKKEETPSGENKEKSEG---	287
EiPTP2	PSADGEGLE	275
EcPTP2	PSADGEGLE	277
EhPTP2	-SPDNGPE	272
AlPTP2	-----	287

Figure 76. Alignement des séquences en acides aminés des protéines PTP2 d'*E. cuniculi* (Ec), *E. intestinalis* (Ei), *E. hellem* (Eh) et *A. locustae* (Al). La position des aa est indiquée à droite. Les acides aminés identiques sont grisés. La séquence d'AlPTP2, très divergente de celles du genre *Encephalitozoon*, est indiquée en gras.

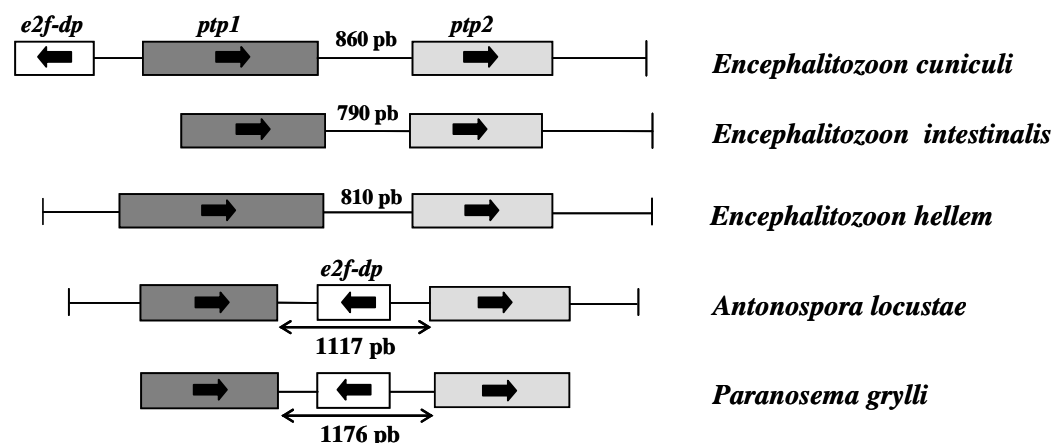


Figure 77. Conservation de la synténie des gènes *ptp1* et *ptp2* chez 5 espèces microsporidiennes appartenant au genre *Encephalitozoon*, *Antonosporea* et *Paranosema*. Les gènes *ptp1* sont représentés par des rectangles gris foncés, les gènes *ptp2* par des rectangles gris. Les rectangles blancs représentent les gènes *e2f-dp*. Le gène *e2f-dp* est localisé en amont de *ptp1* chez *E. cuniculi* et entre les gènes *ptp1* and *ptp2* chez les deux microsporidies d'insectes *A. locustae* et *P. grylli*. La taille de la région séparant le cluster *ptp1-ptp2* est indiquée en pb. Les flèches indiquent le sens de transcription.

groupes de gènes dont l'organisation est conservée avec *E. cuniculi* (Xu *et al.*, 2006). En revanche, ceci ne semble pas être le cas chez *Brachiola algerae*, autre microsporidie dont le génome est en cours de séquençage.

La conservation de la synténie des gènes entre *E. cuniculi* et *A. locustae* peut paraître étonnante compte tenu, d'une part, de l'éloignement phylogénétique de ces espèces microsporidiennes (Slamovits *et al.*, 2003) et, d'autre part, de la forte divergence de nombreuses séquences de protéines orthologues. Il est important de signaler que la synténie ne constitue toutefois pas une règle. En effet, bien que l'organisation en tandem des gènes *ptp4* et *ptp5* soit conservée entre *E. cuniculi* et *A. locustae*, ce n'est pas le cas des autres gènes présents en amont et en aval de ce cluster. De même, alors que chez *E. cuniculi* le gène *ptp3* est localisé entre les gènes *Sec13* et *diphthine synthase (ds)*, l'utilisation d'amorces déterminées dans les gènes *Sec13* et *ds* d'*A. locustae* qui sont localisés à l'extrémité de 2 contigs différents n'a pas permis d'amplifier un orthologue du gène *ptp3*. Ces données suggèrent donc que l'organisation des gènes au niveau de ce locus est différente chez *A. locustae*.

I.2. La synténie chez les procaryotes et les eucaryotes

L'analyse de nombreux génomes montre que des régions de synténie existent chez les procaryotes ou des eucaryotes. De manière générale, des organismes appartenant à des espèces phylogénétiquement proches ont accumulé de petits réarrangements et présentent donc de longs segments dont l'ordre des gènes est conservé (macrosynténie). En revanche, des espèces plus éloignées ont accumulé de nombreux réarrangements et présentent donc de courts segments conservés (microsynténie). Ainsi, une forte conservation de l'organisation des gènes est observée entre différentes espèces du genre *Bacillus*, ou entre différents genres bactériens comme par exemple *B. subtilis* et *E. coli* (Anderson *et al.*, 2005; revue par Bentley et Parkhill, 2004).

Entre les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Ashbya grossypii*, malgré des séquences protéiques relativement divergentes, 90% des gènes présentent une conservation de la synténie (**Dietrich et al., 2004**). Une diminution du degré de synténie est par contre observée entre *Saccharomyces* et des espèces plus éloignées appartenant aux genres *Pischia* ou *Yarrowia* (**Herrero et al., 2003**). Une grande divergence de séquences malgré une conservation de l'ordre des gènes est également constatée au sein du genre *Aspergillus*. Chez ce champignon, les régions de synténie se situent au niveau du coeur des chromosomes, les réarrangements ayant lieu préférentiellement dans des régions répétées ou dans les régions subtélomériques comme chez la levure ou les nématodes (**Galagan et al., 2005**).

Parmi les protistes et notamment chez les *Trypanosomatidae*, de grandes régions de synténie ont été décrites alors qu'une forte divergence des séquences est observée (**Ghedin et al., 2004**). C'est également le cas au sein du genre *Plasmodium*, où une conservation de l'organisation des gènes est mise en évidence entre des parasites humains, et des parasites de différents primates et de rongeurs. Comme chez les levures, une diminution du degré de synténie est constatée lorsque les distances phylogénétiques augmentent (**Carlton et al., 1998 ; 1999 ; 2002**). On peut également signaler que *Plasmodium* et *Cryptosporidium* ne présentent aucune région de synténie bien qu'appartenant à un même phylum (**Keeling et al., 2004**).

I.3. Les origines de la conservation de la synténie

La conservation de l'organisation des gènes peut résulter d'une forte pression de sélection qui préserve ainsi la proximité entre des gènes dont l'expression est co-réglée et qui codent pour des produits impliqués dans les mêmes voies métaboliques ou appartenant à une même structure cellulaire. Ainsi, chez les procaryotes, de nombreux gènes intervenant dans une même fonction ou un même métabolisme sont organisés en cluster et sont transcrits

sous forme d'opérons (revue par **Bentley et Parkhill, 2004**). Chez les levures dont le génome est moyennement compacté (1 gène tous les 2 kb), la conservation de la synténie est liée d'une part à la présence de régions intergéniques courtes mais aussi à d'autres facteurs comme la co-expression (**Hurst et al., 2002**). De grandes régions stables correspondant à des gènes co-régulés sont également identifiées chez les nématodes (**Guiliano et al., 2002**). C'est aussi le cas des *Trypanosomatidae* dont les gènes sont transcrits sous forme d'ARNm polycistroniques. Une étape de maturation permet ensuite la formation d'ARNm monocistroniques (**Blumenthal, 2004**). Il apparaît ainsi primordial, afin de conserver l'ordre des gènes et le sens de transcription, que tout réarrangement pouvant détruire la coordination de cette transcription soit fortement limité (**Ghedin et al., 2004**).

Chez *E. cuniculi*, plusieurs gènes codant pour des protéines intervenant dans une même voie biochimique ou qui interagissent sont organisés en cluster. C'est le cas notamment des gènes codant pour les histones H3 et H4 au niveau du chromosome IX ou des gènes codant pour la dihydrofolate réductase et la thymidilate synthase au niveau des chromosomes I et VIII (**Katinka et al., 2001**). Comme nous l'avons montré, les gènes codant les protéines PTP1 et PTP2 qui interviennent dans la constitution du tube polaire et pour lesquelles des interactions ont été mises en évidence, sont organisés en tandem chez différentes espèces et genres microsporidiens (**Delbac et al., 2001 ; Polonais et al., 2005**). Une conservation de l'organisation en tandem des gènes *ptp4* et *ptp5* est également constatée. Le fait que l'organisation en tandem des gènes *ptp1* et *ptp2* soit conservée au sein du genre *Encephalitozoon* en raison d'une co-régulation de leur expression ne convient pas dans le cas d'*A. locustae* et *P. grylli*. En effet, chez ces 2 espèces, les gènes *ptp1* et *ptp2* sont interrompus par un gène codant pour le facteur de transcription e2f-dp (**Fig. 77**). L'analyse phylogénétique basée sur la petite sous-unité d'ADNr montre que les microsporidies *A. locustae* et *P. grylli* ont divergé avant *Encephalitozoon* spp (**Sokolova et al., 2003 ; Slamovits et al., 2003**).

suggérant que *e2f-dp* était présent entre les gènes *ptp1* et *ptp2* chez un ancêtre commun. Le changement de position de *e2f-dp* en amont du cluster *ptp1-ptp2* aurait eu lieu après la divergence des genres *Antonospora* et *Encephalitozoon*. Nous pouvons donc envisager une pression de sélection maintenant l'organisation et l'ordre des gènes codant les protéines du tube polaire dans différents génomes, ces protéines étant impliquées dans la constitution d'une même structure.

La conservation de l'organisation des gènes peut également provenir du hasard ou être une conséquence de l'extrême compaction des génomes microsporidiens (2,9 Mpb pour *E. cuniculi*, 5,4 Mpb pour *A. locustae*). En effet, dans les génomes nucléaires de taille réduite, les séquences intergéniques sont en général très courtes. Changer l'ordre des gènes nécessite de réaliser des cassures qui peuvent être à l'origine d'un phénotype létal. Une forte pression de sélection pourrait donc expliquer la conservation de l'organisation des gènes. Ceci est illustré dans le génome de *Nosema bombycis* où des éléments transposables de type Ty3/Gypsy ont été caractérisés uniquement en aval ou entre des groupes de synténie suggérant une pression de sélection qui empêcherait une intégration aléatoire des éléments transposables pouvant être à l'origine d'une perte de la viabilité (Xu *et al.*, 2006). La description récente d'une organisation en opérons de certains gènes chez *A. locustae* (Williams *et al.*, 2005) et *E. cuniculi* (E. Peyretailade, communication personnelle) peut également permettre de justifier la conservation de la synténie comme cela a été décrit chez les procaryotes, les nématodes ou les Trypanosomatidae (Blumenthal, 2004).

Enfin, chez certains procaryotes comme *Mycoplasma* ou *Chlamydia*, l'absence de certaines protéines impliquées dans la recombinaison permet d'expliquer une très forte conservation de l'organisation des gènes (Suyama et Bork, 2001). Cette hypothèse ne peut cependant pas être appliquée aux microsporidies chez lesquelles la machinerie de recombinaison est présente (Katinka *et al.*, 2001).

Le nombre croissant de génomes séquencés et leur analyse démontre que le degré d'évolution des séquences ne reflète pas le niveau d'évolution des génomes. En effet, même si une grande divergence de séquence est observée, les gènes trouvés dans un même environnement dans différents génomes sont souvent des orthologues. Les résultats obtenus au cours de notre travail confirment que la conservation de la synténie peut faciliter l'annotation d'un génome, notamment pour mettre en évidence des gènes dont les séquences ont fortement divergé au cours de l'évolution comme cela a été le cas pour les protéines PTP1 et PTP2, ou la protéine Sec, intervenant dans la voie de sécrétion chez *E. cuniculi* (**Slamovits et al., 2006**). D'autres études semblent indiquer que de nombreuses autres séquences microsporidies-spécifiques n'ont pas été annotées dans le génome d'*A. locustae* alors qu'elles pourraient correspondre à des orthologues des protéines d'*E. cuniculi* dont les séquences primaires sont très divergentes (F. Delbac, données personnelles).

II. Le tube polaire et ses constituants : analyses comparatives des PTPs et étude des interactions

L'hétérogénéité des constituants du tube polaire a été initialement mise en évidence chez différentes espèces microsporidiennes sur la base des propriétés de dissociation des tubes polaires et la production d'anticorps spécifiques (**Keohane et al., 1996 ; Delbac et al., 1998**). Les séquences complètes de 3 PTPs (PTP1, PTP2 et PTP3) ont été identifiées chez *E. cuniculi* (**Delbac et al., 1998 ; 2001 ; Peuvel et al., 2002**). Des protéines PTP1 et PTP2 ont pu aussi être caractérisées chez *E. hellem* et *E. intestinalis* (**Keohane et al., 1998 ; Delbac et al., 2001**). L'identification de nouvelles protéines du tube polaire s'inscrit dans un travail visant à améliorer la connaissance de la composition de cette structure unique impliquée dans l'invasion des cellules hôtes. Au cours de mon travail, des protéines de types PTP1 et PTP2 ont été identifiées chez deux microsporidies parasites d'insectes. Une séquence partielle d'un

gène codant une protéine de type PTP3 a également été mise en évidence. Enfin, deux nouvelles protéines, PTP4 et PTP5, appartenant à de nouvelles familles protéiques, ont été caractérisées chez *E. cuniculi*, *A. locustae* et *P. grylli*.

II.1. Analyse comparative des protéines de types PTP1, PTP2 et PTP3

A ce jour, des protéines de type PTP1 et PTP2, considérées comme les composants majeurs du tube polaire, ont donc été mises en évidence chez 5 espèces microsporidiennes (**Tableau 21**).

Comme nous l'avons montré, les protéines PTP1s sont caractérisées par une très forte divergence de leurs séquences primaires et notamment entre des espèces microsporidiennes appartenant à des genres différents (**Fig. 75**). La taille de ces protéines varie de 351 aa chez *P. grylli* à 453 aa chez *E. hellem*. Cependant, ces protéines présentent des caractéristiques communes comme un pI acide, une richesse en résidus proline ou encore la présence d'une cystéine à l'extrémité C-terminale. La proline, acide aminé cyclique, pourrait jouer un rôle dans l'élasticité du tube polaire, propriété nécessaire au cours du processus d'extrusion et du passage du sporoplasme. De plus, la forte teneur en proline tout comme la présence de composés glucidiques associés aux protéines PTP1s pourraient être responsables du défaut de migration constaté sur les gels de polyacrylamide. Ceci est confirmé par des expériences de déglycosylation chimique réalisées chez *E. intestinalis* : la protéine EiPTP1, dont la taille apparente est d'environ 50-60 kDa en SDS-PAGE, est détectée dans une bande à 45 kDa après déglycosylation (**Peek et al., 2004**). Les protéines PTP1s sont aussi caractérisées par une région interne composée de motifs répétés dont les séquences et le nombre sont extrêmement variables d'une espèce à l'autre (**Delbac et al., 2001**) voire même entre des isolats appartenant à une même espèce (**Peuvel et al., 2000**). Un rôle de cette région dans l'échappement à la réponse immunitaire ou dans la spécificité d'hôte peut être envisagé. La

Protéines du tube polaire	Espèces microsporidiennes				
	<i>E. cuniculi</i>	<i>E. intestinalis</i>	<i>E. hellem</i>	<i>A. locustae</i>	<i>P. grylli</i>
PTP1	395 aa ^a	371 aa ^b	453 aa ^c	355 aa ^e	351 aa ^e
PTP2	277 aa ^b	275 aa ^b	272 aa ^b	287 aa ^e	287 aa ^e
PTP2-a (1712)	-	-	-	568 aa	-
PTP2-b (1329)	-	-	-	599 aa	-
PTP3	1256 aa ^d	-	-	Séquence partielle (605 aa)	-
PTP4	276 aa	-	-	381 aa	381 aa
PTP5	252 aa	-	-	242 aa	Séquence partielle (234 aa)

Tableau 22. Tableau récapitulatif des protéines PTPs identifiées chez les microsporidies *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*, *A. locustae* et *P. grylli*. Les protéines appelées PTP2-a et PTP2-b correspondent à des protéines de type PTP2 (famille multigénique) identifiées chez *A. locustae*. Seule une séquence partielle correspondant à l'extrémité C-terminale de PTP3 a pu être caractérisée chez *A. locustae*. Pour PgPTP5, les amplifications PCR n'ont pas permis d'identifier la séquence codant l'extrémité C-terminale. aa : acides aminés. ^a : Delbac *et al.*, 1998 ; ^b : Delbac *et al.*, 2001 ; ^c : Keohane *et al.*, 1998 ; ^d : Peuvél *et al.*, 2002 ; ^e : Polonais *et al.*, 2005.

présence d'un nombre relativement important de résidus cystéine probablement impliqués dans la formation de ponts disulfure est en accord avec les propriétés de dissociation du tube polaire, dont la solubilisation n'est possible qu'en présence de fortes concentrations en agents réducteurs (Weidner, 1976 ; Keohane *et al.*, 1996 ; Delbac *et al.*, 1998). La cystéine qui occupe la position C-terminale des 5 PTP1s identifiées pourrait jouer un rôle crucial dans les interactions entre PTPs lors de l'assemblage du tube polaire.

Les protéines PTP2, nettement plus conservées que les protéines PTP1 au sein d'un même genre, présentent aussi une forte divergence de séquence primaire entre genres différents (Fig. 76). Ces protéines ont cependant des caractéristiques communes comme un pI basique et une forte teneur en lysine ainsi que des tailles similaires (272 aa chez *E. hellem* à 287 chez *A. locustae* et *P. grylli*). Quelle que soit l'espèce microsporidienne étudiée, huit résidus cystéine sont présents suggérant, comme pour PTP1, l'existence de ponts disulfure inter- ou intra-chaînes dans l'organisation du tube polaire en accord avec les propriétés de solubilisation de ces protéines qui nécessitent également l'utilisation d'agents réducteurs. Alors qu'un seul gène de type *ptp2* existe chez *E. cuniculi*, trois ont été mis en évidence chez *A. locustae* (Tableau 22). Parmi ces 3 gènes, un (CDS 1048, 287 aa) se trouve à proximité du gène *ptp1* comme chez *Encephalitozoon*. Les 2 autres (CDS 1712 et 1329) codent pour des protéines de plus grande taille (568 aa et 599 aa) dont les séquences, très conservées (84,4% d'identité), se différencient principalement par la présence d'une insertion/délétion de 60 aa. L'utilisation d'anticorps produits contre une région de la protéine 1712, retrouvée chez 1329, donne un marquage d'une seule bande protéique migrant à 70 kDa, pouvant s'expliquer par la co-migration de ces 2 protéines. Cependant, l'analyse en spectrométrie de masse de la bande de 70 kDa a révélé la présence uniquement de la protéine 1712 même si les résultats obtenus ne permettent pas d'exclure totalement la présence de la protéine 1329. L'utilisation des anticorps anti-1712 indique aussi que des orthologues existent chez les espèces *B. algerae* et

N. bombycis. Ces données suggèrent donc la présence de plusieurs protéines de type PTP2 chez ces microsporidies parasites d'insectes. Cependant, le rôle de cette famille multigénique reste à élucider (variabilité permettant d'infester un large spectre d'hôte ou d'échapper au système immunitaire...).

La troisième protéine du tube polaire identifiée uniquement chez *E. cuniculi* semble être une protéine conservée entre les espèces du genre *Encephalitozoon* comme le montrent les réactions immunologiques croisées en IFA et en Western blot (**Peuvel et al., 2002**). EcPTP3, protéine de grande taille (1256 aa), riche en alanine et glutamate, est dépourvue de résidus cystéine ce qui implique une association avec les autres PTPs indépendante de ponts disulfure. EcPTP3 présente une région centrale acide composée de nombreuses répétitions riches en aspartate et glutamate flanquée par deux régions basiques. Cette protéine, soluble en l'absence d'agent réducteur, serait impliquée dans la stabilisation du tube polaire par l'intermédiaire de liaisons ioniques à en juger par sa richesse en résidus chargés. Seule une séquence partielle d'un gène de type *ptp3*, a été caractérisée au sein du génome d'*A. locustae*. Localisée à l'extrémité du contig 2 en amont du gène *diphthine synthase*, cette séquence correspondrait à la région codant la partie C-terminale de AlPTP3, l'alignement avec la région C-terminale de EcPTP3 indiquant 27,3% d'identité. Comme EcPTP3, AlPTP3 présente une queue C-terminale basique de 130 aa (pI de 11,3). Cependant, une analyse comparative précise ne pourra être réalisée qu'après identification du gène *Alptp3* complet. Comme nous l'avons précédemment montré le gène *Alptp3* ne semble pas être positionné entre les gènes *Sec13* et *diphthine synthase*, tel que c'est le cas chez *E. cuniculi*.

II.2. PTP4 et PTP5 : deux nouveaux antigènes du tube polaire

Deux nouveaux composants du tube polaire ont été identifiés, PTP4 et PTP5, dont les gènes sont organisés en tandem chez les espèces *E. cuniculi*, *A. locustae* et *P. grylli*.

L'absence d'homologie avec les banques de données indique l'appartenance de ces protéines à deux nouvelles familles protéiques. Cependant, il semblerait que ces 2 familles soient apparentées, PTP4 et PTP5 présentant respectivement 22% et 26% d'identité chez *E. cuniculi* et *A. locustae*. De plus, contrairement aux protéines PTP1 et PTP2 qui sont très divergentes entre les genres *Encephalitozoon*, *Antonospora* et *Paranosema*, les protéines PTP4 et PTP5 apparaissent beaucoup plus conservées.

Nos études montrent que les protéines PTP4 présentent une richesse importante en lysine (8,5-9%) ainsi qu'un pI basique. Bien que 23% d'identité soient retrouvés entre les protéines PTP4 d'*E. cuniculi* et *A. locustae*, ces protéines sont caractérisées par une importante différence de taille : 276 aa chez *E. cuniculi* et 381 aa chez *A. locustae*. De plus nous avons pu mettre en évidence une différence de localisation de PTP4 entre les deux espèces microsporidiennes : en effet, chez *A. locustae*, le marquage est restreint à l'extrémité des tubes polaires dévaginés alors que chez *E. cuniculi* un marquage de l'ensemble du tube polaire est observé. En raison de la localisation de AIPTP4 à l'extrémité des tubes polaires dévaginés, un rôle de cette protéine dans l'interaction du tube polaire à un récepteur cellulaire au cours du processus d'invasion peut être envisagé. Ne disposant pas de culture *in vitro* d'*A. locustae*, cette étude pourra être envisagée chez *Brachiola algerae*, une autre microsporidie d'insectes capable d'infester des cellules de mammifères et cultivée *in vitro* au laboratoire sur lignée cellulaire HFF.

Les protéines PTP5 sont également riches en lysine (12,5% et 9,1%). En plus d'une conservation de leurs séquences (27% d'identité), les protéines EcPTP5 et AIPTP5 ont des tailles similaires (252 aa chez *E. cuniculi* et 242 aa chez *A. locustae*).

Un certain nombre de résidus cystéine occupent des positions conservées entre *E. cuniculi* et *A. locustae* (4 pour PTP4 et 5 pour PTP5) ce qui, encore une fois, suggère la formation de liaisons de type disulfure. En Western blot, contrairement à AIPTP4 et AIPTP5,

les protéines EcPTP4 et EcPTP5 sont identifiées dans des extraits protéiques sans agent réducteur, leur solubilisation étant toutefois améliorée lorsque du DTT est ajouté. Ceci peut s'expliquer par la nature des échantillons utilisés pour réaliser les extractions protéiques : tandis que l'échantillon d'*A. locustae* est constitué uniquement de spores matures, l'échantillon d'*E. cuniculi*, obtenu à partir d'un surnageant de culture, contient des spores et de nombreux stades de développement. L'hypothèse serait que ces PTPs sont mises en place tardivement au niveau de la spore, *via* la formation de ponts disulfure et pourraient donc être solubilisées à partir de stades présporaux en absence d'agent réducteur.

Une localisation de ces nouvelles PTPs à un niveau ultrastructural reste à réaliser. Elle devrait permettre de préciser la localisation de ces protéines et notamment de voir où se trouve la protéine AIPTP4 lorsque le tube est encore enroulé dans la spore.

L'absence de marquage à l'aide des anticorps dirigés contre la protéine codée par le CDS 07_1070 ne nous permet pas, aujourd'hui, de valider son implication au niveau du tube polaire, malgré des similarités importantes avec EcPTP4 et EcPTP5. Aucun candidat homologue n'a pu être identifié dans la base de données d'*A. locustae*.

II.3. Interactions entre les protéines du tube polaire

Afin de connaître l'architecture du tube polaire, il convient d'étudier les interactions pouvant exister entre les différentes protéines impliquées dans la constitution de cette structure. Des expériences de cross-linking chimiques à partir de protéines sporales d'*E. cuniculi* avaient permis d'isoler des complexes contenant les protéines PTP1, PTP2 et PTP3 ainsi que deux autres protéines présentant des tailles de 70 kDa et 28 kDa (**Peuvel et al., 2002**). De telles expériences de cross-linking mériteraient d'être reproduites de manière à analyser par spectrométrie de masse la nature de ces protéines. Il serait en effet intéressant de montrer si PTP5 dont la taille est estimée à 27,7 kDa peut correspondre à la protéine de 28

kDa. La nature de la bande protéique de 70 kDa reste à étudier, mais n'est pas sans rappeler la taille d'une protéine de type PTP2 que nous avons identifiée chez *A. locustae*.

Des études d'interaction entre EcPTP1, EcPTP2 et EcPTP3, avaient également été initiées par double hybride mais aucune interaction entre ces protéines n'avait pu être révélée (**thèse I. Peuvel, 2002**). Nous avons donc entrepris d'étudier les interactions par co-expression chez *E. coli*. Ces premières expériences, nous ont permis de mettre en évidence des interactions entre les protéines PTP1 et PTP2. L'implication de PTP3 au sein de ce complexe reste à étudier, le clonage du gène EcPTP3 ayant échoué. Aucune interaction n'a été mise en évidence entre PTP4 et PTP5 ce qui peut s'expliquer par : (i) une réelle absence d'interaction entre ces protéines, (ii) des interactions covalentes *via* des ponts disulfure qui ne seraient pas établies dans la souche d'*E. coli* que nous avons utilisée, (iii) une liaison indirecte de PTP4-PTP5 *via* d'autres PTPs, (iv) un rôle de modifications post-traductionnelles comme la glycosylation non établie en système bactérien, ou encore (v) des conformations différentes des protéines endogènes. Etant donné que la présence de ponts disulfure semble importante pour maintenir l'architecture du tube polaire (**Weidner, 1976 ; Keohane et al., 1996 ; Delbac et al., 1998**), nous envisagerons d'utiliser la souche *E. coli* BL21 Origami (Novagen) qui permet d'améliorer la formation des liaisons disulfure. Enfin, des expériences de multi-expression chez *E. coli* donneront de plus amples informations sur les interactions entre les différents constituants du tube polaire.

Un projet visant à réaliser un inventaire à grande échelle des interactions protéine-protéine chez *E. cuniculi* par une approche double hybride à haut débit a récemment été initié. Ce projet, qui a pour objectif de mettre en évidence les conséquences de la miniaturisation d'un génome eucaryote et des protéines codées par ce génome sur la diversité des interactions protéine-protéine, contribuera aussi à la caractérisation des interactions entre PTPs, et permettra l'identification de nouveaux composants du tube polaire.

Cependant, le double hybride présente comme la co-expression, l'inconvénient de « sortir » les protéines de leur contexte physiologique. De plus, certaines modifications post-traductionnelles, qui peuvent jouer un rôle dans les interactions entre protéines, ne sont pas toujours réalisées en système hétérologue. Pour apporter de nouvelles informations sur les interactions entre PTPs et/ou pour confirmer les résultats de double hybride et de multi-expression chez *E. coli*, des expériences d'immunoprécipitation pourront être réalisées à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre chaque PTP. Des approches par chromatographie d'affinité pourront également être envisagées : elles consisteront à fixer sur une colonne, par l'intermédiaire d'un épitope, une PTP recombinante puis à déposer sur cette colonne un lysat cellulaire d'*E. cuniculi*. Les protéines accrochées à la PTP seront éluées et analysées par spectrométrie de masse. Enfin, comme nous pourrons le voir ultérieurement, le développement d'une technique de transfection des microsporidies sera très utile pour étudier les interactions entre PTPs lors de l'assemblage du tube polaire. En effet, les études réalisées en système homologue présentent l'avantage d'étudier les protéines dans leur contexte originel (repléments correct des protéines, modifications post-traductionnelles).

II.4. Biogenèse du tube polaire

Des observations ultrastructurales montrent que la biogenèse du tube polaire a lieu au cours de la phase de différenciation ou sporogonie (**Canning, 1993**). Le tube polaire résulterait de la fusion de vésicules cytoplasmiques originaires de l'appareil de Golgi (**Takvorian et Cali, 1996 ; Bigliardi et Sacchi, 2001**). Le transport intracellulaire des PTPs impliquerait la voie classique réticulum endoplasmique-appareil de Golgi. Ces données sont en accord avec la présence d'un peptide signal N-terminal pour toutes les PTPs actuellement identifiées et la glycosylation de certaines d'entre elles. Ce peptide signal est probablement

impliqué dans l'adressage des PTPs vers un compartiment cellulaire où a lieu l'assemblage des différentes sous-unités du tube polaire.

Signalons enfin qu'une participation de protéines-moteurs de type kinésine dans la mise en place du tube polaire au cours du cycle biologique d'*E. cuniculi* et dans le transfert du sporoplasme vers le cytoplasme hôte a été évoquée (DEA, V. Polonais, 2002).

Chez *E. cuniculi*, des analyses de RT-PCR indiquent que les messagers *ptp1*, *ptp2* et *ptp3* sont exprimés dès 44h après infestation des cellules hôtes puis une augmentation importante du taux de transcrits est observée ce qui est en accord avec une augmentation du nombre de cellules parasites entrant dans la phase de différenciation (Peuvel *et al.*, 2002). L'expression de l'ensemble de ces gènes au cours du cycle de développement pourra être étudiée par des expériences de RT-PCR quantitatives après séparation des stades à l'aide de gradients de Percoll, protocole récemment mis au point au laboratoire (Taupin *et al.*, 2006a).

III. Rôles potentiels de protéines de paroi et/ou du tube polaire et de résidus glucidiques dans les interactions avec l'hôte et dans la réponse immune

Il est probable qu'une étape de reconnaissance entre un ou plusieurs composants de la paroi sporale microsporidienne et de la surface de la cellule cible soit nécessaire au déclenchement de la dévagination du tube polaire. De plus, après extrusion, des interactions PTPs-récepteurs cellulaires pourraient permettre au tube de s'attacher à la membrane de la cellule hôte avant de la « traverser » et d'injecter le sporoplasme infectieux. Des composés glucidiques associés à ces différents antigènes de surface pourraient également jouer un rôle important.

III.1. Les antigènes de l'exospore

La paroi sporale, assurant l'intégrité de la spore dans l'environnement, participe aussi au processus d'invasion en permettant l'augmentation de la pression osmotique nécessaire à la dévagination du tube polaire (**Frixione et al., 1997**). De plus, les protéines entrant dans la composition de l'exospore, couche la plus externe de la paroi sporale, tiennent une place privilégiée parmi les molécules susceptibles d'interagir avec l'hôte. Cependant, peu de données sur la nature des antigènes de l'exospore sont disponibles. Ainsi, chez *Encephalitozoon cuniculi* une seule protéine, nommée SWP1, a été décrite au niveau de l'exospore (**Bohne et al., 2000**). Deux protéines de type SWP1 (EiSWP1 et EiSWP2) ont ensuite été mises en évidence chez *E. intestinalis* (**Hayman et al., 2001**). Notre travail a également montré l'existence de deux protéines de la famille SWP1 (EhSWP1a et EhSWP1b) chez *E. hellem*, la troisième espèce du genre *Encephalitozoon*. Toutes les protéines de type SWP1 sont caractérisées par un domaine N-terminal conservé et une extrémité C-terminale très divergente. Chez *E. cuniculi* la région C-terminale est composée de répétitions riches en résidus glycine et sérine (5 répétitions de 17 aa). Chez *E. intestinalis*, 50 répétitions de 12 à 15 aa riches en glutamate constituent la partie C-terminale de la protéine SWP2, alors que pour la protéine SWP1 le domaine C-terminal est extrêmement réduit (34 aa). C'est également cette partie C-terminale qui permet de distinguer les protéines EhSWP1a et EhSWP1b, la différence majeure correspondant à une insertion/délétion de 26 aa.

La variabilité importante de l'extrémité C-terminale des protéines SWP1s ainsi que son caractère hydrophile suggèrent une exposition de ce domaine vers l'extérieur de la paroi, pouvant ainsi être à l'origine d'une spécificité d'hôte. **Hayman et al., (2001)** suggèrent un rôle de l'extension C-terminale de SWP1 dans l'aspect épineux de la structure tripartite définie pour l'exospore d'*E. hellem* (**Bigliardi et al., 1996**). Cependant, des anticorps dirigés spécifiquement contre les domaines C-terminaux des 2 protéines SWP1s d'*E. hellem* sont

incapables d'inhiber l'invasion des cellules HFF *in vitro* (résultats non montrés). Ces données permettent d'émettre plusieurs hypothèses : (i) la protéine SWP1 n'est pas impliquée dans l'interaction avec l'hôte, (ii) le domaine C-terminal n'est pas exposé à la surface de la spore et n'interagit donc pas avec l'hôte, (iii) l'interaction existe mais n'est pas indispensable au processus d'invasion, (iv) l'interaction avec l'hôte se fait par l'intermédiaire de résidus glucidiques liés à SWP1. Il a en effet été montré que les protéines EcSWP1 et EiSWP1 contiennent de nombreux sites potentiels de glycosylation dans leur région C-terminale et des expériences de purification sur colonne de lectines suggèrent la présence de glycoconjugués sur ces protéines (**Hayman et al., 2001**). La glycosylation potentielle des protéines SWP1 d'*E. hellem* n'a pas été étudiée mais il faut noter que le nombre de sites de glycosylation prédits est plus faible que dans le cas des protéines d'*E. cuniculi* et *E. intestinalis*.

Les protéines SWP1s sont également caractérisées par la présence dans leur partie N-terminale de plusieurs résidus cystéine dont les positions sont conservées entre les 3 espèces du genre *Encephalitozoon*. Ceci indique la présence probable de ponts disulfure inter- ou intra-chaînes en accord avec les propriétés de dissociation de la paroi qui nécessitent l'utilisation d'agents réducteurs. Une interaction entre les protéines EiSWP1 et EiSWP2 a ainsi été mise en évidence (**Hayman et al., 2001**). L'existence de ce type d'interactions entre les protéines EhSWP1a et EhSWP1b méritera d'être démontrée.

Dans le cas d'infections par des espèces microsporidiennes appartenant au genre *Encephalitozoon*, des anticorps sont produits contre la protéine SWP1 (**Hayman et al., 2001, van Gool et al., 2004**). Cette protéine semble donc être un antigène d'intérêt pour la mise au point de tests de diagnostic sérologique. De plus, en raison d'un polymorphisme inter- et intra-spécifique important, SWP1 semble être un candidat de choix dans le cadre d'études épidémiologiques. Cependant, l'utilisation de protéines recombinantes exprimées chez *E. coli* montre que seule l'extrémité N-terminale conservée de ces protéines est reconnue par des

Marqueurs	Isolats d' <i>E. hellem</i> étudiés			
	EhDidier	V242	V257	V213
ITS ^a	Ia	Ia	Ia	Ia
ssu-ADNr ^a	IaI	Ia	Ia	Ia
PTP1 ^b	Ia	Ia	Ia	Ib
SWP1 ^c	Ia	Ia	Ia	Ib

Tableau 23. Tableau récapitulatif du polymorphisme intraspécifique identifié chez les 4 isolats d'*E. hellem* étudiés. La répartition des isolats s'appuie sur différents marqueurs de variabilité : ITS1 (Intergenic transcribed Spacer), petite sous-unité ADNr, PTP1 et SWP1. Les marqueurs ITS et petite sous-unité ADNr permettent de caractériser un seul génotype noté I. L'analyse des répétitions internes de PTP1 et de l'extrémité C-terminale de SWP1 sont des outils de génotypage plus discriminant : deux génotypes notés Ia et Ib sont ainsi caractérisés. ^a : Mathis *et al.*, 1999 ; ^b : Xiao *et al.*, 2001. ^c : notre étude.

sérums de lapins infestés par *E. hellem*. Le même type de résultats est obtenu avec des sérums de lapins infectés par *E. cuniculi*. L'absence d'anticorps dirigés contre les régions C-terminales divergentes des protéines SWP1s indique que ces domaines ne sont pas reconnus par le système immunitaire de l'hôte. Ces résultats ne sont pas en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'extrémité C-terminale serait exposée vers l'extérieur de la paroi sporale. En conclusion, un diagnostic sérologique permettant d'identifier l'espèce microsporidienne impliquée ne peut être envisagé en utilisant les protéines SWP1s, les anticorps produits lors d'une infection étant dirigés contre la région N-terminale conservée de ces protéines.

Par contre, le polymorphisme des extrémités C-terminales des protéines SWP1s d'*E. hellem* peut être un outil de génotypage intéressant dans le cadre d'études épidémiologiques (**Tableau 23**). En effet, alors que les quatre isolats humains étudiés appartiennent au génotype 1 sur la base de l'analyse de la séquence ITS1 (**Mathis et al., 1999**), l'hétérogénéité de SWP1 entre ces isolats nous a amené à proposer une subdivision du « génotype 1 » en au moins deux génotypes (Ia et Ib) comme cela avait été proposé précédemment grâce à l'étude des répétitions internes de la protéine du tube polaire PTP1 (**Xiao et al., 2001**). Nos résultats indiquent que la séquence codant la partie C-terminale des protéines SWP1s est donc un outil de génotypage aussi discriminant que PTP1 (**Peuvel et al., 2000 ; Xiao et al., 2001**). Il faut souligner que les caryotypes moléculaires de ces deux isolats montrent un fort polymorphisme, la taille des chromosomes allant de 207 à 281 kpb pour l'isolat EhDidier et de 175 à 315 kpb pour l'isolat EhCanning (**Biderre et al., 1999**). Une étude sur un plus grand nombre d'isolats devra être réalisée. La diversité des génotypes et les mécanismes impliqués dans l'apparition de polymorphisme restent énigmatiques.

Il est à souligner qu'aucun orthologue de SWP1 n'a été mis en évidence dans la base de données d'*A. locustae* probablement en raison d'une très forte divergence de ces séquences entre différents genres microsporidiens. Une protéine pariétale d'environ 40 kDa (taille

comparable à celle des protéines SWP1) a été décrite chez *P. grylli* (**Dolgikh et al., 2005**) mais aucune donnée de séquence n'a été obtenue. En revanche, certaines protéines pariétales sont conservées entre *E. cuniculi* et *A. locustae* : c'est le cas par exemple des protéines de l'endospore EnP1 (**Peuvel-Fanget et al., 2006**) et EcCDA, une chitine déacétylase putative (**Brosson et al., 2005**). Un candidat possible pour un orthologue de la protéine de l'endospore EnP2, a été également été caractérisé sur la base de la conservation de la synténie des gènes entre ces deux espèces microsporidiennes (F. Delbac, données personnelles).

III.2. Rôle de la glycosylation dans les interactions avec l'hôte

Les microsporidies ont la capacité d'envahir différents types cellulaires ce qui suggère l'existence de récepteurs ubiquistes nécessaires à l'établissement de la liaison hôte-parasite et favorisant l'invasion des cellules cibles. C'est le cas des glycanes sulfatés présents à la surface de la plupart des cellules de vertébrés. Il a récemment été démontré que la capacité d'*E. intestinalis* d'envahir différents types cellulaires peut être corrélée à sa capacité à se lier à différents types de glycosaminoglycanes, comme c'est le cas pour *T. gondii* (**Hayman et al., 2005 ; Carruthers et al., 2000**). Soulignons cependant qu'une étude récente a montré que les héparanes sulfatés ne fonctionnent pas comme des récepteurs de surface mais semblent impliqués dans la réplication intracellulaire de *T. gondii* (**Bishop et al., 2005**).

Le rôle de résidus sucrés liés à des antigènes de surface des microsporidies dans la diversité des liaisons avec l'hôte peut également être envisagé. L'utilisation de lectines en microscopie électronique montre par exemple que des glycoprotéines sont présentes au niveau de la paroi, du tube polaire et du capuchon polaire (**Taupin et al., 2006b**). Les protéines de la paroi sporale SWP1 et SWP2 d'*E. intestinalis* ou la protéine du tube polaire PTP1 d'*E. hellem* sont des protéines pour lesquelles une glycosylation a été mise en évidence (**Hayman et al., 2001 ; Xu et al., 2004**). Cette modification post-traductionnelle de PTP1 est retrouvée chez

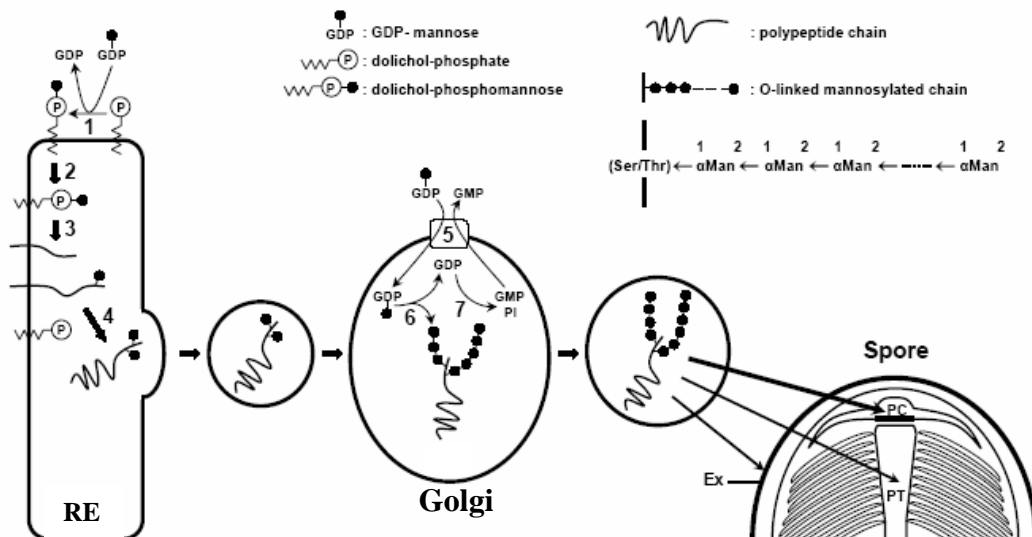


Figure 78. Représentation schématique de la voie de O-mannosylation chez les microsporidies déduite de l'analyse du génome, de l'analyse de la nature des sucres et des expériences de localisation des glycoprotéines. (1) Au niveau du Réticulum Endoplasmique (RE) la synthèse débute par la synthèse du Dolichol-P-Mannose du coté cytoplasmique. de la membrane du RE puis celui-ci est transféré dans la lumière du RE (2). (3) Le résidu mannose du Dolichol-P-mannose est lié au polypeptide naissant. (4) Fin de la synthèse protéique suivie du transport de la protéine vers l'appareil de Golgi. (5) Entrée du GDP-Mannose dans la lumière de l'appareil de Golgi couplée à la sortie de GMP. (6) Addition d'un résidu mannose en $\alpha(1,2)$ couplée à la libération de GDP. (7) Hydrolyse du GDP en GMP. Les mannoprotéines finales sont exportées vers les structures majeures de la spore : le capuchon polaire (PC), l'exospore (Ex) et le tube polaire (PT) (d'après Taupin *et al.*, 2006b).

les autres espèces du genre *Encephalitozoon*, mais aussi chez *Glugea americanus* ou *Brachiola algerae* (Xu *et al.*, 2004). Nous avons montré que c'est également le cas des protéines PTP1s d'*A. locustae* et *P. grylli*. Certaines de ces protéines pourraient donc servir de ligands pour l'établissement d'une liaison avec la cellule-hôte. Enfin, une modification de la protéine Al70 de type glycosylation peut aussi être envisagée. En effet, cette protéine présente de nombreux sites potentiels de O-glycosylation (43) et un défaut de migration, qui rappelle le cas des protéines PTP1, a été mis en évidence (70 kDa au lieu des 53 kDa calculés). Cependant, Al70 n'a pas été identifiée après purification sur colonne de ConA ce qui suggère un autre type de glycosylation.

Une analyse globale de la glycosylation chez *E. cuniculi* et *A. locustae* montre : (i) la présence de O-glycosylation et l'absence probable de N-glycosylation, en adéquation avec les données de séquençage des génomes de ces 2 microsporidies, (ii) la présence de mannose comme monosaccharide majeur associé aux protéines, (iii) la présence de chaînes linéaires de 2 à 8 mannoses liés en α 1,2 (Taupin *et al.*, 2006b). La voie de biosynthèse des mannoprotéines proposée chez les microsporidies commence dans le RE et se poursuit dans l'appareil de Golgi comme pour *S. cerevisiae* (Fig. 78).

Nous avons mis en évidence des différences de réaction avec les lectines : AlPTP1 et PgPTP1 sont en effet reconnues par les lectines ConA et GNA alors que EhPTP1 n'est reconnue que par la ConA (Xu *et al.*, 2004). La lectine GNA reconnaît préférentiellement le mannose terminal lié en α 1-3 sur un autre mannose. Or l'analyse des liaisons chez *E. cuniculi* et *A. locustae* n'a permis de montrer que la présence de résidus mannose liés en α 1-2 et aucune α 1-3 mannosyltransferase n'a été identifiée dans les génomes de ces microsporidies. La nature de ces liaisons reste à découvrir, la présence des résidus mannoses liés en α 1-3 ne pouvant être exclue parmi une majorité de mannoses liés en α 1-2.

La présence de résidus sucrés sur les protéines de paroi et/ou du tube polaire interviendrait dans la stabilisation des protéines en les protégeant de la dégradation par exemple dans le tractus digestif des hôtes et lors des interactions avec des récepteurs de l'hôte. Une liaison entre les résidus mannose de PTP1 et un récepteur liant le mannose présent à la surface de la cellule hôte a récemment été suggéré (**Xu et al., 2004**). Signalons enfin qu'en plus d'un rôle dans l'invasion, les glycoconjugués sont parfois impliqués dans la réponse immunitaire. Ainsi, des patients infestés par *E. intestinalis* ont développé une réponse immunitaire de type IgG contre une partie glycosylée de PTP1 (**Peek et al., 2005**). Cependant, ceci ne semble pas toujours être le cas, la protéine EcPTP1 recombinante non glycosylée pouvant être reconnue par le sérum de patients infestés par *E. cuniculi* (**van Gool et al., 2004**).

IV. Difficultés rencontrées dans la mise au point de la transfection d'*Encephalitozoon cuniculi*

Un des objectifs de mon travail était de mettre au point une stratégie de transfection d'*E. cuniculi* nécessaire pour des études fonctionnelles par génétique inverse. Le développement d'une telle technique présente deux principales difficultés : (i) les microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires ; (ii) le stade infectieux, résistant dans le milieu extracellulaire, est une spore délimitée par une paroi très épaisse et résistante à de nombreux traitements. Cette spore a l'avantage d'être facilement accessible car elle est libérée dans le milieu de culture après lyse des cellules infestées. Cependant, il faut souligner que la lyse des cellules permet également la libération de divers stades parasitaires en cours de différenciation, le cycle de développement des microsporidies étant asynchrone. Rappelons enfin que seul le stade sporal est capable d'envahir une nouvelle cellule hôte après extrusion du tube polaire, initiant ainsi un nouveau cycle de développement.

IV.1. Stratégies de transfection utilisées

Trois techniques de transformation ont été utilisées au cours de notre étude : la magnétofection, l'électroporation et la biolistique. Nous avons privilégié l'utilisation de l'électroporation, technique largement utilisée pour la transfection des parasites. Les essais réalisés par électroporation à partir de parasites libérés dans le surnageant de culture, semblent montrer que seuls certains stades sont transformés. Ces stades parasitaires, détectés uniquement dans le milieu extracellulaire semblent incapables de ré-initier un nouveau cycle. Les analyses en IFA indiquent qu'aucun parasite présent dans les vacuoles parasitophores n'exprime le transgène. De la même manière aucune fluorescence n'a été détectée dans les spores libres. Ces résultats peuvent être interprétés de 2 manières : (i) les stades parasitaires possédant une paroi très épaisse sont difficilement « transfectables »; (ii) le transgène est exprimé mais la paroi empêche la pénétration des anticorps et donc la détection des transgènes en IFA. Il a en effet été montré que la faible perméabilisation de la paroi microsporidienne est une limite à l'utilisation de la technique d'IFA (**Peuvel et al., 2002**). Pour la mise en évidence de transformants, il semble donc nécessaire de faire une recherche systématique de la transcription du transgène par RT-PCR, et/ou de détecter la présence des protéines en Western blot. Une approche alternative pour la transfection consisterait, avant le choc électrique, à réaliser un prétraitement des spores, à l'aide de détergents par exemple, de manière à « perméabiliser » la paroi dans le but d'obtenir des « sphéroblastes ». L'utilisation de plusieurs détergents tels que le Triton ou le Tween 20 qui ne modifient pas la capacité des spores à envahir les cellules hôtes pourra être envisagée.

Des essais de transfection ont également été réalisés à partir de cellules infestées. Ces cellules contiennent l'ensemble des stades de développement regroupés au sein de vacuoles parasitophores. Une stratégie de transfection de globules rouges infestés avait été décrite chez *Plasmodium falciparum* (**Wu et al., 1995**), les parasites étant capables d'importer de façon

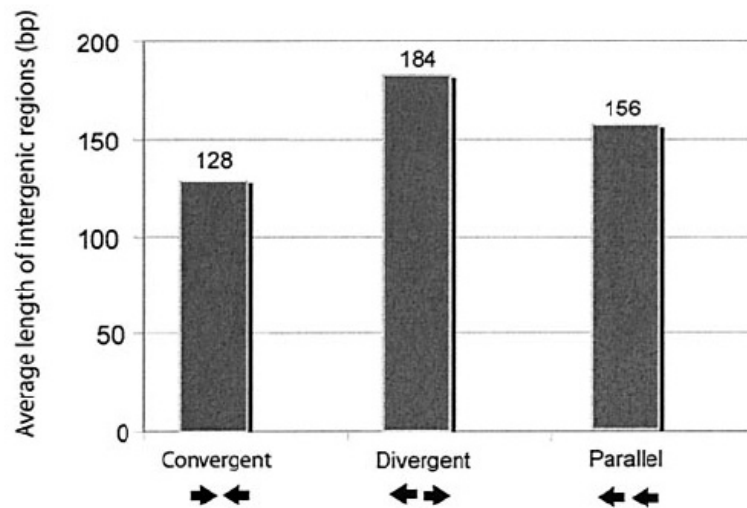


Figure 79. Compaction du génome d'*E. cuniculi* et régions intergéniques. Les espaces intergéniques sont en moyenne très courts (129 pb). Cependant, leur longueur varie selon l'orientation des gènes. Les histogrammes représentent la taille moyenne en pb des régions intergéniques chez *E. cuniculi* pour les trois orientations possibles des deux gènes. Ce graphe est basé sur l'analyse des 1771 régions intergéniques obtenues à partir du séquençage du génome par Katinka *et al.* (2001). Les gènes répétés ainsi que les CDS subtelomériques ne sont pas pris en compte (d'après Keeling et Slamovits, 2004).

spontanée l'ADN à partir du cytoplasme des globules rouges (**Deitsch et al., 2001**). Cependant, les conditions de choc électrique doivent être adaptées pour ne pas détruire les cellules hôtes ainsi que les vacuoles parasitophores. Les différents essais que nous avons réalisés ne nous ont pas permis d'obtenir de transformant.

Nos résultats indiquent que l'efficacité de transfection reste très faible suggérant que l'électroporation n'est peut être pas la meilleure technique pour transformer les microsporidies. Récemment, une technique adaptée de l'électroporation, appelée nucléofection, a été mise au point. Principalement utilisée dans le cas de lignées primaires (**Gresch et al., 2004**) ou de cellules difficiles à transformer (**Maasho et al., 2004**), elle permet le transfert de l'ADN directement dans le noyau de la cellule ce qui entraîne une rapide expression du transgène. Cette technique a été appliquée à *Plasmodium berghei* (**Janse et al., 2006**) et *P. yoelii* (**Jongco et al., 2006**) améliorant l'efficacité de transformation de façon considérable (de 10^{-6} - 10^{-9} jusqu'à 10^{-2} - 10^{-3}) à l'aide de faible quantité d'ADN (5 µg) par rapport à l'électroporation classique. L'utilisation de cette technique dans le cas des microsporidies est à envisager. La biolistique pourrait également être une alternative bien que nos premiers essais se soient avérés négatifs.

IV.2. Régions génomiques et signaux de transcription

N'ayant pas de données précises sur les promoteurs chez les microsporidies et sur les signaux d'initiation de transcription et de traduction, nous avons choisi des régions de taille variable (600 à 1200 pb) en amont de 2 gènes codant pour la β -tubuline et EnP1, une protéine de la paroi sporale. Il est important de souligner que le génome d'*E. cuniculi* est caractérisé par une extrême compaction des gènes qui a pour conséquence une réduction des espaces intergéniques. Une analyse à l'échelle du génome complet d'*E. cuniculi* montre en moyenne des espaces de 156 pb entre deux CDS ayant la même orientation (**Fig. 79, Keeling et**

Slamovitz, 2004), suggérant une possible organisation en opérons de certains gènes. Cette réduction des espaces intergéniques suggère également que les signaux de régulation de la transcription doivent chevaucher les régions codantes des gènes adjacents. La présence d'opérons est largement décrite chez les procaryotes. En revanche, chez les eucaryotes, cette organisation n'est décrite que dans quelques cas isolés comme chez *Trypanosoma* ou *Caenorhabditis elegans* (**Blumenthal, 2004**). Une étude récente indique que la compaction du génome nucléaire chez les nucléomorphes *Guillardia theta* (551 kpb) et *Bigelowiella natans* (380 kpb) résulte en une organisation polycistronique des transcrits (**Williams et al., 2005**). Dans cette même étude, la présence de messagers contenant plusieurs gènes est démontrée chez la microsporidie *A. locustae* dont le génome est également très réduit (environ 5 Mpb). Chez *E. cuniculi*, des expériences de RACE-PCR ont également permis de révéler la présence de transcrits polycistroniques pour de nombreux gènes (E. Peyretailade, communication personnelle). De ce fait, un contrôle des « régions promotrices » choisies pour nos expériences de transfection a été effectué afin de s'assurer que ces régions ne correspondent pas à des régions appartenant à un polycistron, et donc, à des régions dénuées de signaux de transcription. L'analyse des régions promotrices choisies (600 et 1200 pb en amont du gène de la β -tubuline, 1200 pb en amont du gène codant EnP1) révèle la présence d'espaces intergéniques associés à des gènes situés sur le brin complémentaire. Les régions choisies contiennent probablement les signaux nécessaires à la transcription. Les récents résultats concernant la transcription des gènes microsporidiens impliquent tout de même de devoir améliorer la définition des régions promotrices et terminatrices afin de pouvoir améliorer la transcription des transgènes.

Des fusions transcriptionnelles et des fusions traductionnelles ont été réalisées. En effet, dans de nombreux cas de transfection, l'expression d'un transgène hétérologue comme la GFP n'est pas détectée en IFA ou en western blot alors qu'une transcription est mise en évidence.

Ceci suggère un problème au cours de la traduction qui nécessite de réaliser des fusions traductionnelles : c'est par exemple le cas de la GFP chez *T. gondii* dont le gène est fusionné en N-terminal par exemple avec la séquence codante de SAG1 (**Striepen et al., 1998**). Un autre problème est le biais des codons qui oblige à réaliser des changements pour permettre l'expression du transgène (**Hettmann et al., 2000**). Dans notre cas, l'utilisation de fusions transcriptionnelles ou traductionnelles avec la GFP ne nous a pas permis de conclure quant à l'utilisation de ce gène rapporteur chez *E. cuniculi*.

Des essais de transfection avec des transgènes sous forme circulaire ou linéaire ont été réalisés mais quelle que soit la conformation de l'ADN, aucune différence d'efficacité n'a pu être mise en évidence. L'utilisation de la stratégie REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) qui consiste à introduire simultanément, lors de l'électroporation, une enzyme de restriction avec les plasmides linéarisés pourra être envisagée, cette stratégie stimulant l'efficacité de transformation de *S. cerevisiae* (**Schiestl et Petes, 1991**), *Dictyostelium* (**Kuspa et Loomis, 1992**) ou *T. gondii* (**Black et al., 1995**).

IV.3. Stratégies de sélection pour une transfection stable

La mise au point d'une transfection transitoire présentant un intérêt limité, nous nous sommes intéressés à mettre en place des stratégies de transfection stable. Les stratégies utilisées classiquement pour les protozoaires sont inefficaces contre *E. cuniculi* : le chloramphénicol n'a par exemple aucun effet sur le développement du parasite. L'absence d'action de la pyriméthamine peut s'expliquer par le fait que les gènes DHFR et TS sont séparés chez *E. cuniculi*, ce qui n'est pas le cas chez *T. gondii* ou *P. falciparum*. Trois stratégies ont été envisagées : la création de « mutants résistants » à l'albendazole ou à la fumagilline, et la complémentation à l'auxotrophie pour le tryptophane.

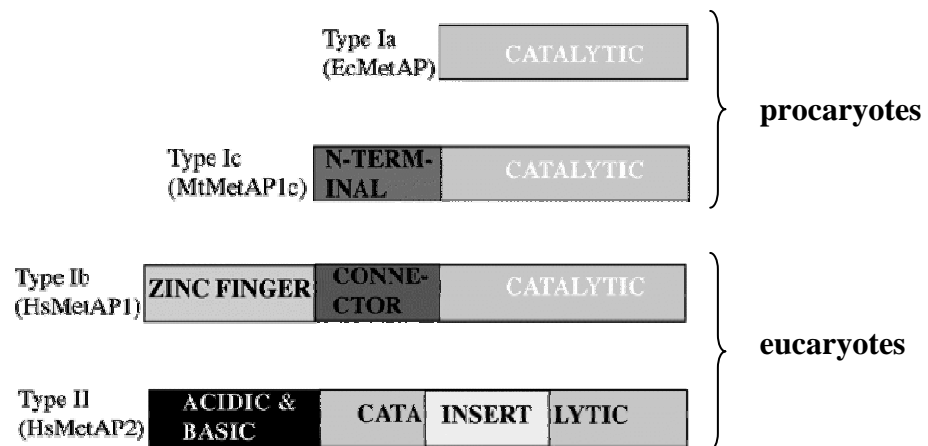


Figure 80. Représentation schématique de la structure des méthionines aminopeptidases. Les domaines catalytiques sont en gris clair. Trois types de MetAP1 ont été décrits : Ia et Ic sont retrouvés chez les procaryotes. La MetAPIa, retrouvée chez *E. coli*, est constituée seulement d'un domaine catalytique. La MetAPIc, identifiée chez *Mycobacterium tuberculosis* présente une extension N-terminale de 40 aa. Enfin, la MetAPIb identifié chez les eucaryotes présentant une région de 50 aa (connector) associée à une région N-terminale en doigt de Zinc de 120 aa. Les eucaryotes présentent également une MetAPII caractérisée par une extension de 60 aa dans le domaine catalytique. La MetAP2 humaine contient un bloc de résidus polybasiques et polyacides organisés en hélice. Les extensions N-terminales seraient impliquées dans la liaison aux ribosomes. Ec : *Escherichia coli*; Mt : *Mycobacterium tuberculosis*; Hs : *Homo sapiens* (d'après Adlagatta *et al.*, 2005).

IV.3.1. Résistance à l'albendazole par mutagenèse de la β -tubuline

L'une des cibles des benzimidazoles est la β -tubuline. De nombreuses études réalisées chez des champignons modèles ont permis de mettre en évidence 6 acides aminés impliqués dans l'activité benzimidazole : His6, Ala165, Phe167, Glu198, Phe200 et Arg241, les 2 positions His6 et Phe200 semblant jouer un rôle prépondérant (**Thomas *et al.*, 1985 ; Orbach *et al.*, 1986 ; Jung et Oakley, 1990 ; Fujimura *et al.*, 1992 ; Jung *et al.*, 1992 ; Li *et al.*, 1996**). Bien que ces 6 aa soient importants pour l'interaction avec les benzimidazoles, le site de liaison reste inconnu. Chez *Cryptococcus neoformans*, des mutants résistants à l'albendazole présentent cinq mutations : His6 en Gln, Ala165 en Val, Phe167 en Tyr, Phe200 en Tyr et Arg241 en His (**Cruz et Edlind, 1997**). Nous avons choisi de ne muter que les deux positions identifiées comme jouant un rôle prépondérant dans la résistance aux benzimidazoles chez les champignons (His6 et Phe200). Cependant, après transfection et sélection en présence d'albendazole, aucun transformant stable n'a pu être mis en évidence.

IV.3.2. Résistance à la fumagilline par complémentation avec la MetAP1 d'*E. coli*

Chez les eucaryotes, les protéines synthétisées dans le cytosol sont initiées par une méthionine dont le clivage est réalisé par des méthionines aminopeptidases (MetAPs). Les eucaryotes présentent deux isoformes de ces métalloexopeptidases : MetAP1 et MetAP2 (**Fig. 80**). La MetAP2 est inactivée par la fumagilline et ses dérivés (TNP 470), composés présentant 2 groupements époxydes fixés sur un cycle cyclohexane capables d'établir une liaison covalente avec le site catalytique à l'origine de l'inhibition (**Griffith *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1998, Lowther et Matthews, 2000**). La récente comparaison des sites actifs des MetAP1 et MetAP2 humaines a montré que la poche du site actif de MetAP1 est plus petite : un accès limité au site actif explique la spécificité de la fumagilline pour les MetAP2

(Addlagatta *et al.*, 2005). Chez *S. cerevisiae*, les simples mutants Δ MetAP1 ou Δ MetAP2 sont viables ce qui n'est pas le cas des doubles mutants Δ MetAP1/ Δ MetAP2. En présence de fumagilline, les levures sauvages ainsi que les mutants Δ MetAP2 sont capables de se développer alors qu'un phénotype létal est obtenu avec les mutants Δ MetAP1 (Li et Chang, 1995).

Au niveau du génome d'*E. cuniculi*, seul une gène codant une MetAP2 a été identifié. L'absence de MetAP1 pourrait expliquer la capacité de la fumagilline à inhiber la croissance d'*E. cuniculi* car la perte de fonction de MetAP2 ne peut être compensée. De plus, l'ensemble des résidus impliqués dans la liaison avec la fumagilline sont conservés (Pandrea *et al.*, 2005). Nous avons donc envisagé de compléter les microsporidies avec le gène codant la MetAP1 d'*E. coli* et de sélectionner les transformants en présence de fumagilline. Aucun transformant n'a cependant été caractérisé. Une complémentation à l'aide du gène codant pour la MetAP1 de *S. cerevisiae* serait peut-être préférable. En effet, les MetAP1 procaryotes et eucaryotes présentent des différences structurales (Fig. 80) : la MetAP1 d'*E. coli* présente seulement un domaine catalytique alors que chez les MetAP1 eucaryotes un domaine en doigt de zinc est associé au domaine catalytique. Cette région joue un rôle important puisqu'une délétion de cette extension ralentit la croissance chez la levure (Zuo *et al.*, 1995).

Les sites d'actions de l'albendazole et de la fumagilline n'étant pas totalement définis, une stratégie de mutagenèse pourra être envisagée. En effet, l'utilisation d'un agent mutagène, le N-nitroso-N-éthylurée (ENU) a permis de générer des mutants résistants à la cytochalasine D. Ces mutants présentent une mutation ponctuelle au niveau du gène codant l'actine ce qui permet de déterminer les bases du mécanisme d'action de la cytochalasine D (Dobrowolski et Sibley, 1996).

IV.3.3. Complémentation de l'auxotrophie au tryptophane

La troisième stratégie envisagée est basée sur des expériences réalisées chez *T. gondii*. La nécessité d'utiliser le tryptophane de la cellule hôte permet d'obtenir une inhibition efficace du développement de *T. gondii in vitro* lorsque l'on déplete le milieu en tryptophane grâce à l'action de l'IFN- γ (Pfefferkorn, 1984). Le développement de *T. gondii* est restauré en réalisant une complémentation avec le gène codant la *trpB* d'*E. coli* (Sibley *et al.*, 1994). Le séquençage du génome d'*E. cuniculi* a permis de mettre en évidence l'absence de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du tryptophane suggérant que les parasites utilisent le tryptophane de la cellule hôte. Ayant constaté qu'une déplétion en tryptophane peut inhiber le développement d'*E. cuniculi*, nous avons donc choisi d'appliquer cette stratégie chez *E. cuniculi*. Aucun transformant stable n'a cependant été caractérisé.

Conclusions et

perspectives

Conclusions et perspectives

Les microsporidies se distinguent de nombreux autres parasites eucaryotes par leur capacité à infester un large spectre d'hôtes, mais surtout par un mécanisme d'invasion unique impliquant une structure particulière, le tube polaire. De manière à apporter de plus amples informations sur cette structure originale, une partie de mon travail a consisté en la mise en évidence de nouvelles protéines du tube polaire chez *Encephalitozoon cuniculi* et en des analyses comparatives chez deux espèces microsporidiennes parasites d'insectes, *Antonospora locustae* et *Paranosema grylli*.

La forte conservation de la synténie des gènes entre les génomes d'*E. cuniculi* et d'*A. locustae* nous a permis d'identifier des orthologues des protéines PTP1 et PTP2, deux protéines du tube polaire antérieurement décrites chez les trois espèces du genre *Encephalitozoon*. Signalons que le degré de divergence de ces séquences entre ces deux microsporidies est très important et qu'aucun motif caractéristique n'a pu être mis en évidence. L'identification des séquences complètes des gènes *ptp1* et *ptp2* chez *P. grylli* et la comparaison avec *A. locustae* confirme que ces deux espèces microsporidiennes sont relativement proches et pourraient être classées au sein d'un même genre. Le séquençage en cours des génomes des microsporidies *Nosema bombycis* et *Brachiola algerae* devrait également nous donner des informations supplémentaires sur la conservation de la synténie des gènes *ptp1* et *ptp2* mais aussi sur le degré d'évolution de ces séquences. De manière générale, la synténie s'avère être un bon outil pour participer à l'annotation de génomes microsporidiens notamment lorsque les séquences sont fortement divergentes, comme cela semble être le cas pour les protéines constitutives du tube polaire. Rappelons toutefois qu'une troisième PTP (PTP3) avait été identifiée chez *E. cuniculi* et que cette protéine semble beaucoup plus conservée que PTP1 et PTP2, comme le montre la séquence partielle mise en

évidence sur un contig d'*A. locustae*. L'identification de la séquence complète de cette protéine permettra une analyse comparative plus précise.

Nous avons également identifié deux nouvelles protéines du tube polaire, que nous avons nommées PTP4 et PTP5, et qui sont codées par des gènes dont l'ordre est également conservé entre les microsporidies *E. cuniculi*, *A. locustae* et *P. grylli*. Ces deux protéines ne présentent aucune homologie de séquence avec les bases de données et constituent de nouvelles familles de protéines. La découverte de nouvelles PTPs témoigne de la complexité structurale de cet appareil d'invasion, et de la nécessité de continuer à identifier de nouvelles protéines dans le but de mieux comprendre l'architecture du tube polaire.

Outre son rôle dans le transfert du sporoplasme après pénétration de la membrane de la cellule cible, le tube polaire pourrait également être impliqué dans la reconnaissance de la cellule cible *via* certains de ces composants. La localisation de la protéine PTP4 d'*A. locustae* à l'extrémité des tubes polaires dévaginés fait de cette protéine un candidat potentiel à des interactions avec des récepteurs de l'hôte. Son rôle méritera donc d'être précisé.

Des analyses antérieures indiquent que les protéines PTP1, PTP2 et PTP3 font partie d'un même complexe stabilisé par des ponts disulfure et des interactions ioniques. Les études de co-expression que nous avons menées confirment que des interactions existent entre PTP1 et PTP2 qui sont considérées comme les antigènes majeurs du tube polaire. Afin d'étudier les interactions protéiques mises en jeu lors de l'assemblage du tube polaire ainsi que les domaines protéiques impliqués, des études de multi-expression chez *E. coli* seront poursuivies et complétées par d'autres approches telles que l'immunoprécipitation ou le double-hybride. Ces analyses ainsi que la mise en place de protocoles de purification de tubes polaires pourraient représenter un moyen efficace pour identifier d'autres constituants. La caractérisation des interactions entre les différents partenaires du tube polaire permettra à terme de proposer un modèle d'organisation de cette structure originale.

L'étude des interactions hôte-parasite nous a également conduit à nous intéresser aux protéines de l'exospore de type SWP1 chez l'espèce *Encephalitozoon hellem*. De par leur localisation à la surface de la paroi sporale, ces antigènes sont susceptibles de jouer un rôle dans les interactions avec l'hôte mais sont aussi des candidats pour la mise au point de tests de diagnostic sérologique. Des amplifications PCR successives utilisant des amorces déterminées au niveau des régions conservées entre les gènes *swp1* d'*E. cuniculi* et *E. intestinalis*, nous ont permis d'identifier deux gènes homologues chez *E. hellem*. Il sera intéressant de montrer si ces 2 protéines sont susceptibles de former un complexe comme c'est le cas pour les glycoprotéines SWP1 et SWP2 d'*E. intestinalis* et si elles jouent un rôle dans la reconnaissance de récepteurs cellulaires. La comparaison des protéines de la famille SWP1 chez les trois espèces du genre *Encephalitozoon* indique une forte divergence des régions C-terminales. Cette caractéristique fait de ces protéines de bons marqueurs de souches dans le cadre d'études épidémiologiques. Cependant, ces régions C-terminales ne constituent pas de bons antigènes pour le développement d'un diagnostic sérologique permettant la discrimination d'espèce. L'identification de nouvelles protéines constituant la paroi et plus particulièrement l'exospore s'avère nécessaire afin, d'une part, de caractériser les molécules pouvant interagir avec la cellule hôte et, d'autre part, d'identifier de nouveaux antigènes utilisables pour un sérodiagnostic spécifique d'espèce.

Nos travaux nous ont donc permis d'identifier un certain nombre de nouveaux acteurs protéiques entrant dans la constitution du tube polaire et/ou impliqués dans le processus de reconnaissance de l'hôte. Cependant, les mécanismes à l'origine de l'assemblage de ces constituants, ou de l'extrusion du tube polaire restent hypothétiques. Pour compléter nos connaissances sur ces protéines, leurs modifications post-traductionnelles (glycosylation) tout comme leur structure spatiale par RMN ou par cristallographie aux rayons X devront être élucidées. De plus, l'étude de l'appareil d'invasion ne peut se limiter à la caractérisation des

protéines du tube polaire. Les constituants de deux autres éléments structuraux, le capuchon polaire et le polaroplaste, étroitement liés à la mise en place du tube polaire et à la germination, restent donc à étudier.

Enfin un objectif majeur de mon travail a été de mettre au point une technique de transfection d'*E. cuniculi*. De nombreuses constructions ont pu être réalisées et testées initiant ainsi les premiers essais de transfection de cette microsporidie. Bien que les techniques utilisées se soient avérées peu efficaces, ces travaux méritent d'être poursuivis afin d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche par des approches de génétique inverse. Des analyses fonctionnelles des PTPs dans l'assemblage du tube polaire et dans les processus d'extrusion et d'invasion pourraient aussi être abordées.

Références **bibliographiques**

Références bibliographiques

- Addlagatta A., Hu X., Liu J.O., Matthews B.W. 2005.** Structural basis for the functional differences between type I and type II human methionine aminopeptidases. *Biochemistry*, 44(45), 14741-9.
- Al-Anouti F., Ananvoranich S. 2002.** Comparative analysis of antisense RNA, double-stranded RNA, and delta ribozyme-mediated gene regulation in *Toxoplasma gondii*. *Antisense Nucleic Acid. Drug. Dev.*, 12(4), 275-81.
- Al-Anouti F., Quach T., Ananvoranich S. 2003.** Double-stranded RNA can mediate the suppression of uracil phosphoribosyltransferase expression in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 302(2), 316-23.
- Alibu V.P., Storm L., Haile S., Clayton C., Horn D. 2005.** A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 139(1), 75-82.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3), 403-10.
- Anderson I., Sorokin A., Kapatral V., Reznik G., Bhattacharya A., Mikhailova N., Burd H., Joukov V., Kaznadzey D., Walunas T., Markd'Souza, Larsen N., Pusch G., Liolios K., Grechkin Y., Lapidus A., Goltsman E., Chu L., Fonstein M., Ehrlich S.D., Overbeek R., Kyrpides N., Ivanova N. 2005.** Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 250(2), 175-84.
- Balu B., Shoue D.A., Fraser M.J. Jr, Adams J.H. 2005.** High-efficiency transformation of *Plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element piggyBac. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 102(45), 16391-6.
- Beckers P.J., Derks G.J., Gool T., Rietveld F.J., Sauerwein R.W. 1996.** *Encephalitozoon intestinalis*-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.*, 34(2), 282-5.
- Bentley S.D., Parkhill J. 2004.** Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 771-92.
- Biderre C., Pages M., Méténier G., Canning E.U., Vivarès C.P. 1995.** Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 74(2), 229-31.
- Bigliardi E., Selmi M.G., Lupetti P., Corona S., Gatti S., Scaglia M., Sacchi L. 1996.** Microsporidian spore wall: ultrastructure findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *Eukaryot. Microbiol.*, 43, 181-186.
- Bigliardi E., Bernuzzi A.M., Corona S., Gatti S., Scaglia M., Sacchi L. 2000.** *In vitro* efficacy of nikkomycin Z against the human isolate of the microsporidian species *Encephalitozoon hellem*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44(11), 3012-6.
- Bigliardi E., Sacchi L. 2001.** Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect.*, 3(5), 373-9.
- Bishop J.R., Crawford B.E., Esko J.D. 2005.** Cell surface heparan sulfate promotes replication of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, 73(9), 5395-401.
- Black M., Seeber F., Soldati D., Kim K., Boothroyd J.C. 1995.** Restriction enzyme-mediated integration elevates transformation frequency and enables co-transfection of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 74(1), 55-63.
- Black M.W., Boothroyd J.C. 1998.** Development of a stable episomal shuttle vector for *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.*, 273(7), 3972-9.
- Blumenthal T. 2004.** Operons in eukaryotes. *Brief Funct. Genomic Proteomic*, 3(3), 199-211.
- Bohne W., Ferguson D.J.P., Kohler K., U. Gross. 2000.** Developmental expression of tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect. Immun.*, 68, 2268-2275.
- Bontems F., le Floch P., Duffieux F., Biderre C., Peyret P., Lallemand J.Y. 2003.** Homology modeling and calculation of the cobalt cluster charges of the *Encephalitozoon cuniculi* methionine aminopeptidase, a potential target for drug design. *Biophys. Chem.*, 105(1), 29-43.

- Brecht S., Erdhart H., Soete M., Soldati D. 1999.** Genome engineering of *Toxoplasma gondii* using the site-specific recombinase Cre. *Gene*, 234(2), 239-47.
- Brooks D.R., McCulloch R., Coombs G.H., Mottram J.C. 2000.** Stable transformation of trypanosomatids through targeted chromosomal integration of the selectable marker gene encoding blasticidin S deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 186(2), 287-91.
- Brosson D., Kuhn L., Prensier G., Vivarès C.P., Texier C. 2005.** The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: a surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 247(1), 81-90.
- Brosson D., Kuhn L., Delbac F., Garin J., P Vivarès C., Texier C. 2006.** Proteomic analysis of the eukaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics*. 6(12), 3625-35.
- Broussolle V., Fumel S., Peyret P., Vivarès C.P. 1999.** Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a host cell-microsporidian *E. cuniculi* interaction. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46(5), 25S-26S.
- Cali A., Takvorian P.M. 1999.** Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. p. 85-128. In M. Wittner, and L. M. Weiss (Eds). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Canning E.U. 1953.** A new microsporidian, *Nosema locustae* n.sp., from the fat body of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* R. & F. *Parasitology*, 43(3-4), 287-90.
- Canning, E. U., J. Lom. 1986.** *The Microsporidia of Vertebrates*. Academic Press, New York. 1-289.
- Canning E. U., Curry A., Lacey C. J. N., Fenwick J. D. 1992.** Ultrastructure of *Encephalitozoon* sp. infecting the conjunctival, corneal and nasal epithelia of a patient with AIDS. *Europ. J. Protistol.*, 28, 226-237.
- Canning E.U. 1993.** Microsporidia. In: "Parasitic Protozoa" (Kreier J.P., ed), vol 6, Academic Press, London, 299-370.
- Canning E.U., Okamura B. 2004.** Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Adv. Parasitol.*, 56, 43-131.
- Carlton J.M., Vinkenoog R., Waters A.P., Walliker D. 1998.** Gene synteny in species of *Plasmodium*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 93(2), 285-94.
- Carlton J.M., Galinski M.R., Barnwell J.W., Dame J.B. 1999.** Karyotype and synteny among the chromosomes of all four species of human malaria parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 101(1-2), 23-32.
- Carlton J.M., Angiuoli S.V., Suh B.B., Kooij T.W., Pertea M., Silva J.C., Ermolaeva M.D., Allen J.E., Selengut J.D., Koo H.L., Peterson J.D., Pop M., Kosack D.S., Shumway M.F., Bidwell S.L., Shallom S.J., van Aken S.E., Riedmuller S.B., Feldblyum T.V., Cho J.K., Quackenbush J., Sedegah M., Shoaibi A., Cummings L.M., Florens L., Yates J.R., Raine J.D., Sinden R.E., Harris M.A., Cunningham D.A., Preiser P.R., Bergman L.W., Vaidya A.B., van Lin L.H., Janse C.J., Waters A.P., Smith H.O., White O.R., Salzberg S.L., Venter J.C., Fraser C.M., Hoffman S.L., Gardner M.J., Carucci D.J. 2002.** Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*, 419(6906), 512-9.
- Carruthers V.B., Hakansson S., Giddings O.K., Sibley L.D. 2000.** *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infect. Immun.*, 68(7), 4005-11.
- Cavalier-Smith T. 1987.** Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*, 326, 332-3.
- Chioralia G., Trammer T., Maier W. A., Seitz H. M. 1998.** Morphologic changes in *Nosema algerae* (Microspora) during extrusion. *Parasitol Res*, 84, 123-131.
- Clayton C.E. 1999.** Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol. Today*, 15(9), 372-8.
- Clouthier S.C., Gunning D.J., Olafson R.W., Kay W.W. 1997.** Antigenic characterization of *Henneguya salminicola*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 90(2), 543-8.
- Conteas C.N., Berlin G.W., Lariviere M.J., Pandhumas S.S., Speck C.E., Porschen R., Nakaya T. 1998.** Examination of the prevalence and seasonal variation of intestinal microsporidiosis in the stools of persons with chronic diarrhea and human immunodeficiency virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58(5), 559-561.
- Couzinet S., Cejas E., Schittny J., Deplazes P., Weber R., Zimmerli S. 2000.** Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by non-professional phagocytes. *Infect. Immun.*, 68(12), 6939-45.

- Coyle C., Kent M., Tanowitz H.B., Wittner M., Weiss L.M. 1998.** TNP-470 is an effective antimicrosporidial agent. *J. Infect. Dis.*, 177(2), 515-8.
- Crabb B.S., Cowman A.F. 1996.** Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93(14), 7289-94.
- Crabb B.S., Triglia T., Waterkeyn J.G., Cowman A.F. 1997.** Stable transgene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 90(1), 131-44.
- Crabb B.S. 2002.** Transfection technology and the study of drug resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Drug. Resist. Updat.*, 5(3-4), 126-30.
- Cruz A., Beverley S.M. 1990.** Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature*, 348(6297), 171-3.
- Cruz A., Coburn C.M., Beverley S.M. 1991.** Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88(16), 7170-4.
- Cruz M.C., Edlind T. 1997.** beta-Tubulin genes and the basis for benzimidazole sensitivity of the opportunistic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 143(Pt 6), 2003-8.
- Curgy J., Vavra J., Vivarès C.P. 1980.** Presence of ribosomal ARN with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol. Cell.*, 38, 49-52.
- da Silva A.J., Schwartz D.A., Visvesvara G.S., de Moura H., Slemenda S.B., Pieniazek N.J. 1996.** Sensitive PCR diagnosis of Infections by *Enterocytozoon bienewisi* (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *J. Clin. Microbiol.*, 34(4), 986-7.
- Davis-Hayman S.R., Nash T.E. 2002.** Genetic manipulation of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 122(1), 1-7.
- de Koning-Ward T.F., Fidock D.A., Thathy V., Menard R., van Spaendonk R.M., Waters A.P., Janse C.J. 2000.** The selectable marker human dihydrofolate reductase enables sequential genetic manipulation of the *Plasmodium berghei* genome. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 106(2), 199-212.
- de Koning-Ward T.F., Waters A.P., Crabb B.S. 2001.** Puromycin-N-acetyltransferase as a selectable marker for use in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 117(2), 155-60.
- Deitsch K., Driskill C., Wellems T. 2001.** Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res.*, 29(3), 850-3.
- Delbac F., Vivarès C. 1997.** A PCR technique for detecting and differentiating known microsporidia in AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 44(6), 75S.
- Delbac F., Duffieux F., David D., Metenier G., Vivares C.P. 1998a.** Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 45(2), 224-31.
- Delbac F., Peyret P., Méténier G., David D., Danchin A., Vivarès C.P. 1998b.** On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Microbiol.*, 29, 825-834.
- Delbac F., Peuvél I., Metenier G., Peyretailade E., Vivarès C.P. 2001.** Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of *ptp1* and *ptp2* genes in three *Encephalitozoon* species. *Infect. Immun.*, 69(2), 1016-24.
- Desportes I., Le Charpentier Y., Galian A., Bernard F., Cochand-Priollet B., Lavergne A., Ravisse P., Modigliani R. 1985.** Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bienewisi* n.g., sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.*, 32(2), 250-254.
- Desportes-Livage I., Hilmarsdottir I., Romana C., Tanguy S., Datry A., Gentilini M. 1991.** Characteristics of the microsporidian *Enterocytozoon bienewisi*: a consequence of its development within short-living enterocytes. *J. Protozool.*, 38(6), 111S-113S.
- Didier E.S., Didier P.J., Friedberg D.N., Stenson S.M., Orenstein J.M., Yee R.W., Tio F.O., Davis R.M., Vossbrinck C., Millichamp N. 1991.** Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.*, 163(3), 617-21.
- Didier E.S., Vossbrinck C.R., Baker M.D., Rogers L.B., Bertucci D.C., Shadduck J. A. 1995.** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*, 111, 411-21.
- Didier E.S. 1997.** Effects of albendazole, fumagilline, and TNP-470 on microsporidian replication in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41(7), 1541-6.

- Didier E.S. 1998.** Microsporidiosis. *Clin. Infect. Dis.*, 27(1), 1-7.
- Didier E.S. 2005.** Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta trop.* 94(1), 61-76.
- Didier E.S., Bowers L., Stovall M.E., Kuebler D., Mittleider D., Brindley P.J., Didier P.J. 2005.** Antimicrosporidial activity of (fluoro)quinolones *in vitro* and *in vivo*. *Folia Parasitol (Praha)*, 52(1-2), 173-81.
- Dietrich F.S., Voegeli S., Brachat S., Lerch A., Gates K., Steiner S., Mohr C., Pohlmann R., Luedi P., Choi S., Wing R.A., Flavier A., Gaffney T.D., Philippsen P. 2004.** The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science*, 304(5668), 304-7.
- Djikeng A., Shi H., Tschudi C., Shen S., Ullu E. 2003.** An siRNA ribonucleoprotein is found associated with polyribosomes in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, 9(7), 802-8.
- Dobrowolski J.M., Sibley L.D. 1996.** *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*, 84(6), 933-9.
- Dolgikh V.V., Semenov P.B., Mironov A.A., Beznoussenko G.V. 2005.** Immunocytochemical identification of the major exospore protein and three polar-tube proteins of the microsporidia *Paranosema grylli*. *Protist*, 156(1), 77-87.
- Donald R.G., Roos D.S. 1993.** Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 90(24), 11703-7.
- Donald R.G., Roos D.S. 1994.** Homologous recombination and gene replacement at the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase locus in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 63(2), 243-53.
- Donald R.G., Roos D.S. 1995.** Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92(12), 5749-53.
- Donald R.G., Carter D., Ullman B., Roos D.S. 1996.** Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J. Biol. Chem.*, 271(24), 14010-9.
- Donald R.G., Roos D.S. 1998.** Gene knock-outs and allelic replacements in *Toxoplasma gondii*: HXGPRT as a selectable marker for hit-and-run mutagenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 91(2), 295-305.
- Dowd S.E., Gerba C.P., Pepper I.L. 1998.** Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Vittaforma corneae* in Water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3332-3335.
- Duffieux F., Peyret P., Roe B.A., Vivarès C.P. 1998.** First report on the systematic sequencing of the small genome of *Encephalitozoon cuniculi* (Protozoa, Microspora): gene organization of a 4.3 kbp region on chromosome I. *Microb. Comp. Genomics*, 3(1), 1-11.
- Dunn A.M., Terry R.S., Smith J.E. 2001.** Transovarial transmission of microsporidia. *Adv. Parasitol.*, 48, 57-100.
- Duraisingh M.T., Triglia T., Cowman A.F. 2002.** Negative selection of *Plasmodium falciparum* reveals targeted gene deletion by double crossover recombination. *Int. J. Parasitol.*, 32(1), 81-9.
- Dyxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp P.A. 2003.** Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 4(6), 457-67.
- Engel U., Ozbek S., Streitwolf-Engel R., Petri B., Lottspeich F., Holstein T.W. 2002.** Nowa, a novel protein with minicollagen Cys-rich domains, is involved in nematocyst formation in Hydra. *J. Cell. Sci.*, 115(Pt 20), 3923-34.
- Enriquez F.J., Ditrich O., Palting J.D., Smith K. 1997.** Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.*, 35(3), 724-9.
- Enriquez F.J., Wagner G., Fragoso M., Ditrich O. 1998.** Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial development *in vitro*. *Parasitology*, 117(Pt 6), 515-20.
- Fast N.M., Logsdon J.M. Jr. and Doolittle W.F. 1999.** Phylogenetic analysis of the TATA box binding protein (TBP) gene from *Nosema locustae*: evidence for a microsporidia-fungi relationship and spliceosomal intron loss. *Mol. Biol. Evol.*, 16(10), 1415-9.

- Fast N.M., Law J.S., Williams B.A., Keeling P.J. 2003.** Bacterial catalase in the microsporidian *Nosema locustae*: implications for microsporidian metabolism and genome evolution. *Eukaryot. Cell.*, 2(5), 1069-75.
- Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Cullis P, Huang L, Jessee JA, Seymour L, Szoka F, Thierry AR, Wagner E, Wu G. 1997.** Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.*, 8(5), 511-2.
- Fidock D.A., Wellem T.E. 1997.** Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94(20), 10931-6.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-1.
- Foucault C., Drancourt M. 2000.** Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. *Microb. Pathog.*, 28(2), 51-58.
- Fox B.A., Belperron A.A., Bzik D.J. 2001.** Negative selection of herpes simplex virus thymidine kinase in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 116(1), 85-8.
- Franzen C., Muller A., Hegener P., Salzberger B., Hartmann P., Fatkenheuer G., Diehl V., Schrappe M. 1995.** Detection of microsporidia (*Enterocytozoon bieneusi*) in intestinal biopsy specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33(9), 2294-6.
- Franzen C., Müller A. 2001.** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect.*, 3(5), 389-400.
- Franzen C. 2005.** How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol. (Praha)*, 52(1-2), 36-40.
- Fribourg S., Romier C., Werten S., Gangloff Y.G., Poterszman A., Moras D. 2001.** Dissecting the interaction network of multiprotein complexes by pairwise coexpression of subunits in *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, 306(2), 363-73.
- Frixione E., Ruiz L., Santillan M., de Vargas, L.V., Tejero J.M., Undeen A.H. 1992.** Dynamics of polar tube filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell. Motil. Cytoskel.*, 22, 38-50.
- Frixione E., Ruiz L., Undeen A.H., 1994.** Monovalent cations induce microsporidian spore germination in vitro. *J. Euk. Microbiol.*, 41, 464-468.
- Frixione E., Ruiz L., Cerbon J., Undeen A.H. 1997.** Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: conditional inhibition by D₂O, ethanol and Hg²⁺ suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. *J. Euk. Microbiol.*, 44(2), 109-16.
- Fujimura M., Oeda K., Inoue H., Kato T. 1992.** A single amino-acid substitution in the beta-tubulin gene of *Neurospora* confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity. *Curr. Genet.*, 21(4-5), 399-404.
- Galagan J.E., Calvo S.E., Cuomo C., Ma L.J., Wortman J.R., Batzoglou S., Lee S.I., Basturkmen M., Spevak C.C., Clutterbuck J., Kapitonov V., Jurka J., Scacciochio C., Farman M., Butler J., Purcell S., Harris S., Braus G.H., Draht O., Busch S., D'Enfert C., Bouchier C., Goldman G.H., Bell-Pedersen D., Griffiths-Jones S., Doonan J.H., Yu J., Vienken K., Pain A., Freitag M., Selker E.U., Archer D.B., Penalva M.A., Oakley B.R., Momany M., Tanaka T., Kumagai T., Asai K., Machida M., Nierman W.C., Denning D.W., Caddick M., Hynes M., Paoletti M., Fischer R., Miller B., Dyer P., Sachs M.S., Osmani S.A., Birren B.W. 2005.** Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1105-15.
- Gardiner D.L., Skinner-Adams T.S., Spielmann T., Trenholme K.R. 2003.** Malaria transfection and transfection vectors. *Trends Parasitol.*, 19(9), 381-3.
- Germot A, Philippe H, Le Guyader H. 1997.** Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 87(2), 159-68.

- Ghedin E., Bringaud F., Peterson J., Myler P., Berriman M., Ivens A., Andersson B., Bontempi E., Eisen J., Angiuoli S., Wanless D., Von Arx A., Murphy L., Lennard N., Salzberg S., Adams M.D., White O., Hall N., Stuart K., Fraser C.M., El-Sayed N.M. 2004.** Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 134(2), 183-91.
- Ghosh K., Cappiello C.D., McBride S.M., Occi J.L., Cali A., Takvorian P.M., McDonald T.V., Weiss L.M. 2006.** Functional characterization of a putative aquaporin from *Encephalitozoon cuniculi*, a microsporidia pathogenic to humans. *Int. J. Parasitol.*, 36(1), 57-62.
- Gill E.E., Fast N.M. 2006.** Assessing the microsporidia-fungi relationship: Combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene*, 375, 103-9.
- Gilley D., Preer J.R. Jr., Aufderheide K.J., Polisky B. 1988.** Autonomous replication and addition of telomere-like sequences to DNA microinjected into *Paramecium tetraurelia* macronuclei. *Mol. Cell. Biol.*, 8(11), 4765-72.
- Goguel J., Katlama C., Sarfati C., Maslo C., Lepout C., Molina J.M. 1997.** Remission of AIDS-associated intestinal microsporidiosis with highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 11(13), 1658-9.
- Goonewardene R., Daily J., Kaslow D., Sullivan T.J., Duffy P., Carter R., Mendis K., Wirth D. 1993.** Transfection of the malaria parasite and expression of firefly luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 90(11), 5234-6.
- Gossen M., Bujard H. 1992.** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 89(12), 5547-51.
- Gossen M., Bujard H. 2002.** Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu. Rev. Genet.*, 36, 153-73.
- Gresch O., Engel F.B., Nestic D., Tran T.T., England H.M., Hickman E.S., Korner I., Gan L., Chen S., Castro-Obregon S., Hammermann R., Wolf J., Muller-Hartmann H., Nix M., Siebenkotten G., Kraus G., Lun K. 2004.** New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*, 33(2), 151-63.
- Griffith E.C., Su Z., Niwayama S., Ramsay C.A., Chang Y.H., Liu J.O. 1998.** Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagillin and ovalicin by methionine aminopeptidase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 95(26), 15183-8.
- Guiliano D.B., Hall N., Jones S.J., Clark L.N., Corton C.H., Barrell B.G., Blaxter M.L. 2002.** Conservation of long-range synteny and microsynteny between the genomes of two distantly related nematodes. *Genome Biol.*, 3(10):RESEARCH0057.
- Haro M., Del Aguila C., Fenoy S., Henriques-Gil N. 2003.** Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *J. Clin. Microbiol.*, 41(9), 4166-71.
- Hartman S.C., Mulligan R.C. 1988.** Two dominant-acting selectable markers for gene transfer studies in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 85(21), 8047-51.
- Hausmann S., Vivarès C.P., Shuman S. 2002.** Characterization of the mRNA capping apparatus of the microsporidian parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *J. Biol. Chem.*, 277(1), 96-103.
- Hayman J.R., Hayes S.F., Amon J., Nash T.E. 2001.** Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect. Immun.*, 69(11), 7057-66.
- Hayman J.R., Southern T.R., Nash T.E. 2005.** Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells *in vitro*. *Infect. Immun.*, 73(2), 841-8.
- He Q., Leitch G.J., Visvesvara G.S., Wallace S. 1996.** Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40(1), 179-85.
- Healer J., Triglia T., Hodder A.N., Gemmill A.W., Cowman A.F. 2005.** Functional analysis of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 utilizing interspecies domains. *Infect. Immun.*, 73(4), 2444-51.
- Hendrie P.C., Russell D.W. 2005.** Gene targeting with viral vectors. *Mol. Ther.*, 12(1), 9-17.

- Herm-Gotz A., Delbac F., Weiss S., Nyitrai M., Stratmann R., Tomavo S., Sibley L.D., Geeves M.A., Soldati D. 2006.** Functional and biophysical analyses of the class XIV *Toxoplasma gondii* Myosin D. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 27(2), 139-51.
- Herrero E., de la Torre M.A., Valentin E. 2003.** Comparative genomics of yeast species: new insights into their biology. *Int. Microbiol.*, 6(3), 183-90.
- Hettmann C., Herm A., Geiter A., Frank B., Schwarz E., Soldati T., Soldati D. 2000.** A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. *Mol. Biol. Cell.*, 11(4), 1385-400.
- Hillen W., Schollmeier K. 1983.** Nucleotide sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene. *Nucleic Acids Res.*, 11(2), 525-39.
- Hilmarsdóttir I., Desportes-Livage I., Datry A., Gentilini M. 1993.** Morphogenesis of the polaroplast in *Enterocytozoon bienewisi* Desportes et al., 1985, a microsporidian parasite of HIV infected patients. *Europ. J. Protistol.*, 29, 88-97.
- Hirt R.P., Healy B., Vossbrinck C.R., Canning E.U. and Embley T.M. 1997.** A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr. Biol.* 7, 995-998.
- Hirt R.P., Logsdon J.M. Jr., Healy B., Dorey M.W., Doolittle W.F., Embley T.M. 1999.** Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96(2), 580-5.
- Hollister W.S., Canning E.U., Willcox A. 1991.** Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitology*, 102, 33-43.
- Holstein T., Tardent P. 1984.** An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science*, 223(4638), 830-3.
- Hunt R.D., King N.W. and Foster H.L. 1972.** Encephalitozoonosis : evidence of vertical transmission. *I. Infect. Dis.*, 126(2), 212-214.
- Hurst L.D., Williams E.J., Pal C. 2002.** Natural selection promotes the conservation of linkage of co-expressed genes. *Trends Genet.*, 18(12), 604-6.
- Huynh M.H., Opitz C., Kwok L.Y., Tomley F.M., Carruthers V.B., Soldati D. 2004.** Trans-genera reconstitution and complementation of an adhesion complex in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.*, 6(8), 771-82.
- Ibrahim M., Si-Ammour A., Celio M.R., Mauch F., Menoud P. 2000.** Construction and application of a microprojectile system for the transfection of organotypic brain slices. *J. Neurosci. Methods.*, 101(2), 171-9.
- Ishihara R., Hayashi Y. 1968.** Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *N. bombycis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 11, 377-385.
- Janse C.J., Franke-Fayard B., Mair G.R., Ramesar J., Thiel C., Engelmann S., Matuschewski K., van Gemert G.J., Sauerwein R.W., Waters A.P. 2005.** High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 145(1), 60-70.
- Johnston S.A., Anziano P.Q., Shark K., Sanford J.C., Butow R.A. 1988.** Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science*, 240(4858), 1538-41.
- Johnston S.A., DeVit M.J. 1996.** Biolistic transformation of yeasts. *Methods Mol. Biol.*, 53, 147-53.
- Jongco A.M., Ting L.M., Thathy V., Mota M.M., Kim K. 2006.** Improved transfection and new selectable markers for the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 146(2), 242-50.
- Jung M.K., Oakley B.R. 1990.** Identification of an amino acid substitution in the benA, beta-tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 17(2), 87-94.
- Jung M.K., Wilder I.B., Oakley B.R. 1992.** Amino acid alterations in the benA (beta-tubulin) gene of *Aspergillus nidulans* that confer benomyl resistance. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 22(3), 170-4.
- Kamaishi T., Hashimoto T., Nakamura Y., Nakamura F., Murata S., Okada N., Okamoto K., Shimizu M., Hasegawa M. 1996.** Protein phylogeny of translation elongation factor EF-1 alpha suggests microsporidians are extremely ancient eukaryotes. *J. Mol. Evol.*, 42(2), 257-63.

- Kass-Simon G., Scappaticci A.A. Jr. 2002.** The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Can. J. Zool.*, 80, 1772-1794.
- Katinka M.D., Duprat S., Cornillot E., Metenier G., Thomarat F., Prensier G., Barbe V., Peyretailade E., Brottier P., Wincker P., Delbac F., El Alaoui H., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivarès C.P. 2001.** Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414, 450-453.
- Katiyar S.K., Visvesvara G.S., Edlind T.D. 1995.** Comparisons of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. *Gene*, 152(1), 27-33.
- Kappe S., Bruderer T., Gantt S., Fujioka H., Nussenzweig V., Menard R. 1999.** Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J. Cell. Biol.*, 147(5), 937-44.
- Keeling P.J., Fast N.M. 2002.** Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 93-116.
- Keeling P.J. 2003.** Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet. Biol.*, 38(3), 298-309.
- Keeling P.J. 2004.** Reduction and compaction in the genome of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. *Dev Cell.*, 6(5), 614-6.
- Keeling P.J., Slamovits C.H. 2004.** Simplicity and complexity of microsporidian genomes. *Eukaryot. Cell.*, 3(6), 1363-9.
- Kelly J.M., Ward H.M., Miles M.A., Kendall G. 1992.** A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.*, 20(15), 3963-9.
- Keohane E.M., Orr G.A., Takvorian P.M., Cali A., Tanowitz H.B., Wittner M., Weiss L.M., 1996.** Purification and characterization of a microsporidian polar tube protein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 79, 255-259.
- Keohane E.M., Orr G.A., Zhang H.S., Takvorian P.M., Cali A., Tanowitz H.B., Wittner M., Weiss L.M., 1998.** The molecular characterization of the major polar tube protein gene from *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite of humans. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 94, 227-236.
- Keohane E.M., Orr G.A., Takvorian P.M., Cali A., Tanowitz H.B., Wittner M., Weiss L.M. 1999.** Polar tube proteins of microsporidia of the family encephalitozoonidae. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46(1), 1-5.
- Kim K., Soldati D., Boothroyd J.C. 1993.** Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science*, 262(5135), 911-4.
- Knaus M., El-Matbouli M. 2005.** Characterisation of carbohydrate-binding sites in developmental stages of *Myxobolus cerebralis*. *Parasitol. Res.*, 97(6), 505-14.
- Koch A.W., Holstein T.W., Mala C., Kurz E., Engel J., David C.N. 1998.** Spinalin, a new glycine- and histidine-rich protein in spines of Hydra nematocysts. *J. Cell. Sci.*, 111 (Pt 11), 1545-54.
- Kozak M. 1987.** An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 15(20), 8125-48.
- Kozak M. 2005.** Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 361, 13-37.
- Krotz F., Sohn H.Y., Gloe T., Plank C., Pohl U. 2003.** Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J. Vasc. Res.*, 40(5), 425-34.
- Kurz E.M., Holstein T.W., Petri B.M., Engel J., David C.N. 1991.** Mini-collagens in hydra nematocytes. *J. Cell. Biol.*, 115(4), 1159-69.
- Kuspa A., Loomis W.F. 1992.** Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89(18), 8803-7.
- Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee M.G., van der Ploeg L.H. 1991.** The hygromycin B-resistance-encoding gene as a selectable marker for stable transformation of *Trypanosoma brucei*. *Gene*, 105(2), 255-7.
- Leitch G.J., Visvesvara G.S., He Q. 1993.** Inhibition of microsporidian spore germination. *Parasitol Today*, 9(11), 422-4.

- Leitch G.J., Ward T.L., Shaw A.P., Newman G. 2005.** Apical spore phagocytosis is not a significant route of infection of differentiated enterocytes by *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect. Immun.*, 73(11), 7697-704.
- Levaditi C., Nicolau S., Schoen R. 1923.** L'étiologie de l'encéphalite. *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris*, 177, 985-988.
- Li J., Katiyar S.K., Edlind T.D. 1996.** Site-directed mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* beta-tubulin: interaction between residue 167 and benzimidazole compounds. *FEBS Lett.*, 385(1-2), 7-10.
- Li X., Chang Y.H. 1995.** Amino-terminal protein processing in *Saccharomyces cerevisiae* is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92(26), 12357-61.
- Liu S., Widom J., Kemp C.W., Crews C.M., Clardy J. 1998.** Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin. *Science*, 282(5392), 1324-7.
- Lom J., Vavra J. 1963.** The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool*, 1, 81-92.
- Lomer C.J., Bateman R.P., Johnson D.L., Langewald J., Thomas M. 2001.** Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu. Rev. Entomol.*, 46, 667-702.
- Lorence A., Verpoorte R. 2004.** Gene transfer and expression in plants. *Methods Mol. Biol.*, 267, 329-50.
- Lorenz P., Maier A.G., Baumgart E., Erdmann R., Clayton C. 1998.** Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex11p. *EMBO J.*, 17(13), 3542-55.
- Lowther W.T., McMillen D.A., Orville A.M., Matthews B.W. 1998.** The anti-angiogenic agent fumagillin covalently modifies a conserved active-site histidine in the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95(21), 12153-7.
- Lowther W.T., Matthews B.W. 2000.** Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477(1-2), 157-67.
- Lubbock R., Gupta B.L., Hall T.A. 1981.** Novel role of calcium in exocytosis: mechanism of nematocyst discharge as shown by x-ray microanalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 78(6), 3624-8.
- Lujan H.D., Conrad J.T., Clark C.G., Touz M.C., Delbac F., Vivarès C.P., Nash T.E. 1998.** Detection of microsporidia spore-specific antigens by monoclonal antibodies. *Hybridoma*, 17, 237-243.
- Lye L., Wang C.C. 1996.** Thymidine kinase as a selectable marker for studying the biogenesis of glycosomes in *Trypanosoma brucei*. *Exp. Parasitol.*, 82(2), 211-7.
- Maasho K., Marusina A., Reynolds N.M., Coligan J.E., Borrego F. 2004.** Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system. *J. Immunol. Methods*, 284(1-2), 133-40.
- MacDonald L.M., Armson A., Thompson A.R., Reynoldson J.A. 2004.** Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 138(1), 89-96.
- Magaud A., Achbarou A., Desportes-Livage I. 1997.** Cell invasion by the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 44, 81S.
- Malhotra P., Dasaradhi P.V., Kumar A., Mohammed A., Agrawal N., Bhatnagar R.K., Chauhan V.S. 2002.** Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.*, 45(5), 1245-54.
- Mamoun C.B., Gluzman I.Y., Goyard S., Beverley S.M., Goldberg D.E. 1999.** A set of independent selectable markers for transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96(15), 8716-20.
- Matsubayashi H., Koike T., Mikata T., Hagiwara S. 1959.** A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Arch. Pathol.*, 67, 181-187.
- Mathis A., Michel M., Kuster H., Müller C., Weber R., Deplazes P. 1997.** Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology*, 114, 29-35.
- Mathis A., Tanner I., Weber R., Deplazes P. 1999.** Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int. J. Parasitol.*, 29(5), 767-70.

- McRobert L., McConkey G.A. 2002.** RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 119(2), 273-8.
- Meissner M., Brecht S., Bujard H., Soldati D. 2001.** Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.*, 29(22), E115.
- Meissner M., Schluter D., Soldati D. 2002.** Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science*, 298(5594), 837-40.
- Meissner M., Krejany E., Gilson P.R., de Koning-Ward T.F., Soldati D., Crabb B.S. 2005.** Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102(8), 2980-5.
- Meissner M., Soldati D. 2005.** The transcription machinery and the molecular toolbox to control gene expression in *Toxoplasma gondii* and other protozoan parasites. *Microbes Infect.*, 7(13), 1376-84.
- Menotti J., Santillana-Hayat M., Cassinat B., Sarfati C., Derouin F., Molina J.M. 2005.** Inhibitory activity of human immunodeficiency virus aspartyl protease inhibitors against *Encephalitozoon intestinalis* evaluated by cell culture-quantitative PCR assay. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(6), 2362-6.
- Messina M., Niesman I., Mercier C., Sibley L.D. 1995.** Stable DNA transformation of *Toxoplasma gondii* using phleomycin selection. *Gene*, 165(2), 213-7.
- Méténier G., Vivarès C.P., 2001.** Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes Infect.*, 3(5), 407-15.
- Militello K.T., Dodge M., Bethke L., Wirth D.F. 2004.** Identification of regulatory elements in the *Plasmodium falciparum* genome. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 134(1), 75-88.
- Miller J.F. 1994.** Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol.*, 235, 375-85.
- Mital J., Meissner M., Soldati D., Ward G.E. 2005.** Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol. Biol. Cell.*, 16(9), 4341-9.
- Mohammed A., Dasaradhi P.V., Bhatnagar R.K., Chauhan V.S., Malhotra P. 2003.** *In vivo* gene silencing in *Plasmodium berghei*-a mouse malaria model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309(3), 506-11.
- Moura H., Sodre F.C., Bornay-Llinares F.J., Leitch G.J., Navin T., Wahlquist S., Bryan R., Meseguer I., Visvesvara G.S. 1999.** Detection by an immunofluorescence test of *Encephalitozoon intestinalis* spores in routinely formalin-fixed stool samples stored at room temperature. *J. Clin. Microbiol.*, 37(7), 2317-22.
- Munro S., Pelham H.R. 1984.** Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of *Drosophila* hsp 70. *EMBO J.*, 3(13), 3087-93.
- Nakaar V., Samuel B.U., Ngo E.O., Joiner K.A. 1999.** Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. *J. Biol. Chem.*, 274(8), 5083-7.
- Nakaar V., Ngo H.M., Aaronson E.P., Coppens I., Stedman T.T., Joiner K.A. 2003.** Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.*, 116(Pt 11), 2311-20.
- Ngo H., Tschudi C., Gull K., Ullu E. 1998.** Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95(25), 14687-92.
- Nickel R., Tannich E. 1994.** Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91(15), 7095-8.
- O'Donnell R.A., Saul A., Cowman A.F., Crabb B.S. 2000.** Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-1₁₉ across distantly related *Plasmodium* species. *Nat. Med.*, 6(1), 91-5.
- O'Donnell R.A., Freitas-Junior L.H., Preiser P.R., Williamson D.H., Duraisingh M., McElwain T.F., Scherf A., Cowman A.F., Crabb B.S. 2002.** A genetic screen for improved plasmid segregation reveals a role for Rep20 in the interaction of *Plasmodium falciparum* chromosomes. *EMBO J.*, 21(5), 1231-9.
- Ogbourne S., Antalis T.M. 1998.** Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.*, 331 (Pt 1), 1-14.

- Olvera A., Olvera F., Vines R.R., Recillas-Targa F., Lizardi P.M., Dhar S., Bhattacharya S., Petri W. Jr., Alagon A.** 1997. Stable transfection of *Entamoeba histolytica* trophozoites by lipofection. Arch. Med. Res., 28 Spec No, 49-51.
- Ombrouck C., Ciceron L., Biligui S., Brown S., Marechal P., van Gool T., Detry A., Danis M. and Desportes-Livage I.** 1997. Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. J. Clin. Microbiol., 35(3), 652-5.
- Orbach M.J., Porro E.B., Yanofsky C.** 1986. Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. Mol. Cell. Biol., 6(7), 2452-61.
- Ozbek S., Pokidysheva E., Schwager M., Schulthess T., Tariq N., Barth D., Milbradt A.G., Moroder L., Engel J., Holstein T.W.** 2004. The glycoprotein NOWA and minicollagens are part of a disulfide-linked polymer that forms the cnidarian nematocyst wall. J. Biol. Chem., 279(50), 52016-23.
- Palenchar J.B., Bellofatto V.** 2006. Gene transcription in trypanosomes. Mol. Biochem. Parasitol., 146(2), 135-41.
- Pandrea I., Mittleider D., Brindley P.J., Didier E.S., Robertson D.L.** 2005. Phylogenetic relationships of methionine aminopeptidase 2 among *Encephalitozoon* species and genotypes of microsporidia. Mol. Biochem. Parasitol., 140(2), 141-52.
- Peek R., Delbac F., Speijer D., Polonais V., Greve S., Wentink-Bonnema E., Ringrose J., van Gool T.** 2005. Carbohydrate moieties of microsporidian polar tube proteins are targeted by immunoglobulin G in immunocompetent individuals. Infect. Immun., 73(12):7906-13.
- Peuvel I., Delbac F., Metenier G., Peyret P., Vivarès C.P.** 2000. Polymorphism of the gene encoding a major polar tube protein PTP1 in two microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. Parasitology, 121 Pt 6, 581-7.
- Peuvel I., Peyret P., Méténier G., Vivarès C.P., Delbac F.** 2002. The microsporidian polar tube : evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. Mol. Biochem. Parasitol., 122(1), 69-80.
- Peuvel I.** 2002. Les protéines du tube polaire chez *Encephalitozoon* spp : caractérisation, polymorphisme et étude des interactions protéiques. Thèse.
- Peuvel-Fanget I., Polonais V., Brosson D., Texier C., Kuhn L., Peyret P., Vivarès C., Delbac F.** 2006. EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. Int. J. Parasitol., 36(3), 309-18.
- Peyretilade E., Broussolle V., Peyret P., Metenier G., Gouy M., Vivarès C.P.** 1998. Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. Mol. Biol. Evol., 15(6), 683-9.
- Pfefferkorn E.R.** 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 81(3), 908-12.
- Pfefferkorn E.R., Bzik D.J., Honsinger C.P.** 2001. *Toxoplasma gondii*: mechanism of the parasitostatic action of 6-thioxanthine. Exp. Parasitol., 99(4), 235-43.
- Plank C., Anton M., Rudolph C., Rosenecker J., Krotz F.** 2003. Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. Expert Opin. Biol. Ther., (5), 745-58.
- Polonais V.** 2002. Identification de protéines moteurs de type kinésines chez la microsporidie *Encephalitozoon cuniculi*. DEA.
- Polonais V., Prensier G., Méténier G., Vivarès C.P., Delbac F.** 2005. Microsporidian polar tube proteins: highly divergent but closely linked genes encode PTP1 and PTP2 in members of the evolutionarily distant *Antonospora* and *Encephalitozoon* groups. Fungal Genetics Biology, 42 (9), 791-803.
- Prigneau O., Achbarou A., Bouladoux N., Mazier D., Desportes-Livage I.** 2000. Identification of proteins in *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidian pathogen of immunocompromised humans: an immunoblotting and immunocytochemical study. J. Eukaryot. Microbiol., 47(1), 48-56.

- Purdy J.E., Mann B.J., Pho L.T., Petri W.A. Jr. 1994.** Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91(15), 7099-103.
- Ramakrishnan G., Vines R.R., Mann B.J., Petri W.A. Jr. 1997.** A tetracycline-inducible gene expression system in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 84(1), 93-100.
- Ramakrishnan G., Rogers J., Mann B.J., Petri W.A. Jr. 2001.** New tools for genetic analysis of *Entamoeba histolytica*: blasticidin S deaminase and green fluorescence protein. *Parasitol. Int.*, 50(1), 47-50.
- Ramirez M.I., Yamauchi L.M., de Freitas L.H. Jr., Uemura H., Schenkman S. 2000.** The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 111(1), 235-40.
- Ridoux O., Drancourt M. 1998.** *In vitro* susceptibilities of the microsporidia *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, and *Encephalitozoon intestinalis* to albendazole and its sulfoxide and sulfone metabolites. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42(12), 3301-3.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-7.
- Sbicego S., Schnauffer A., Blum B. 1998.** Transient and stable transfection of *Leishmania* by particle bombardment. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 94(1), 123-6.
- Scherer F., Anton M., Schillinger U., Henke J., Bergemann C., Kruger A., Gansbacher B., Plank C. 2002.** Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, 9(2), 102-9.
- Schiestl R.H., Petes T.D. 1991.** Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88(17), 7585-9.
- Schmidt G.D., Roberts L.S. 1989.** *Foundations of Parasitology*. 4th edition, pp 750.
- Seeber F., Boothroyd J.C. 1996.** *Escherichia coli* beta-galactosidase as an *in vitro* and *in vivo* reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene*, 169(1), 39-45.
- Seeber F. 1997.** Consensus sequence of translational initiation sites from *Toxoplasma gondii* genes. *Parasitol. Res.*, 83(3), 309-11.
- Shadduck J.A. 1980.** Effect of fumagillin on *in vitro* multiplication of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Protozool*, 27(2), 202-8.
- Shi H., Djikeng A., Mark T., Wirtz E., Tschudi C., Ullu E. 2000.** Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA*, 6(7), 1069-76.
- Sibley L.D., Messina M., Niesman I.R. 1994.** Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91(12), 5508-12.
- Singer S.M., Yee J., Nash T.E. 1998.** Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 92(1), 59-69.
- Slamovits C.H., Williams B.A., Keeling P.J. 2003.** Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonospora locustae* n. comb. based on molecular and ultrastructural data. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51(2), 207-13.
- Slamovits C.H., Fast N.M., Law J.S., Keeling P.J. 2004.** Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites. *Curr. Biol.*, 14(10), 891-6.
- Slamovits C.H., Burri L., Keeling P.J. 2006.** Characterization of a divergent sec61beta gene in microsporidia. *J. Mol. Biol.*, 359(5), 1196-202.
- Slodkiewicz-Kowalska A., Graczyk T.K., Tamang L., Jedrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A.S., Majewska A.C. 2006.** Microsporidian Species Known To Infect Humans Are Present in Aquatic Birds: Implications for Transmission via Water? *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 4540-4.
- Smith F.D., Harpending P.R., Sanford J.C. 2002.** Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *J. Gen. Microbiol.*, 138(1), 239-48.
- Snowden K.F., Shadduck. 1999.** Microsporidia in higher vertebrates. p. 393-417. *In* M. Wittner, and L. M. Weiss (Eds). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- Sokolova Y., Snigirevskaya E., Morzhina E., Skarlato S., Mironov A., Komissarchik Y. 2001.** Visualization of early golgi compartments at proliferate and sporogenic stages of a microsporidian *Nosema grylli*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 48, 86S-87S.
- Sokolova Y.Y., Dolgikh V.V., Morzhina E.V., Nasonova E.S., Issi I.V., Terry R.S., Ironside J.E., Smith J.E., Vossbrinck C.R. 2003.** Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* Gen. Nov., *Comb. Nov.* (Sokolova, Seleznirov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg. *J. Invertebr. Pathol.*, 84(3), 159-72.
- Soldati D., Boothroyd J.C. 1993.** Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science*, 260(5106), 349-52.
- Soldati D., Boothroyd J.C. 1995.** A selector of transcription initiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.*, 15(1), 87-93.
- Soldati D., Kim K., Kampmeier J., Dubremetz J.F., Boothroyd J.C. 1995.** Complementation of a *Toxoplasma gondii* ROP1 knock-out mutant using phleomycin selection. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 74(1), 87-97.
- Sprenghart M.L., Fuchs E., Porter A.G. 1996.** The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 15(3), 665-74.
- Strain A.J. 2006.** The uptake and fate of exogenous cellular DNA in mammalian cells. *Dev. Biol.* (Basel), 123, 23-8, discussion 55-73.
- Street D.A. 1994.** Analysis of *Nosema locustae* (Microsporidia : Nosematidae) chromosomal DNA with pulsed field gel electrophoresis. *J. Invert. Pathol.*, 63, 301-303.
- Striepen B., He C.Y., Matrajt M., Soldati D., Roos D.S. 1998.** Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 92(2), 325-38.
- Suga M., Hatakeyama T. 2001.** High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* pretreated with thiol compounds by electroporation. *Yeast*, 18(11), 1015-21.
- Sultan A.A., Thathy V., de Koning-Ward T.F., Nussenzweig V. 2001.** Complementation of *Plasmodium berghei* TRAP knockout parasites using human dihydrofolate reductase gene as a selectable marker. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 113(1), 151-6.
- Sun C.H., Tai J.H. 2000.** Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 105(1), 51-60.
- Suyama M., Bork P. 2001.** Evolution of prokaryotic gene order: genome rearrangements in closely related species. *Trends Genet.*, 17(1), 10-3.
- Takvorian P. M., Cali A. 1994.** Enzyme histochemical identification of the Golgi apparatus in the microsporidian *Glugea stephani*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 41, 63S-64S.
- Takvorian P.M., Cali A. 1996.** Polar tube formation and nucleoside diphosphatase activity in the microsporidian, *Glugea stephani*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 43(5), 102S-103S.
- Takvorian P.M., Weiss L.M., Cali A. 2005.** The early events of *Brachiola algerae* (Microsporidia) infection: spore germination, sporoplasm structure, and development within host cells. *Folia Parasitol. (Praha)*, 52(1-2), 118-29.
- Taupin V., Metenier G., Vivarès C.P., Prensier G. 2006a.** An improved procedure for Percoll gradient separation of sporogonial stages in *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitol. Res.*, [Epub ahead of print].
- Taupin V., Garenaux E., Mazet M., Maes E., Denise H., Prensier G., Vivares C.P., Guerardel Y., Metenier G. 2006b.** Major O-glycans in the spore of two parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing α 1,2 linkages. *Glycobiology*, [Epub ahead of print].
- Thomarat F., Vivarès C.P., Gouy M. 2004.** Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J. Mol. Evol.*, 59(6), 780-91.
- Thomas J.H., Neff N.F., Botstein D. 1985.** Isolation and characterization of mutations in the beta-tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 111(4), 715-34.
- Tobin J.F., Wirth D.F. 1992.** A sequence insertion targeting vector for *Leishmania enriettii*. *J. Biol. Chem.*, 267(7), 4752-8.

- Triglia T., Healer J., Caruana S.R., Hodder A.N., Anders R.F., Crabb B.S., Cowman A.F. 2000.** Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol. Microbiol.*, 38(4), 706-18.
- Ullu E., Tschudi C., Chakraborty T. 2004.** RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.*, 6(6), 509-19.
- Undeen A.H., Avery S.W. 1988.** Effect of anions on the germination of *Nosema algerae* (Microspora : Nosematidae) spores. *J. Invertebr. Pathol.*, 52, 84-89.
- Undeen A.H., Van der Meer R.K. 1990.** The effect of ultraviolet radiation on the germination of *Nosema algerae* Vavra and Undeen (Microsporida: Nosematidae) spores. *J. Protozool.*, 37(3), 194-199.
- Undeen A.H., Van der Meer R.K. 1994.** Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista : Microspora) spores : a quantitative study. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 41, 129-132.
- Uspenskaya A.V., Raikova O.I. 2004.** F-actin and beta-tubulin localization in the myxospore stinging apparatus of *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936 (Myxozoa, Myxosporea). *Tsitologiya*, 46(8), 748-54.
- van de Peer Y., Ben Ali A. and A. Meyer. 2000.** Microsporidia : accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene*, 246, 1-8.
- van den Hoff M.J., Moorman A.F., Lamers W.H. 1992.** Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Res.*, 20(11), 2902.
- van Gool T., Snijders F., Reiss P., Eeftinck Schattenkerk J.K., van den Bergh Weerman M.A., Bartelsman J.F., Bruins J.J., Canning E.U., Dankert J. 1993.** Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J. Clin. Pathol.*, 46(8), 694-9.
- van Gool T., Vetter J.C.M., Weinmayr B., Van Dam A., Derouin F., Dankert J., 1997.** High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *J. Infect. Dis.*, 175, 1020-1024.
- van Gool T., Biderre C., Delbac F., Wentink-Bonnema E., Peek R., Vivarès C.P. 2004.** Serodiagnostic studies in an immunocompetent individual infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *J. Infect. Dis.*, 189(12), 2243-9.
- van Wye J.D., Haldar K. 1997.** Expression of green fluorescent protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 87(2), 225-9.
- Vavra J. 1965.** Study by electron microscope of the morphology and development of some Microsporidia. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seance Acad. Sci. D.*, 261, 3467-3470.
- Vavra J. 1976.** Structure of the Microsporidia. In : "Comparative Pathobiology" (L. A. Bulla and T. C. Cheng, eds), vol.1, Plenum Press, New york, 1-85.
- Vavra J., Dahbiova R., Hollister W.S., Canning E.U. 1993.** Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidiosis. *Folia Parasitol. (Praha)*, 40(4), 267-72.
- Vavra J., Larsson J.I.R. 1999.** Structure of the microsporidia. p. 7-84. In M. Wittner, and L. M. Weiss (Eds). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Vijayanathan V., Thomas T., Thomas T.J. 2002.** DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy. *Biochemistry*, 41(48), 14085-94.
- Vinckier D., Porcher E., Vivier E., Vavra J., Torpier G.A. 1993.** A freeze-fracture study of microsporidia (Protozoa: Microspora). II. The extrusion apparatus: polar filament, polaroplast, posterior vacuole. *Eur. J. Protistol.*, 29, 370-380.
- Vines R.R., Purdy J.E., Ragland B.D., Samuelson J., Mann B.J., Petri W.A. Jr. 1995.** Stable episomal transfection of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 71(2), 265-7.
- Vivarès C.P., Loubes C., Bouix G. 1976.** Further cytochemical researches on Microsporidia parasites of the Mediterranean shore crab, *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 51(1), 1-14.

- Vivarès C.P., Bouix G, Manier J.F. 1977.** *Ormieresia carcini* gen. n., sp. n., Microsporidie du Crabe Méditerranéen, *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884 : cycle évolutif et étude ultrastructurale. *J. Protozool.*, 83-94.
- Vivarès C.P. 2001.** Introduction: the microsporidial world, a paragon for analyzing intracellular parasitism. *Microbes Infect.*, 3(5), 371-2.
- Vossbrinck C.R., Woese C.R. 1986.** Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature*, 320(6059), 287-8.
- Vossbrinck C.R., Maddox J.V., Friedman S., Debrunner-Vossbrinck B.A., Woese C.R. 1987.** Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, 326(6111), 411-4.
- Wang Z., Orlandi P.A., Stenger D.A. 2005.** Simultaneous detection of four human pathogenic microsporidian species from clinical samples by oligonucleotide microarray. *J. Clin. Microbiol.*, 43(8), 4121-8.
- Weber R., Bryan R.T., Owen R.L., Wilcox C.M., Gorelkin L., Visvesvara G.S. 1992.** Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. *N. Engl. J. Med.*, 326(3), 161-6.
- Weidner E. 1972.** Ultrastructure study of microsporidian invasion into cell. *Z. Parasitenkd.*, 40, 227-242.
- Weidner E. 1976.** The microsporidian spore invasion tube ; the ultrastructure, isolation and characterization of the protein comprising the tube. *J. Cell. Biol.*, 71, 23-34.
- Weidner E. 1982.** The microsporidian invasion tube. III. Tube extrusion and assembly. *J. Cell. Biol.*, 93, 976-979.
- Weidner E., Byrd W. 1982.** The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. *J. Cell. Biol.*, 93(3), 970-5.
- Weidner E., Byrd W., Scarborough A., Pleshinger J., Sibley D. 1984.** Microsporidian spore discharge and the transfert of polaroplast organelle membrane into plasma membrane. *J. Protozool.*, 31, 195-198.
- Weiss L.M. 2001.** Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop.*, 78(2), 89-102.
- Williams B.A, Hirt R.P, Lucocq J.M., Embley T.M. 2002.** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*, 418(6900), 865-9.
- Williams BA, Slamovits CH, Patron NJ, Fast NM, Keeling PJ. 2005.** A high frequency of overlapping gene expression in compacted eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102(31), 10936-41.
- Wirtz E., Clayton C. 1995.** Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science*, 268(5214), 1179-83.
- Wu Y., Sifri C.D., Lei H.H., Su X.Z., Wellems T.E. 1995.** Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 92(4), 973-7.
- Wu Y., Kirkman L.A., Wellems T.E. 1996.** Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93(3), 1130-4.
- Xiao L., Li L., Visvesvara G.S., Moura H., Didier E.S. Lal A.A. 2001a.** Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J. Clin. Microbiol.*, 39(6), 2248-53.
- Xiao L., Li L., Moura H., Sulaiman I., Lal A.A., Gatti S., Scaglia M., Didier E.S., Visvesvara G.S. 2001b.** Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *J. Clin. Microbiol.*, 39(6), 2191-6.
- Xu J., Pan G., Fang L., Li J., Tian X., Li T., Zhou Z., Xiang Z. 2006.** The varying microsporidian genome: Existence of long-terminal repeat retrotransposon in domesticated silkworm parasite *Nosema bombycis*. *Int. J. Parasitol.*, 2006 May 30. [Epub ahead of print].
- Xu Y., Takvorian P.M., Cali A., Orr G., Weiss L.M. 2004.** Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infect. Immun.*, 72(11), 6341-50.
- Xu Y., Weiss L.M. 2005.** The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *Int. J. Parasitol.*, 35(9), 941-53.

- Xu Y., Takvorian P., Cali A., Wang F., Zhang H., Orr G., Weiss L.M. 2006.** Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect. Immun.*, 74(1), 239-47.
- Yamauchi K. 1991.** The sequence flanking translational initiation site in protozoa. *Nucleic Acids Res.*, 19(10), 2715-20.
- Yee J., Nash T.E. 1995.** Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 92(12), 5615-9.
- Yu D.C., Wang A.L., Wu C.H., Wang C.C. 1995.** Virus-mediated expression of firefly luciferase in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol. Cell. Biol.*, 15(9), 4867-72.
- Zhang H., Huang H., Cali A., Takvorian P.M., Feng X., Zhou G., Weiss L.M. 2005.** Investigations into microsporidian methionine aminopeptidase type 2: a therapeutic target for microsporidiosis. *Folia Parasitol. (Praha)*, 52(1-2), 182-92.
- Zuo S., Guo Q., Ling C., Chang Y.H. 1995.** Evidence that two zinc fingers in the methionine aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae* are important for normal growth. *Mol. Gen. Genet.*, 246(2), 247-53.

Annexe

Microsporidian polar tube proteins: Highly divergent but closely linked genes encode PTP1 and PTP2 in members of the evolutionarily distant *Antonospora* and *Encephalitozoon* groups

Valérie Polonais, Gérard Prensier, Guy Méténier, Christian P. Vivarès, Frédéric Delbac*

Equipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, Laboratoire Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais 63177 Aubière Cedex, France

Received 20 December 2004; accepted 14 May 2005
Available online 26 July 2005

Abstract

The spore polar tube is a unique organelle required for cell invasion by fungi-related microsporidian parasites. Two major polar tube proteins (PTP1 and PTP2) are encoded by two tandemly arranged genes in *Encephalitozoon* species. A look at *Antonospora* (*Nosema*) *locustae* contigs (<http://jbpc.mbl.edu/Nosema/Contigs/>) revealed significant conservation in the order and orientation of various genes, despite high sequence divergence features, when comparing with *Encephalitozoon cuciculi* complete genome. This syntenic relationship between distantly related *Encephalitozoon* and *Antonospora* genera has been successfully exploited to identify *ptp1* and *ptp2* genes in two insect-infecting species assigned to the *Antonospora* clade (*A. locustae* and *Paranosema grylli*). Targeting of respective proteins to the polar tube was demonstrated through immunolocalization experiments with antibodies raised against recombinant proteins. Both PTPs were extracted from spores with 100 mM dithiothreitol. Evidence for PTP1 mannosylation was obtained in studied species, supporting a key role of PTP1 in interactions with host cell surface.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Microsporidia; *Antonospora locustae*; *Paranosema grylli*; Polar tube proteins; Synteny; Glycosylation

1. Introduction

Microsporidia are a phylum of unicellular eukaryotes comprising more than 1200 species, all obligate intracellular parasites and able to form environmentally resistant spores. Molecular phylogenies based on various gene sequences support a relationship with fungi but their affiliation to a particular fungal group remains unclear (Keeling, 2003; Vivares et al., 2002; Vossbrinck et al., 2004). In humans, these parasites can cause opportunistic infections in AIDS patients and several disease syndromes in immunocompetent hosts, including diar-

rhea, keratoconjunctivitis, sinusitis, and disseminated infection (Snowden, 2004). Microsporidia harbor small genomes and the very reduced genome of *E. cuciculi* (2.9 Mbp) has been sequenced (Katinka et al., 2001).

Although microsporidia differ greatly in host range and cell type specificity, they share a similar mechanism for host cell invasion. Parasite penetration occurs actively after quick extrusion of a very long structure, called the polar tube, that was coiled in the spore. This curious element seems to discharge as an everting glove finger and provides a duct through which the sporoplasm can flow to be finally transferred inside the cytoplasm of a new host cell (reviewed by Franzen, 2004). The polar tube resists treatment with either SDS or acids but dissociates in the presence of a high concentration of a reducing agent such as dithiothreitol (DTT)

* Corresponding author. Fax: +33 4 73 40 76 70.

E-mail address: frederic.delbac@univ-bpclermont.fr (F. Delbac).

or 2-mercaptoethanol (Keohane et al., 1996). Three different polar tube proteins (PTP1, PTP2, and PTP3) have been identified at the sequence level in the mammal-infecting species *Encephalitozoon cuniculi* (Delbac et al., 1998a, 2001; Peuvelet al., 2002). A recombinant *E. cuniculi* PTP1 is strongly recognized by sera from *E. cuniculi*-infected patients, suggesting a good candidate antigen for serological diagnosis (van Gool et al., 2004 and unpublished data). PTP1 and PTP2 homologues have been also reported in *Encephalitozoon hellem* (Keohane et al., 1998) and *E. intestinalis* (Delbac et al., 2001), two human pathogens. In contrast, there are very few analyses of PTPs in other microsporidia (Dolgikh and Semenov, 2003; Keohane et al., 1999a,b; Weidner, 1976) and nothing is known about the corresponding sequences. Microsporidian genes are characterized by especially high evolution rates (Vivares et al., 2002; Vosbrinck et al., 2004) that render difficult the design of primers for PCR approaches.

A large number of microsporidia are major pathogens for insects. Originally isolated from the African migratory locust, *Nosema locustae* invades primarily the fat body of various grasshoppers and locusts, and is used as a biological control agent (Lomer et al., 2001). A genome sequencing project is currently underway (*N. locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF Award No. 0135272) and the sequences of 199 contigs can be examined in the web site <http://jbpc.mbl.edu/Nosema/Contigs/>. We found that numerous clusters of annotated genes have the same order and orientation as in *E. cuniculi*. This is consistent with a recent study revealing a high level of synteny between an *A. locustae* genome survey and the *E. cuniculi* genome (Slamovits et al., 2004b). Since *ptp1* and *ptp2* genes are closely linked in each *Encephalitozoon* species (Delbac et al., 2001), the opportunity was offered to test whether a possible inter-genus conserved synteny could help in the identification of *N. locustae* PTPs. Recent phylogenetic and ultrastructural analyses have led to transfer *N. locustae* to the genus *Antonosporea* as *A. locustae* n. comb. (Slamovits et al., 2004a). While the “true” *Nosema* clade appears as the sister-group of the *Encephalitozoon* group, the *Antonosporea* clade is closer to the bryozoan-infecting group.

In this study, we demonstrate that two neighboring orphan genes in *Antonosporea (Nosema) locustae* correspond to divergent homologues of *Encephalitozoon ptp1* and *ptp2*. We also provide evidence for a similar locus in *Paranosema grylli*, a parasite of crickets that has been also shown to be closely related to *Antonosporea* species (Sokolova et al., 2003). The preservation of these genes across the distant *Encephalitozoon* and *Antonosporea-Paranosema* genera supports a primary role of PTP1 and PTP2 in polar tube biogenesis throughout the microsporidian phylum.

2. Materials and methods

2.1. Microsporidian spores

Antonosporea (formerly *Nosema*) *locustae* spores, arising from infected grasshoppers, were commercially available from M & R Durango. Insectary (Bayfield, Colorado). *P. grylli* was produced in the fat body of crickets (*Gryllus bimaculatus*) that were maintained in the laboratory as yet described (Sokolova et al., 2003). Purified spores were stored at 4 °C in distilled water.

2.2. Recombinant PTP1 and PTP2 expression in *Escherichia coli*

DNA was released from *A. locustae* spores by either boiling 10 min at 100 °C in distilled sterile water or using ELU-Quick DNA purification Kit (Schleicher & Schuell). *P. grylli* DNA was extracted only by the latter method. PCR primers designed to amplify a 550-bp genomic DNA fragment representing the amino acid regions 21–222 of *A. locustae* PTP1 (AlPTP1) were Al-1 (5'-CGGGATCCCCCTGTAATTTTCATATGC-3') containing a *Bam*HI restriction site and Al-2 (5'-CGGAATTCTGGTATACTAATTGGCAC-3') with an *Eco*RI restriction site. The full sequence encoding *A. locustae* PTP2 (Al-PTP2) without signal peptide was amplified with the primers Al-5 (5'-CGGGATCCTTAAGC CACGGCTACGGC-3') containing a *Bam*HI restriction site and Al-6 (5'-CGGATTCTCCCTCAGACT TTTCTTG-3') with an *Eco*RI restriction site. For *P. grylli* PTP1 (Pg-PTP1), a partial gene sequence was first amplified using Al-1 and another primer, Al-3 (5'-GCAGGGGCATCCACTAGA-3') designed from *A. locustae* gene. To determine the lacking 5' end, a primer upstream the ATG start codon, Al-4 (5'-GTGAAAAACTATAAATAG-3') was designed, and used with Pg-1 (5'-TGGAGGCATTGGCACAGGT-3').

PCR amplifications were performed using a Perkin-Elmer DNA thermal cycler 2400 apparatus in 50 µl reaction according to standard conditions (Eurobio). After denaturing DNA at 94 °C for 3 min, 35 cycles were run with 20 s of denaturation at 94 °C, 30 s of annealing at 50–55 °C and 1 min of extension at 72 °C, followed by a 10 min last extension step at 72 °C. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel and purified with QIA-quick gel extraction kit (Qiagen). After digestion with the two restriction enzymes *Bam*HI and *Eco*RI, they were cloned in-frame with glutathione S-transferase (GST) and eight histidine tag into a prokaryotic expression vector pGEX-4T1 (Pharmacia). The resulting recombinant plasmids pGEX-4T1-PTP1 and pGEX-4T1-PTP2 were introduced in the *E. coli* BL21⁺ strain. After induction with 2 mM IPTG for 4 h, bacterial proteins were solubilized in 2.5% SDS, 100 mM DTT then analyzed by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide

gel. SWISS mice immunization with the expressed protein was carried out as described above.

To amplify *Pg-ptp2* we designed two primers: Pg-2 (5'-CGCGAAGGGAAGCTTAC-3') specific of *Pg-ptp1* 3' end and Al-7 (5'-AGATTTCGCATTCGCCACA-3') specific of the C-terminus of an Al-PTP2 cysteine-rich region. To determine the 3' end of *Pg-ptp2*, we used: Pg-3 (5'-GTGCGTGAAGAAGCTAGG-3') characteristic for a cysteine-rich region and Al-8 (5'-ATT TTAGATTAAGCGCC-3') specific of *Al-ptp2* 3' end. The PCR product was cloned in pGem-T easy vector and sequenced.

2.3. Antibody production

Polyclonal antibodies against *E. coli* expressed recombinant proteins were produced in SWISS mice from protein bands separated by SDS-PAGE. After Coomassie blue staining, bands were excised and crushed in distilled water with a Potter apparatus. Samples were homogenized with Freund's adjuvant for the first injection and Freund's incomplete adjuvant for the next injections (days 14, 21, and 28). Mice were injected intraperitoneally with the above samples and sera were collected 1 week after the last injection and stored at -20°C .

2.4. SDS-PAGE and Western blotting

Total proteins from *A. locustae* and *P. grylli* spores were extracted in a lysis buffer containing 2.5% SDS and 100 mM DTT. Spores were destroyed by boiling for 15 min followed by 10 freezing–thawing cycles in liquid nitrogen and sonications (10×30 s on ice). Protein samples were analyzed by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels. Differential protein extractions involved the treatment of spores with 2.5% SDS and then with lysis buffer containing 2.5% SDS and 100 mM DTT.

For immunoblotting, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore). Membranes were saturated in PBS–5% skimmed milk and incubated for 3 h with appropriate mouse antibodies dilution (1:500 to 1:1000). After washing in PBS–0.1% Triton X-100, membranes were reacted with horseradish phosphatase alkaline-conjugated goat anti-mouse IgG (1:10,000 dilution, Promega) and revealed by NBT-BCIP (Promega).

2.5. Indirect immunofluorescence assays

Spores were homogenized in PBS and placed on polylysine-treated cover glasses. *A. locustae* and *P. grylli* spores were fixed with 100% methanol for 20 min at -80°C . Slides were permeabilized with PBS–0.5% Triton X-100 and saturated with PBS–5% skimmed milk. Slides were incubated with antibodies diluted at 1:100 in PBS–0.1% Triton X-100 for 1 h. After washing with

PBS–0.1% Triton X-100, slides were incubated with a dilution of 1:1000 Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes). Preparations were then examined with a Leica epifluorescence microscope.

2.6. Sequence analysis

Antonospora locustae genome sequencing project is performed at the Marine Biological Laboratory (Woods Hole, USA) funded by NSF Award No. 0135272. Sequence data are available on the Marine Biological Laboratory server (<http://jbpc.mbl.edu/Nosema/index.html>). Gene and protein statistical analysis, molecular masses, and isoelectric points (pIs) were calculated using FREXSQ, SAPS, and MWCALC, available on the French molecular biology server INFOBIOGEN (<http://www.infobiogen.fr>). Protein motifs and peptide signal were predicted using PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>). Searches for homologous proteins in databases were done using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Potential sites of N- and O-glycosylations were determined using NetOglyc and NetNglyc servers (<http://us.expasy.org>). Secondary structures were predicted using NPSA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>).

2.7. Detection of glycosylated proteins

2.7.1. Lectins overlay

The binding of two lectins (ConA, WGA, Sigma) to fixed spores was tested in fluorescence microscopy after permeabilization in PBS–0.5% Triton X-100 and incubation with lectin-FITC (Sigma) diluted at 1:40 in PBS. Blots of proteins extracted in 2.5% SDS and 100 mM DTT were treated with lectins (ConA, GNA; EY laboratory) diluted at 1:1000. After washing in TBS (50 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl), the membranes were reacted with a goat anti-biotin antibody (Sigma) diluted at 1:1000 and finally with a peroxidase conjugated anti-goat IgG (Sigma) at 1:10,000. Lectin binding was detected with a chemoluminescent detection system (ECL+ Western blot detection kit, Amersham).

2.7.2. ConA purification

For ConA purification, proteins representative of 10^9 *A. locustae* spores were sequentially extracted with 1% SDS, 2.5% SDS, and 9 M urea. PTPs were then solubilized with 2% DTT as described (Keohane et al., 1996). Five hundred microliters of a suspension of ConA–Agarose beads (Amersham) was washed with 500 μl of binding buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 , and 1 mM CaCl_2) to remove ethanol. PTP samples (50 μl) were each loaded on ConA beads with 150 μl of binding buffer and incubated at 4°C for 3 h. The beads were washed with 500 μl of binding buffer to eliminate the unbound proteins. The bound proteins were sequentially eluted with 200 μl of increasing

concentration (0.1, 0.2, and 0.5 M) of α -D-methylmannopyranoside (Aldrich), a specific ConA competitor. The purified proteins were precipitated with 10% trichloroacetic acid and washed twice with 100% ethanol. Protein pellet was resuspended in 40 μ l of Laemmli buffer containing 100 mM DTT and 2.5% SDS. The collected fractions were separated by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membrane. AI-PTP1 was detected by immunoblotting using a mouse anti-AI-PTP1 antibody diluted at 1:1000 followed by an alkaline phosphatase conjugated anti-mouse antibody (1:10,000). The strips were revealed with NBT and BCIP.

2.8. Electron microscope immunocytochemistry

Pellets of *A. locustae* spores were fixed with 4% paraformaldehyde–0.1% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4. After infusion for 1 h at room temperature in a 25% glycerol–5% DMSO mixture, the samples were frozen in pasty nitrogen. Ultra-thin sections were performed using a Leica Ultra-Cut ultramicrotome equipped with FCS system, then picked up on collodion-coated nickel grids and stored in PBS buffer prior to immunocytochemistry processing. After saturation treatment for 1 h with 1% ovalbumin in PBS, grids were incubated for 3 h with various dilutions of anti-polar tube antibodies then for 1 h with a 1:100 dilution of goat anti-mouse IgG conjugated with 10 nm colloidal gold particles (Sigma). After washing, the grids were treated with a 4:1 (v/v) mixture of methylcellulose/4% uranyl acetate for 10 min, left to dry, and then observed with a JEOL 1200 \times transmission electron microscope.

3. Results

3.1. Two neighboring ORFs in the *A. locustae* genome potentially encode polar tube proteins

In a previous study, single-copy genes coding for the polar tube proteins PTP1 and PTP2 have been shown to

form a tandemly organized couple in three *Encephalitozoon* species (Delbac et al., 2001). The two open reading frames (ORFs) are located on chromosome VI and separated by 860 bp in *E. cuniculi*. They are designated as ECU06_0250, PTP1 and ECU06_0240, PTP2 (respective Accession Nos.: NP_585781 and NP_585780).

About 2.2 Mbp from the 5.4 Mbp genome of *Antonosporea* (*Nosema*) *locustae* are currently available as 199 contigs ranging from 3 to 50 kbp (<http://jbpc.mbl.edu/Nosema/Contigs/>). Interestingly, the *A. locustae* contig 605 carries several ORFs having counterparts on *E. cuniculi* chromosome VI, including three ORFs close to the *ptp1/ptp2* locus (Fig. 1). Extending a few bp upstream of *ptp1*, ECU06_0260 (NP_585172) has been assigned to the E2F/DP transcription factor family, more specifically to a dimerization partner (DP). This sequence indeed shares 48% similarity and 24% identity with *Drosophila melanogaster* E2F-DP (Q24318). The corresponding *A. locustae* homologue on contig 605 is surrounded by two ORFs without predicted function, that are referred as to ORF-A and ORF-B in Fig. 1. A gene encoding a putative nuclear protein with an RNA recognition domain (transformer-2 like protein) is located just downstream of either *ptp2* in *E. cuniculi* (ECU06_0230i, NP_585779) or ORF-B in *A. locustae*. A leucyl-tRNA synthetase gene occupies the second position upstream of either *ptp1* in *E. cuniculi* (ECU06_0280, NP_585784) or ORF-A in *A. locustae*. The gene in the first position upstream of *A. locustae* ORF-A codes for an unknown protein. An homologue of this gene is also located on *E. cuniculi* chromosome VI but extends farther from the *ptp1/ptp2* locus (ECU06_1320, NP_585888). For every considered gene, the transcriptional direction is conserved in both species (Fig. 1).

This region of synteny in *E. cuniculi* and *A. locustae* led us to wonder if the ORFs A and B may represent *A. locustae* *ptp1* and *ptp2* genes. If taking the first in-frame ATG codon as the initiation codon, ORF-A should have a 1263-bp coding capacity for a protein of 420 amino acid (aa) residues. However, two other in-frame ATG codons are located 30 nucleotides (nt) and 195 nt

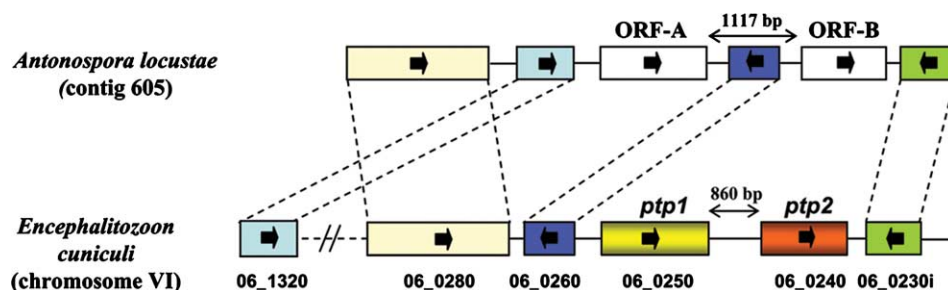


Fig. 1. Syntentic region in *Encephalitozoon cuniculi* and *A. locustae*, centered on two *E. cuniculi* *ptp* genes. A part of the *A. locustae* contig 605 can be aligned with an *E. cuniculi* chromosome VI segment containing adjacent *ptp1* and *ptp2*. Homologous genes in conserved position are represented by color boxes and joined by broken lines. Unannotated ORF-A and ORF-B are represented by white boxes. Transcriptional directions are indicated by arrows. ECU06_1320 and ECU06_0280 are separated by 130 kb. The nucleotide positions on the contig 605 for ORF-A and ORF-B are 11,156–12,415 and 13,536–14,396, respectively.

downstream of the first ATG. Only the third methionine is followed by a hydrophobic von Heijne peptide (18 aa), as expected for secreted proteins such as those destined to the polar tube. The putative protein beginning with this methionine contains 355 aa (337 aa after cleavage of the signal peptide) and exhibits PTP1-like features including an acidic pI (5.2), a high proline content (19.8%), several internal proline-rich repeats, and a C-terminal cysteine residue (Table 1). ORF-B is 864-bp long and encodes a 287-aa protein, with a calculated molecular mass close to 29 kDa after exclusion of the predicted 19-aa amino terminal signal sequence. Basic pI (9.1), lysine richness (12.3%), and conservation of eight cysteine residues are reminiscent of *Encephalitozoon* PTP2s (Table 1). Thus, despite a high divergence at the sequence level (see alignment in Fig. 2), the hypothesis that the products of the two considered *A. locustae* genes are the counterparts of *Encephalitozoon* PTP1 and PTP2 remains tenable.

3.2. Expression in *Escherichia coli* of recombinant polypeptides from *A. locustae* ORFs A and B

To better characterize the products of *A. locustae* ORFs A and B, recombinant proteins were expressed in *E. coli*. The expression of the whole protein from ORF-A (with third ATG as the initiation codon) was unsuccessful. Two different constructs were further done, the one corresponding to an N-terminal protein region (aa 21–222) and the other to a C-terminal part (aa 207–355). After IPTG induction, recombinant polypeptides were analyzed by SDS–PAGE. A 47-kDa protein was highly expressed in the case of the N-terminal fusion protein

(Fig. 3, lanes 2 and 3) whereas the expression of the C-terminal fusion protein was very low (not shown).

For ORF-B, a 800-bp fragment encoding the protein without its potential signal peptide was PCR-amplified and cloned in a pGEX-4T1 vector. SDS–PAGE analysis from IPTG-induced bacteria indicated a high expression level of a 56-kDa fusion protein (Fig. 3, lanes 4 and 5). This corresponds to the expected size, given that the recombinant protein was tagged to N-terminal GST and C-terminal polyhistidine peptide. After purification on Ni–NTA columns, recombinant polypeptides from both ORF-A (N-terminal part) and ORF-B were injected in mice to produce polyclonal antibodies for immunolocalization experiments.

3.3. The products of *A. locustae* ORFs A and B are targeted to the sporal polar tube

In immunofluorescence assay (IFA), using mouse antisera directed against the recombinant protein from ORF-A, a strong fluorescent signal is associated with the extruded polar tubes of *A. locustae* spores (Fig. 4B). Antibodies raised against ORF-B product also reacts exclusively with extruded polar tubes (Fig. 4C). Consistent with the diplokaryotic nature of *A. locustae*, two nuclei in transit through the extruded polar tube are visualized after DAPI staining (Fig. 4D). An insufficient permeabilization of the thick spore wall is likely responsible for the absence of labeling of intraspore polar tubes, as yet observed in other microsporidia (unpublished data).

To better assess antibody specificity, immunolocalization experiments were carried out at the ultrastruc-

Table 1
Major characteristics of PTP1 (A) and PTP2 (B) from *E. cuculii* (Ec), *E. hellem* (Eh), *E. intestinalis* (Ei), *A. locustae* (Al), and *P. grylli* (Pg)

Protein	Length (aa number)		pI	Major aa (%)		Cysteine residue number	C-terminal residue	Number of glycosylation potential sites	
	Precursor	Mature protein		Pro	Gly			O-Glyc	N-Glyc
A									
Ec-PTP1	395	373	4.7	13.4	11.8	17	C	37	3
Ei-PTP1	371	349	4.5	13.7	8.3	17	C	56	3
Eh-PTP1	453	431	4.4	14.6	12.9	21	C	32	0
Al-PTP1	355	337	5.2	19.8	10.6	12	C	19	1
Pg-PTP1	351	333	5.2	21.6	14.7	12	C	19	1
	Length (aa number)		pI	Major aa (%)		Cysteine residue number	C-terminal residue	Number of glycosylation potential sites	
	Precursor	Mature protein		Lys	Glu			O-Glyc	N-Glyc
B									
Ec-PTP2	277	264	8.6	12.1	9.5	8	E	3	1
Ei-PTP2	275	262	8.6	11.8	6.2	8	E	4	1
Eh-PTP2	272	259	8.6	10.8	9.5	8	E	5	2
Al-PTP2	287	268	9.1	12.3	9.3	8	G	1	0
Pg-PTP2	287	268	8.9	12.3	8.6	8	K	2	1

The most abundant amino acid is proline in PTP1 and lysine in PTP2. The mature protein correspond to proteins after removing of the predicted N-terminal signal peptide. The pI, amino acid percentages and the number of O- and N-glycosylation potential sites are deduced from the mature proteins.

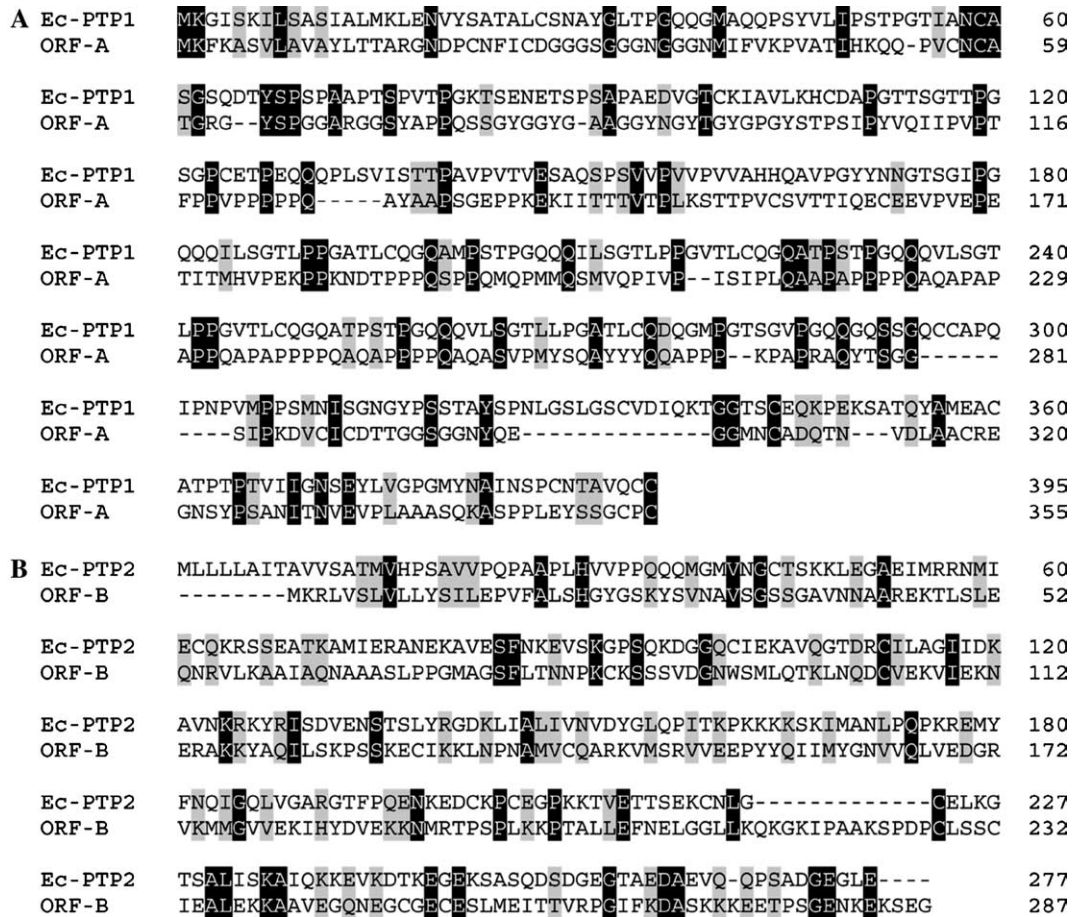


Fig. 2. Alignment of *E. cuculii* PTP1 and PTP2 with amino acid sequences deduced from *A. locustae* ORF-A and ORF-B. Twenty-one percent of identity is found between Ec-PTP1 and ORF-A (A). Alignment of Ec-PTP2 and ORF-B show 19% of identity (B). Identical and similar residues are shaded in black and dark grey, respectively. Amino acids are numbered on the right.

tural level on thin sections of the parasitic cells. The antisera against the two different recombinant proteins provided similar immunogold staining patterns. Indeed, as illustrated in Figs. 4E–H, electron-dense gold particles are specifically distributed over both longitudinal and cross sections of the intrasporal polar tube which is characterized by a relatively high number of coils in *A. locustae* (17–18 in two layers). The anterior and straight part of the polar tube (manubrium) is also labeled (Fig. 4E). We conclude that the two studied proteins are located to the polar tube of *A. locustae*. It is ascertained that the lack of internal labeling in IFA is only relevant to permeabilization problems.

3.4. The two *A. locustae* PTPs can be extracted in the presence of a thiol-reducing agent

Encephalitozoon PTP1 and PTP2 are known to be solubilized in the presence of high concentrations of thiol-reducing agents such as dithiothreitol (DTT) and 2-mercaptoethanol (Keohane et al., 1996). A differential extraction procedure was therefore applied to

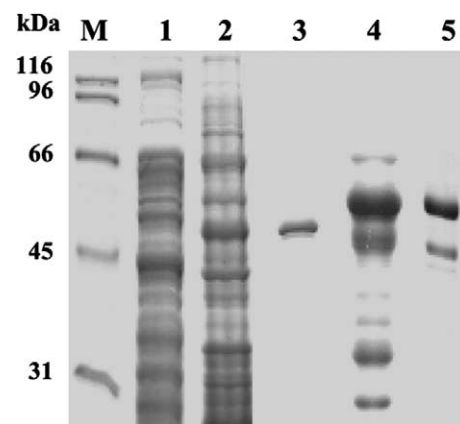


Fig. 3. Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. SDS-PAGE (10%) analysis of total proteins extracted from *E. coli* BL 21⁺ transformed with pGEX-4T1-ORF-A (lanes 2 and 3) and pGEX-4T1-ORF-B (lanes 4 and 5). Lane 1, Non-induced control; pGEX-4T1-ORF-A (lane 2) and pGEX-4T1-ORF-B (lane 4) after IPTG induction. Lanes 3 and 5 correspond to recombinant proteins from ORFs A and B after purification on Ni-NTA columns. Lane M, molecular mass standards in kilodalton (kDa, Bio-Rad). Gel was Coomassie blue stained.

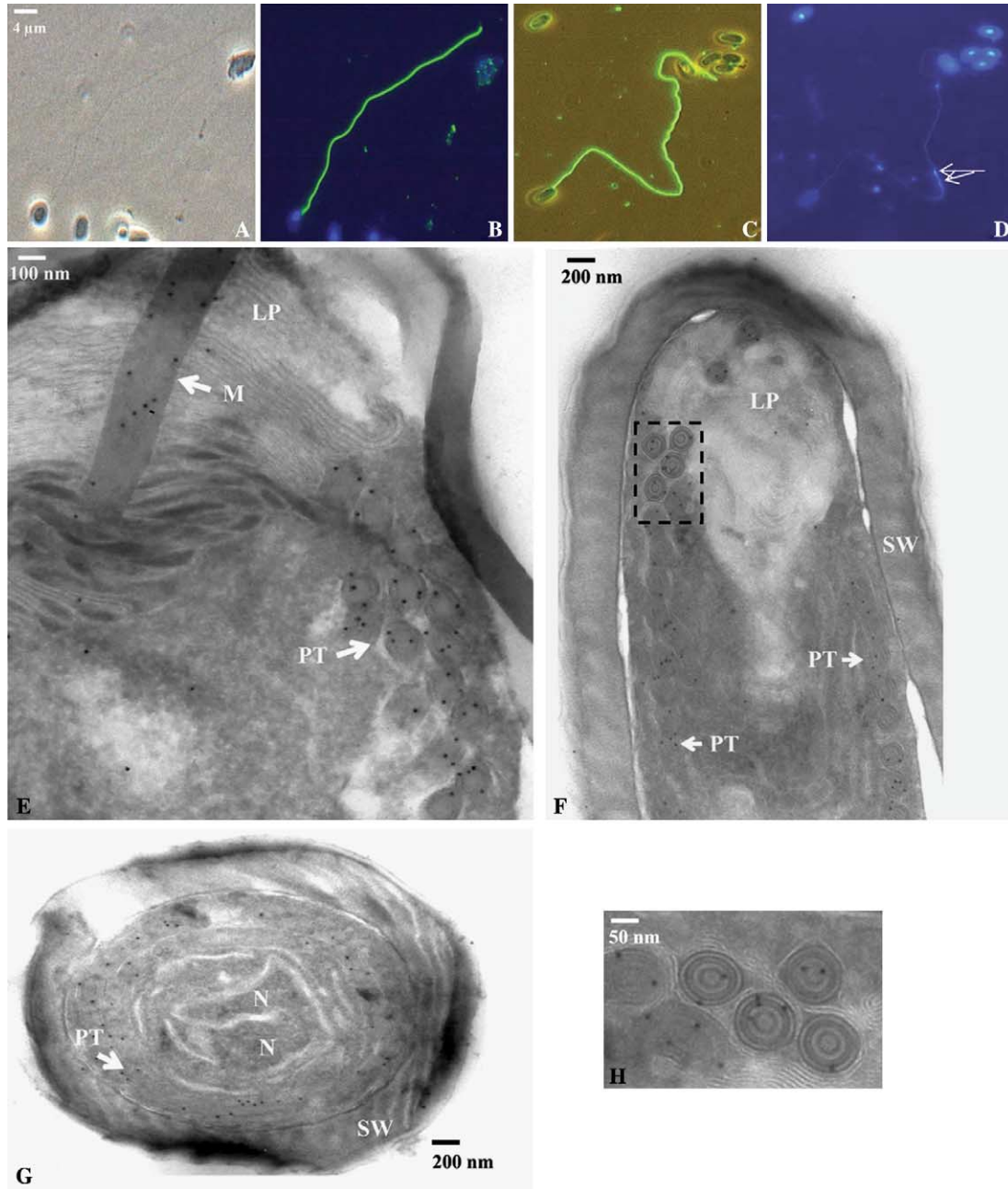


Fig. 4. (A–D) Immunofluorescence (IFA) of *A. locustae* spores treated with mice polyclonal antibodies produced against recombinant proteins from ORF-A (B) and ORF-B (C). The extruded polar tubes are strongly labelled. (A) Phase contrast microscopy view; (D) DAPI staining; (B) overlay of IFA and DAPI staining. Two nuclei can be seen within the extruded polar tube (D, arrows). (E–H) Electron microscope immunolabelling of *A. locustae* spore sections using antibodies raised against recombinant protein from ORF-A. Gold particles are associated with both the anterior straight part or manubrium (M, arrow) and posterior coiled region of the internal polar tube (PT, arrows). (H) An enlargement of (F), showing six concentric layers in polar tube cross-sections. LP, lamellar polaroplast; N, nucleus; SW, spore wall.

A. locustae spores to test whether the two identified PTPs are also sensitive to DTT treatment. After boiling of the spores in 2.5% SDS, freezing/thawing in liquid nitrogen and sonications, the SDS-soluble material was collected and the residual pellet was treated with a lysis buffer containing 100mM DTT then centrifuged. Resulting SDS- and DTT-soluble fractions were subjected to SDS-PAGE (Fig. 5A, lanes 1 and 2) and Western blotting was performed using the above-men-

tioned anti-recombinant protein antibodies (Fig. 5A, lanes 3–6).

The antiserum against ORF-A product (N-terminal part) reacts with a single broad band that is centered on about 50 kDa and is only detected in DTT extract (Fig. 5A, lanes 2 and 4). It is noteworthy that this apparent molecular size is higher than the predicted size (34 kDa). The antiserum against ORF-B product reacts with two protein bands that are also associated

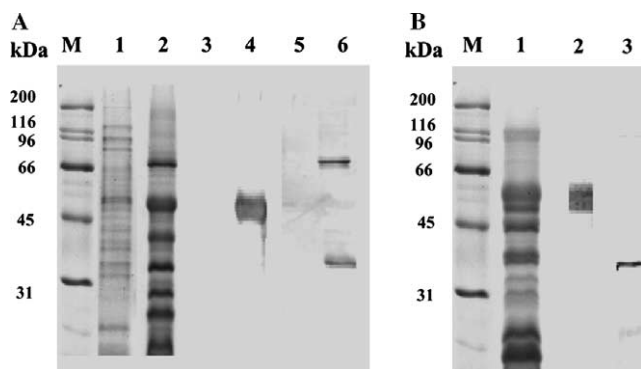


Fig. 5. (A) Detection of PTP1 and PTP2 in *A. locustae* after differential extraction of spore proteins and Western blotting. Lanes 1, 3, and 5: proteins extracted with 2.5% SDS. Lanes 2, 4, and 6: SDS-insoluble fraction extracted in 100 mM DTT. Immunoblots with anti-AI-PTP1 (3, 4) and anti-AI-PTP2 (5, 6) are shown in parallel with Coomassie blue stained SDS-PAGE (10%) profiles (1, 2). (B) Cross-reactivity of anti-AI-PTP1 and anti-AI-PTP2 antibodies with *P. gryllii* spore proteins extracted in 2.5% SDS and 100 mM DTT. Lane 1, Coomassie blue staining. Lanes 2 and 3, immunoblots with anti-AI-PTP1 and anti-AI-PTP2, respectively. Lane M, molecular mass standards in kDa (Bio-Rad).

with DTT extract. A 35-kDa band is consistent with the size predicted from the sequence (29 kDa), which is not the case of the other band migrating at about 70 kDa (Fig. 5A, lanes 2 and 6). In an attempt to characterize this cross-reactive molecular species, mice were immunized using the material derived directly from the 70-kDa band. Again, the corresponding antisera were found to detect extruded polar tubes in IFA, and both 70- and 35-kDa bands in Western blots (data not shown), suggesting a close relationship between the two antigens. Altogether our data strongly support the expression of two *A. locustae* PTPs that are related to *Encephalitozoon* PTP1 and PTP2. These proteins will be further named AI-PTP1 and AI-PTP2.

3.5. Two genes encoding PTP1 and PTP2 are also clustered in *P. gryllii*

The antisera raised against the two recombinant *A. locustae* PTPs were subsequently tested for a possible cross-reactivity with the cricket-infecting microsporidian *Paranosema* (formerly *Nosema*) *gryllii* that can be maintained in the laboratory. As expected, the extruded polar tubes of *P. gryllii* were stained in IFA, providing similar images to those for *A. locustae* (data not shown). In Western blots of *P. gryllii* spore lysates, the anti-AI-PTP1 and anti-AI-PTP2 antibodies react with a 50-kDa broad band and a 35-kDa band, respectively (Fig. 5B, lanes 2 and 3). Unlike *A. locustae*, no additional band at 70 kDa was detected with anti-AI-PTP2 (Fig. 5B, lane 3). Such cross-reactions support the presence of PTP1 and PTP2 homologues in *P. gryllii*.

To identify *ptp* genes in *P. gryllii*, several steps of PCR amplification were done with primers designed from *Al-ptp1* and *Al-ptp2* gene sequences (Fig. 6). First, using a pair of primers specific of *Al-ptp1* (AI-1/AI-3), we amplified the major part of an homologous gene in *P. gryllii*. The lacking 5' end region was determined using a primer (AI-4) designed 40-bp upstream of the *Al-ptp1* translation initiation codon. The coding sequence called *Pg-ptp1* (982 bp) represents a protein of 351 aa in length.

Assuming that *ptp1* and *ptp2* homologues are clustered on a same *P. gryllii* chromosome, we tested the combination of a specific primer determined from the identified *Pg-ptp1* (Pg-2) with a primer designed at the 3' end of *Al-ptp2* (AI-7) (Fig. 6). We succeeded in the amplification of a ~2-kb DNA fragment that contains a large part of a coding region (*Pg-ptp2*) similar to *Al-ptp2*. A primer specific of the 3' flanking region of *Al-ptp2* (AI-8) was then used to determine the 3' end of

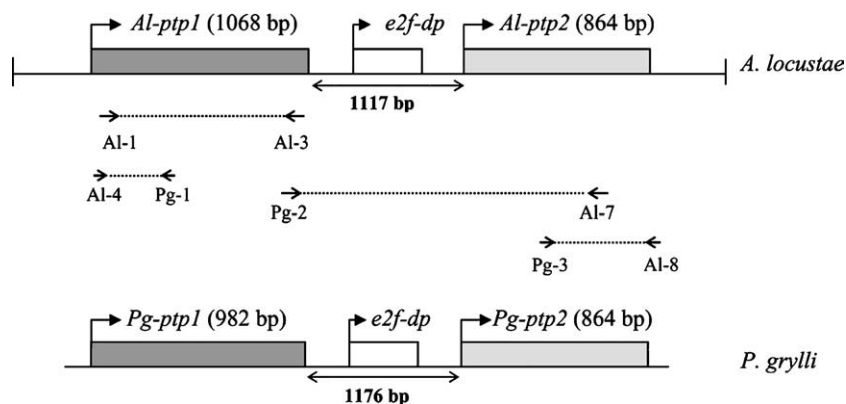


Fig. 6. Schematic representation of *ptp1-ptp2* clusters in *A. locustae* and *P. gryllii*. The position of the PCR primers used for the amplification of *ptp1* and *ptp2* genes in *P. gryllii* is indicated. AI-1 and AI-3 primers designed from *Al-ptp1* were first used to amplify a 1-kb DNA fragment of *Pg-ptp1*. The *Pg-ptp1* 5' end region was completed using two primers (AI-4 and Pg-1). The final *Pg-ptp1* sequence is 982 bp in length. Identification of *Pg-ptp2* was done using the primer pair Pg-2/AI-7. Pg-2 was specific to the 3' end of *Pg-ptp1* whereas AI-7 was determined from the known *Al-ptp2* sequence. The 3' end of *Pg-ptp2* was completed with the primers Pg-3 and AI-8. The final *Pg-ptp2* sequence is 864 bp in length. The spacing between *ptp1* and *ptp2* (1176 bp) in *P. gryllii* contains a divergent homologue of E2F dimerization partner (E2F-DP), like in *A. locustae*.

Pg-ptp2. The whole *Pg-ptp2* sequence is 864-bp long and encodes a protein of 287 residues. The interval between *ptp1* and *ptp2* ORFs in *P. grylli*, 59-bp longer than in *A. locustae*, also includes a gene coding for an E2F-DP factor (92% protein identity with *A. locustae* homologue).

3.6. Comparative analysis of PTP1 and PTP2 sequences from *A. locustae* and *P. grylli*

Al-PTP1 (355 aa) and Pg-PTP1 (351 aa) are acidic proline-rich proteins with well conserved N- and C-terminal regions, and a central region containing repetitive motifs (Fig. 7A and Table 1). Sequence alignment indicates 67% identity. The N-terminal segment displays the charge and polarity arrangement expected for a signal peptide. A cleavage site between residues G18 and N19 is predicted with PSORT program. This cleavage should yield a mature Al-PTP1 protein of 337 aa, with a theoretical molecular mass of 34,462 Da, and an acidic pI of 5.2. The mature Pg-PTP1 protein is slightly shorter (333 aa; 33,392 Da) with a same pI of 5.2. The proline content is

19.8% in *A. locustae* and 21.6% in *P. grylli*. Three other residues are highly represented: glycine (10.6 and 14.7%), alanine (10.1 and 8.4%), and serine (7.1 and 8.1%). No tryptophane residue is present. NetO algorithm predicts a high number of O-glycosylation sites (19 in both *A. locustae* and *P. grylli*), mainly within the central region. One potential N-glycosylation site occupies the position 310–313 in Al-PTP1 (NITN) and 306–310 (NISN) in Pg-PTP1. Importantly, there are 12 conserved cysteine residues, mostly distributed within the N- and C-terminal regions, including the one at the extreme C-terminus. As regard to the largest repeated motifs, Al-PTP1 exhibits five octapeptide repeats (consensus PPPPQAQA), four of these being tandemly arranged between residues 219 and 252 (Fig. 7A). The corresponding region in Pg-PTP1 has shorter repeats mainly represented by alternate proline and alanine residues. It can be also noted that Pg-PTP1 displays a significant extension (residues 101–106: GYGGGG) of a glycine- and tyrosine-rich stretch (Fig. 7A). Secondary structure prediction mainly indicates coil-coiled arrangement.

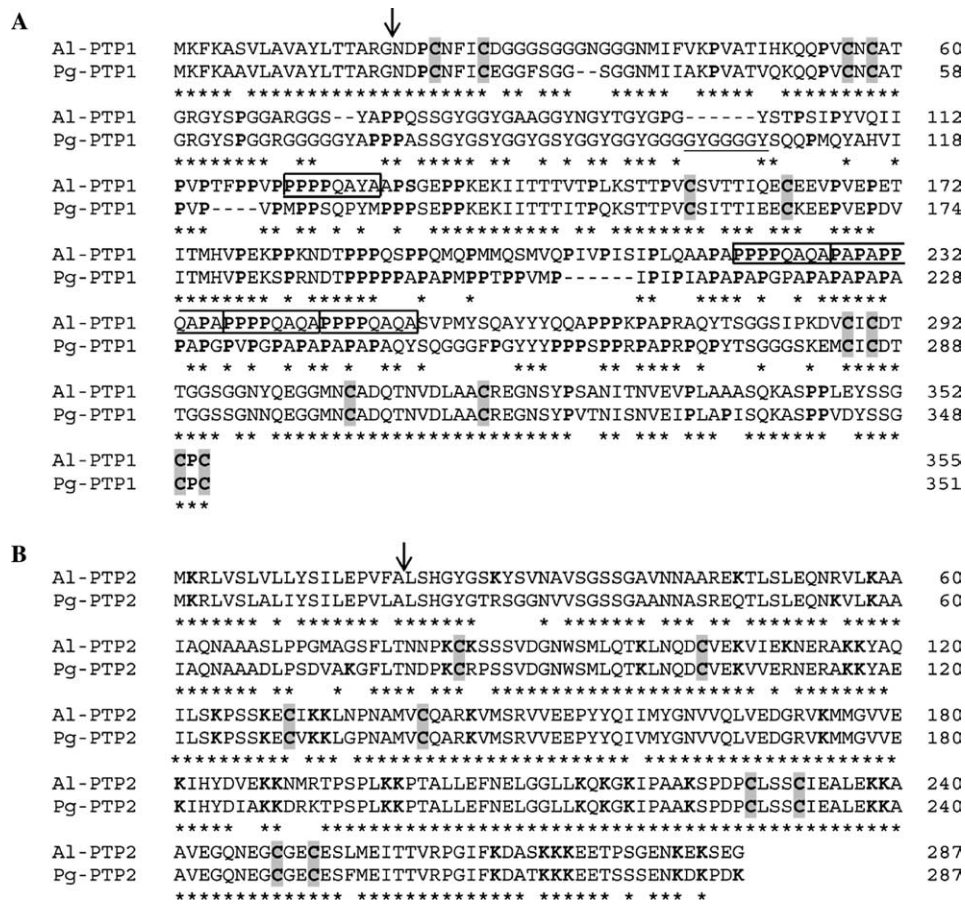


Fig. 7. Alignment of *A. locustae* and *P. grylli* PTP1 (A) and PTP2 (B) amino acid sequences. (A) The two PTP1s share very similar N- and C-terminal parts. The internal proline-rich region is more variable. Conserved cysteines are shaded and prolines indicated in bold. The common potential cleavage site for the predicted signal peptide is shown by an arrow. The repeated proline-rich motifs in *A. locustae* are boxed. In *P. grylli*, the glycine and tyrosine-rich stretch region (101–106) is underlined. (B) In PTP2, the eight conserved cysteine residues are shaded and lysine residues are in bold. The arrow indicates the potential cleavage site of the signal peptide. Identical residues are indicated by asterisks. Amino acids are numbered on the right. Al, *A. locustae*; Pg, *P. grylli*.

Of identical length (287 aa) and sharing 85.4% sequence identity, Al-PTP2 and Pg-PTP2 are basic proteins characterized by lysine richness (Fig. 7B and Table 1). A predicted N-terminal signal peptide should be cleaved between residues A19 and L20 in both proteins. Thus, the mature proteins (268 aa) have similar calculated molecular masses (Al-PTP2: 29,170 Da, Pg-PTP2: 29,211 Da) and *pI*s (9.1 and 8.9, respectively). The lysine content attains 12.3% in both cases. Other predominant residues are glutamate (9.3 and 8.6%), serine (9.3 and 8.9%), and alanine (8.2%). Eight cysteine residues are present and perfectly conserved in position, like in *Encephalitozoon* homologues. In contrast to PTP1s, a very few number of O-glycosylation sites is predicted. Several α helix arrangements are found using secondary structure prediction algorithms.

3.7. PTP1 proteins are mannosylated

Throughout preliminary experiments aimed to evaluate the capacity of microsporidian cells to bind different fluorochrome-conjugated lectins, we mainly observed a strong fluorescence of extruded polar tubes in the presence of ConA-FITC (data not shown). This incited us to test the reactivity of two mannose-binding lectins (ConA and GNA) on blots of *A. locustae* spore proteins. Both lectins react with a major 50-kDa band, at the same position as the protein specifically recognized by anti-Al-PTP1 antibodies (Fig. 8A).

To determine whether Al-PTP1 is really the protein able to bind such lectins, ConA affinity chromatography was used as a procedure of enrichment in mannosylated proteins. Elution of bound proteins was done using increasing concentrations of the specific inhibitor α -D-methylmannopyranoside. Western blotting of ConA

affinity eluates with anti-Al-PTP1 revealed the expected protein with an apparent molecular mass of 50 kDa (Fig. 8B). As the binding can be competed by α -D-methylmannopyranoside at a high concentration, we conclude that Al-PTP1 is recognized by ConA and therefore mannosylated. Similar results were obtained for Pg-PTP1 (data not shown). In addition to proline richness, the glycosylated status of PTP1s provides a justification of their anomalous migration in SDS-PAGE gels. No reactive band was observed after application of PTP2-specific antibodies to the blots of ConA affinity eluates, suggesting that PTP2s are not mannosylated.

4. Discussion

The polar tube is a microsporidia-specific organelle that plays a major role during the host-cell invasion processes. Of the three polar tube proteins that have been so far identified in *Encephalitozoon* species, PTP1 and PTP2 are encoded by two closely linked and tandemly arranged single-copy genes (Delbac et al., 1998a, 2001). Synteny conservation between *E. cuciculi* and *A. locustae* has facilitated the present identification and characterization of *ptp1* and *ptp2* counterparts in this insect-infecting microsporidian. We also succeeded in PCR-amplification of homologous sequences in *P. grylli*, another insect parasite and a close relative of *A. locustae*. PTP1 and PTP2 likely represent the 56- and 35-kDa DTT-soluble proteins described in *P. grylli* (Dolgikh and Semenov, 2003). The considered gene clusters are schematized in Fig. 9.

The preservation of a chromosomal region characterized by neighboring *ptp1* and *ptp2* genes in *Encephalitozoon* and *Antonosporea-Paranosema* species is consistent with a recent genome survey of *A. locustae* revealing that 13% of the studied genes are in the same chromosomal context as in *E. cuciculi* and 30% of the genes are separated by a small number of short rearrangements (Slamovits et al., 2004b). The *E. cuciculi ptp3* gene is located between the genes encoding diptine synthase and Sec13 homologues (Peuvel et al., 2002). A similar location can be predicted in *A. locustae* (unpublished data). Regions of synteny have been identified in various prokaryotic and eukaryotic genomes. Among protists, three representatives of the *Leishmania* and *Trypanosoma* genera within the trypanosomatid family have retained especially large syntenic blocks (Ghedini et al., 2004). Among hemiascomycetous fungi, the percentage of synteny decreases when comparing *Saccharomyces* to distantly related genera such as *Pichia* and *Yarrowia* (Herrero et al., 2003). In spite of large variations in protein sequence conservation, more than 90% of the genes in the small genome (9.2 Mbp) of *Ashbya gossypii* exhibit a pattern of synteny with *S. cerevisiae* (Dietrich et al., 2004). In fact, as stressed by Stechmann (2004), a high

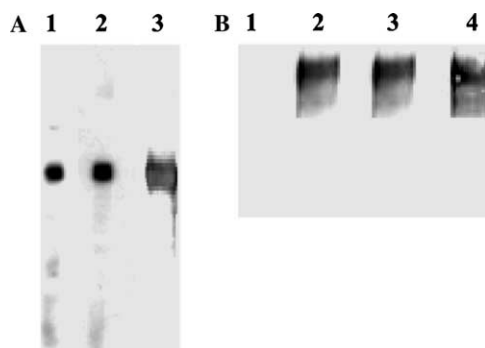


Fig. 8. Evidence for PTP1 mannosylation. (A) Al-PTP1 reacts with lectins ConA and GNA. Blots of *A. locustae* total proteins extracted in SDS 2.5%, DTT 100 mM were submitted to either lectins (Con A: lane 1 and GNA: lane 2) or anti-Al-PTP1 (lane 3). (B) Samples from ConA affinity chromatography were separated on 10% SDS-PAGE and PTP1 was detected by immunoblotting with anti-Al-PTP1 (dilution 1:1000). ConA bound proteins were eluted with increasing α -D-methylmannopyranoside concentrations. Lane 1, unbound proteins. Lanes 2, 3, and 4 correspond to eluates 0.1, 0.2, and 0.5 M, respectively.

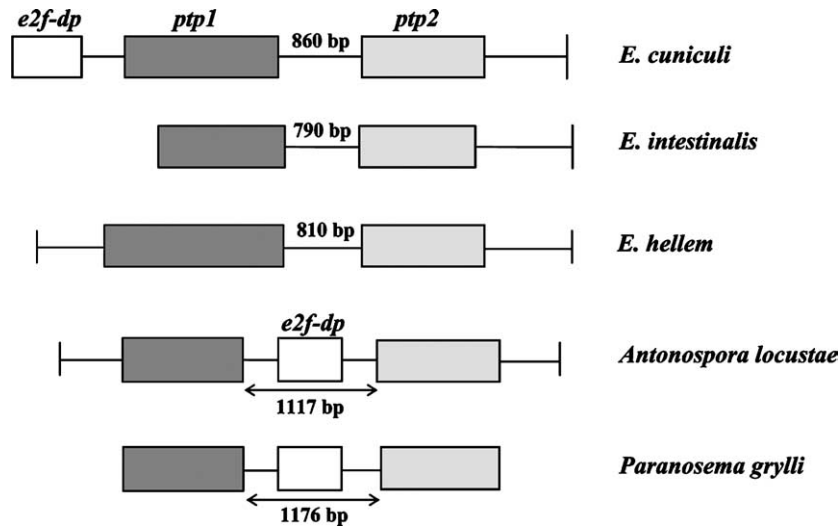


Fig. 9. Clustering of *ptp1* and *ptp2* genes in the studied species in the *Encephalitozoon* and *Antonospora* groups. *ptp1* genes are represented by dark grey boxes, *ptp2* genes by clear grey boxes. White boxes represent *e2f-dp* genes. The *e2f-dp* gene is localized upstream of *ptp1* in *E. cuniculi* and between *ptp1* and *ptp2* in the two insect microsporidia *A. locustae* and *P. grylli*. The size of the *ptp1*–*ptp2* spacing is indicated in bp.

degree of synteny can be associated with genome compaction if considering the higher probability of loss of viability due to gene disruption events in small genomes. Whether the frequency of rearrangements is really lower remains questionable. Slamovits et al. (2004b) observed that the intergenic regions between conserved gene pairs are shorter than the intergenic regions between nonconserved pairs, suggesting that conservation of synteny in microsporidia is a direct consequence of the extreme compaction of their genomes.

Some cases of gene cluster organization could arise from a strong selection pressure preserving a proximity relationship between genes whose the products are related functionally and might be co-regulated. However, an alternative possibility is that such clustering of functionally associated genes appears simply by chance (Slamovits et al., 2004b). In *E. cuniculi*, some adjacent genes encode proteins that can interact within a common complex or can play complementary roles in a biochemical pathway. Typical examples are represented by one gene pair coding for H3 and H4 histones on chromosome IX and three gene pairs for dihydrofolate reductase and thymidylate synthase distributed on chromosomes I and VIII (Katinka et al., 2001). Strong interactions between PTP1 and PTP2, though being poorly documented, are required for polar tube assembly. We previously showed that the *E. cuniculi* *ptp1* and *ptp2* genes begin to be transcribed 44 h after infestation and mRNA levels increase in the same way up to 84 h post-infection (Peuvel et al., 2002). This correlates with the increasing fraction of parasitic cells entered into the sporogonic phase. However, the hypothesis that the tandem arrangement of *ptp1* and *ptp2* genes in *Encephalitozoon* species may be relevant to some transcriptional co-regulation is somewhat lessened by the interrupted

colinearity in *A. locustae* and *P. grylli*, both having an *e2f-dp* gene inserted between *ptp1* and *ptp2* genes.

It is worth noting that in mammalian cells the E2F family of transcription factors play crucial roles in controlling gene expression at both G1/S and G2/M transitions (Zhu et al., 2004) as well as in apoptosis suppression (La Thangue, 2003). The *E. cuniculi* genome sequence contains only one E2F homologue (ECU02_1350, NP_584860) that can be predicted to associate with DP homologue to form a heterodimer, as a prerequisite to the binding to target genes. BLAST analysis indicates that, despite its small length (196 aa), the putative microsporidian E2F has some similarity to human E2F-3 factor (AAN17846: 465 aa, 53% similarity, and 31% identity), one of the three transcriptional activators at G1/S that bind to the positive-acting E2F site in the mammalian *cdc2* promoter (Zhu et al., 2004). Representatives of the E2F-DP family have been found in animals, plants, and some protists such as *Plasmodium* and *Cryptosporidium*, but not in any of the ascomycetous and basidiomycetous fungi studied so far. Their preservation in fungi-related microsporidia is quite intriguing and should retain the attention in studies focusing on the control of microsporidian cell cycle and differentiation.

That *A. locustae* and *P. grylli* are two closely related species is in agreement with relatively high sequence homologies for both PTP1 and PTP2. In fact, these species should be placed within the same genus, as it has been previously suggested by other authors (Sokolova et al., 2003). Renaming *P. grylli* to *Antonospora grylli* would be judicious to avoid any confusion with the distant “true” *Nosema* genus. When comparing either PTP1s or PTP2s from *Encephalitozoon* and *Antonospora*–*Paranoosema* species, no significant amino acid

signatures were identified. This inter-genus protein sequence divergence somewhat contrast with the conserved morphological characteristics of the polar tube. Similarities in overall amino acid composition, solubility and electrophoretic properties of PTPs are, however, evident and some higher-order structural features are likely preserved. Although varying in size from 351 aa in *P. grylli* to 453 aa in *E. hellem*, all the proteins of the PTP1 family migrated in SDS–PAGE gels as 50–55 kDa broad bands (Delbac et al., 1998a; Keohane et al., 1998, and this study). Immunological cross-reactions exist between different microsporidian genera, which is consistent with the prediction of critical structural motifs in PTPs (Delbac et al., 1998b).

Similarly to those from *Encephalitozoon* spp., PTP1 and PTP2 from the two insect microsporidians are solubilized in the presence of DTT, indicating a major contribution of disulfide bonds to polar tube integrity. The two proteins comprise candidate cysteine residues for the establishment of covalent linkages. Whatever the considered microsporidian genus, eight cysteine residues are present in PTP2 and one cysteine is typically found at the extreme C-terminus of PTP1. A primordial role of cysteine residues in inter-molecular interactions for polar tube assembly was first inferred from in vitro polymerization of a mercaptoethanol-reduced 23-kDa PTP in *Ameson michaelis* (Weidner, 1976). Data from chemical cross-linking experiments have provided a strong argument for the formation of disulfide linkages between *E. cuniculi* PTP1 and PTP2 (Peuvel et al., 2002). The conservation of the C-terminal cysteine in PTP1 sequences is suggestive of a critical residue involved in the branching between only PTP1 molecules or both PTP1 and PTP2 molecules. In the present work, we have observed that a 70-kDa protein band from *A. locustae* DTT-soluble fraction is also recognized by anti-PTP2 antibodies. This cannot be interpreted as a resistant PTP1–PTP2 complex because of the lack of reactivity with anti-PTP1 antibodies. Whether the 70-kDa band represents a non-disrupted PTP2 dimer or a novel PTP-related protein remains to be investigated.

Two mannose-binding lectins (GNA and ConA) have been shown to bind PTP1 in blots of *A. locustae* and *P. grylli* proteins. Moreover, PTP1 was retained on ConA affinity chromatography columns, not PTP2. A recent biochemical study has revealed that purified PTP1 of *E. hellem* is modified by O-linked mannosylation (Xu et al., 2004). This is in perfect agreement with the high number of predicted O-glycosylation sites (Table 1), mainly distributed through the repeat-containing central region of PTP1, and with previous cytochemical evidence for some glycoconjugates in the polar tube (Thiéry, 1972; Vavra, 1972). The *E. cuniculi* genome sequence indeed contains a minimal set of genes required for O-mannosylation pathway but those characteristic for N-glycosylation have not been identified (Katinka et al., 2001; Vivarès

and Méténier, 2004). Deglycosylation experiments conducted with *E. hellem* PTP1 also failed to provide evidence for N-glycosylation (Xu et al., 2004). First described in *Saccharomyces cerevisiae* among eukaryotes (Sentandreu and Northcote, 1969), O-mannosylation has been also demonstrated in rabbit and bovin (Chiba et al., 1997; Sasaki et al., 1998). In the pathogenic fungus *Candida albicans*, O-mannosylated spore wall proteins interact directly with host cell fibrinogen leading to host cell adhesion (Casanova et al., 1992; Timpel et al., 2000). PTP1 mannosylation may be essential to protect the microsporidian polar tube against proteolytic degradation and/or to interact with host cell surface. Interactions between mannosylated PTP1 and some unknown host cell mannose-binding molecules are supported by the decreased level of infection by *E. hellem* in mannose-pre-treated RK13 cells (Xu et al., 2004).

From our data, it can be concluded that synteny conservation in microsporidian genomes provides a good basis to investigate essential genes required for parasite-specific cellular organization. We have recently assigned novel proteins to either the spore wall or polar tube of *E. cuniculi*. Further studies on their potential homologues encoded by genes in syntenic areas of *E. cuniculi* and *A. locustae* genomes should contribute to the understanding of the most basic spore differentiation processes that may have been maintained during the evolution of microsporidia.

Acknowledgments

We thank P. Keeling for kindly providing some *A. locustae* DNA at the beginning of this project. We are grateful to E. Nassonova that produced *P. grylli* spores in the fat body of crickets and A. Voldoire for technical advices. We acknowledge Dr. M.L. Sogin for making the *A. locustae* genome sequences available in a public web site prior to publication. V.P. was supported by a grant from “Ministère de l’Education Nationale de la Recherche et de la Technologie.”

References

- Casanova, M., Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Llombart-Bosch, A., Sentandreu, R., Martinez, J.P., 1992. Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 60 (10), 4221–4229.
- Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A., Endo, T., 1997. Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J. Biol. Chem.* 272 (4), 2156–2162.
- Delbac, F., Peyret, P., Metenier, G., David, D., Danchin, A., Vivares, C.P., 1998a. On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Microbiol.* 29 (3), 825–834.

- Delbac, F., Duffieux, F., David, D., Metenier, G., Vivares, C.P., 1998b. Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45 (2), 224–231.
- Delbac, F., Peuvrel, I., Metenier, G., Peyretailade, E., Vivares, C.P., 2001. Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of *ptp1* and *ptp2* genes in three *Encephalitozoon* species. *Infect. Immun.* 69 (2), 1016–1024.
- Dietrich, F.S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pohlmann, R., Luedi, P., Choi, S., Wing, R.A., Flavier, A., Gaffney, T.D., Philippsen, P., 2004. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science* 304 (5668), 304–307.
- Dolgikh, V.V., Semenov, P.B., 2003. The spore wall and polar tube proteins of the microsporidian *Nosema grylli*: the major spore wall protein is released before spore extrusion. *Tsitologiya* 45 (3), 324–329.
- Franzen, C., 2004. Microsporidia: how can they invade other cells. *Trends Parasitol.* 20 (6), 275–276.
- Ghedini, E., Bringaud, F., Peterson, J., Myler, P., Berriman, M., Ivens, A., Andersson, B., Bontempi, E., Eisen, J., Angiuoli, S., Wanless, D., Von Arx, A., Murphy, L., Lennard, N., Salzberg, S., Adams, M.D., White, O., Hall, N., Stuart, K., Fraser, C.M., El-Sayed, N.M.A., 2004. Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 134, 183–191.
- Herrero, E., de la Torre, M.A., Valentin, E., 2003. Comparative genomics of yeast species: new insights into their biology. *Int. Microbiol.* 6 (3), 183–190.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., Vivares, C.P., 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414 (6862), 450–453.
- Keeling, P.J., 2003. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet. Biol.* 38 (3), 298–309.
- Keoghane, E.M., Orr, G.A., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Wittner, M., Weiss, L.M., 1996. Purification and characterization of a microsporidian polar tube protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79 (2), 255–259.
- Keoghane, E.M., Orr, G.A., Zhang, H.S., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Wittner, M., Weiss, L.M., 1998. The molecular characterization of the major polar tube protein gene from *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite of humans. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94 (2), 227–236.
- Keoghane, E.M., Orr, G.A., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Wittner, M., Weiss, L.M., 1999a. Polar tube proteins of microsporidia of the family Encephalitozoonidae. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46 (1), 1–5.
- Keoghane, E.M., Orr, G.A., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Wittner, M., Weiss, L.M., 1999b. Analysis of the major microsporidian polar tube proteins. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46 (5), 29S–30S.
- La Thangue, N.B., 2003. The yin and yang of E2F-1: balancing life and death. *Nat. Cell Biol.* 5 (7), 587–589.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M., 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu. Rev. Entomol.* 46, 667–702.
- Peuvrel, I., Peyret, P., Metenier, G., Vivares, C.P., Delbac, F., 2002. The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122 (1), 69–80.
- Sasaki, T., Yamada, H., Matsumura, K., Shimizu, T., Kobata, A., Endo, T., 1998. Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle alpha-dystroglycan. *Biochim. Biophys. Acta* 1425 (3), 599–606.
- Sentandreu, R., Northcote, D.H., 1969. Yeast cell-wall synthesis. *Biochem. J.* 115 (2), 231–240.
- Slamovits, C.H., Williams, B.A., Keeling, P.J., 2004a. Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonosporea locustae* n. comb. based on molecular and ultrastructural data. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51 (2), 207–213.
- Slamovits, C.H., Fast, N.M., Law, J.S., Keeling, P.J., 2004b. Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites. *Curr. Biol.* 14 (10), 891–896.
- Snowden, K.F., 2004. Zoonotic microsporidia from animals and arthropods with a discussion of human infections. In: Lindsay, D.S., Weiss, L.M. (Eds.), *Opportunistic Infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia World Class Parasites*, vol. 9. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 123–134.
- Sokolova, Y.Y., Dolgikh, V.V., Morzhina, E.V., Nassonova, E.S., Issi, I.V., Terry, R.S., Ironside, J.E., Smith, J.E., Vossbrinck, C.R., 2003. Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* Gen. Nov., Comb. Nov. (Sokolova, Seleznirov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg. *J. Invertebr. Pathol.* 84 (3), 159–172.
- Stechmann, A., 2004. Genome evolution: the dynamics of static genomes. *Curr. Biol.* 14 (12), R473–R474.
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schroppel, K., Ernst, J., 2000. Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 182 (11), 3063–3071.
- Thiéry, J.P., 1972. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.* 6, 987–1018.
- van Gool, T., Biderre, C., Delbac, F., Wentink-Bonnema, E., Peek, R., Vivares, C.P., 2004. Serodiagnostic studies in an immunocompetent individual infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *J. Infect. Dis.* 189 (12), 2243–2249.
- Vavra, J., 1972. Detection of polysaccharides in microsporidian spores by means of the periodic acid-thio-semicarbazide-silver protein test. *J. Microsc.* 14, 357–360.
- Vivares, C.P., Gouy, M., Thomarat, F., Méténier, G., 2002. Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 499–505.
- Vivarès, C.P., Méténier, G., 2004. The microsporidia genome: living with minimal genes as an intracellular eukaryote. In: Lindsay, D.S., Weiss, L.M. (Eds.), *Opportunistic Infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia World Class Parasites*, vol. 9. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 215–242.
- Vossbrinck, C.R., Andreadis, T.G., Weiss, L.M., 2004. Phylogenetics: taxonomy and the microsporidia as derived fungi. In: Lindsay, D.S., Weiss, L.M. (Eds.), *Opportunistic Infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia World Class Parasites*, vol. 9. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 189–213.
- Weidner, E., 1976. The microsporidian spore invasion tube. The ultrastructure, isolation, and characterization of the protein comprising the tube. *J. Cell Biol.* 71 (1), 23–34.
- Xu, Y., Takvorian, P.M., Cali, A., Orr, G., Weiss, L.M., 2004. Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidia that infects humans. *Infect. Immun.* 72 (11), 6341–6350.
- Zhu, W., Giangrande, P.H., Nevins, J.R., 2004. E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J.* 23 (23), 4615–4626.

Résumé

Les microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires formant des spores délimitées par une paroi très épaisse et qui renferment un appareil invasif original enroulé à l'intérieur du cytoplasme, le tube polaire. Sous l'influence de stimuli, ce tube subit une extrusion brutale permettant le transfert du contenu infectieux, appelé sporoplasme, dans une cellule hôte. Deux protéines constitutives du tube polaire (PTP1 et PTP2), dont les gènes sont organisés en tandem, ont été décrites au sein du genre *Encephalitozoon*. Une troisième protéine de plus grande taille, PTP3, n'a été identifiée que chez *E. cuniculi*. Dans le but d'améliorer nos connaissances sur la composition et l'architecture du tube polaire, nous avons recherché de nouvelles protéines constituant cet appareil d'invasion. La comparaison des génomes d'*E. cuniculi* et d'*Antonospora locustae* montre une forte conservation de l'organisation des gènes (synténie). Cette analyse a facilité la mise en évidence de protéines PTP1 et PTP2 chez *A. locustae* dont les séquences sont très divergentes de celles d'*E. cuniculi*. De plus, une particularité d'*A. locustae* est la présence de plusieurs gènes de type *ptp2*. L'organisation en cluster des gènes *ptp1* et *ptp2* est également conservée chez *Paranosema grylli*. L'analyse du protéome des stades tardifs de la sporogénèse d'*E. cuniculi* a ensuite permis d'identifier deux nouvelles PTPs (PTP4 et PTP5) dont les gènes sont organisés en tandem. Ces protéines qui ne présentent aucune homologie avec les autres PTPs connues ont également été identifiées chez *A. locustae* et *P. grylli*. La localisation de PTP4 à l'extrémité des tubes polaires dévaginés d'*A. locustae* suggère un rôle de cette protéine dans les interactions avec l'hôte. Enfin, des études de co-expression chez *E. coli* ont montré l'existence d'interactions entre les protéines PTP1 et PTP2. D'autre part, les données moléculaires sur la paroi sporale indiquent la présence de protéines de type SWP1 au niveau de l'exospore chez *E. cuniculi* et *E. intestinalis*. Nous avons identifié les séquences complètes de 2 protéines de la famille SWP1 chez *E. hellem*. Le polymorphisme important de leur extrémité C-terminale est d'intérêt dans le cadre d'études épidémiologiques. Enfin, indispensable à toute approche de génomique fonctionnelle, la mise en place de stratégies de transfection de la microsporidie *E. cuniculi* a été initiée. Seuls quelques transformants transitoires ont pu être obtenus.

Mots-clés : Microsporidie, parasite intracellulaire, synténie, invasion, tube polaire, interactions, paroi, transfection.

Abstract

Microsporidia are obligate intracellular parasites producing spores surrounded by a thick cell wall and containing the polar tube, a unique invasion apparatus coiled within the cytoplasm. Under stimuli, the polar tube is suddenly extruded allowing the transfer of the infectious content, named the sporoplasm, within the cytoplasm of a new host cell. Two polar tube proteins (PTP1 and PTP2), the genes of which are tandemly arranged, have been previously described in the three *Encephalitozoon* species. A third protein of higher size, PTP3, was only identified in *E. cuniculi*. To improve our knowledge of the polar tube composition and architecture, the search for new polar tube components has been undertaken. The comparison of *E. cuniculi* and *Antonospora locustae* genomes reveals significant gene order conservation (synteny). This syntenic relationship facilitated the characterisation of PTP1 and PTP2 proteins in *A. locustae* despite their high sequence divergences with those of *E. cuniculi*. In addition, the *A. locustae* genome is characterized by the presence of several *ptp2* like genes. The *ptp1* and *ptp2* gene cluster organization is also conserved in *Paranosema grylli*. An *E. cuniculi* proteomic analysis of proteins expressed in late sporogonial stages was helpful in the identification of two new PTPs (PTP4 and PTP5) the genes of which are tandemly arranged. These proteins, presenting no homology with other known PTPs, have been also identified in *A. locustae* and *P. grylli*. PTP4 is localized at the end terminal region of extruded polar tubes suggesting a role in host cell interactions. Co-expression experiments in *E. coli* showed the existence of interactions between PTP1 and PTP2. Moreover, molecular data concerning spore wall components indicate the presence of SWP1 proteins in the exospore of both *E. cuniculi* and *E. intestinalis*. In the present study, we identified the whole sequences of two SWP1-like proteins in *E. hellem*. The high variability of their C-terminal regions is of interest for epidemiological studies. Finally, for functional genomic approaches, the development of a transfection strategy of the microsporidia *E. cuniculi* was initiated. Only few transient transformants have been obtained.

Key-words: Microsporidia, intracellular parasite, synteny, invasion, polar tube, interactions, spore wall, transfection.