



**HAL**  
open science

**La différenciation sporale chez les microsporidies :  
imagerie 3D et isolement des stades de développement,  
analyse de l'expression différentielle de protéines  
structurales et première identification des glycanes**

Vanessa Taupin

► **To cite this version:**

Vanessa Taupin. La différenciation sporale chez les microsporidies : imagerie 3D et isolement des stades de développement, analyse de l'expression différentielle de protéines structurales et première identification des glycanes. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006. Français. NNT : 2006CLF21679 . tel-00702783

**HAL Id: tel-00702783**

**<https://theses.hal.science/tel-00702783>**

Submitted on 31 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.



Ecole Doctorale  
des Sciences de la Vie et de la Santé  
N° d'ordre 445

## **THESE**

pour l'obtention du grade de

### **DOCTEUR D'UNIVERSITE**

spécialité : **Parasitologie**

présentée et soutenue publiquement

par

**Vanessa TAUPIN**

le 6 octobre 2006

---

**LA DIFFERENCIATION SPORALE CHEZ LES MICROSPORIDIÉS:  
IMAGERIE 3D ET ISOLEMENT DES STADES DE DEVELOPPEMENT,  
ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE PROTEINES  
STRUCTURALES ET PREMIERE IDENTIFICATION DES GLYCANES**

---

#### **JURY**

Rapporteurs : M. Jean-François DUBREMETZ, DR CNRS, Université Montpellier II  
M. Jean-Claude MICHALSKI, DR CNRS, Université Lille I  
Président : M. Jacques BOHATIER, Professeur, Université Clermont-Ferrand I  
Examineur : M. Christian VIVARÈS, Professeur, Université Clermont-Ferrand II  
Directeur de thèse : M. Gérard PRENSIER, Professeur, Université Clermont-Ferrand II



Ecole Doctorale  
des Sciences de la Vie et de la Santé  
N° d'ordre 445

## **THESE**

pour l'obtention du grade de

### **DOCTEUR D'UNIVERSITE**

spécialité : **Parasitologie**

présentée et soutenue publiquement

par

**Vanessa TAUPIN**

le 6 octobre 2006

---

**LA DIFFERENCIATION SPORALE CHEZ LES MICROSPORIDIIES:  
IMAGERIE 3D ET ISOLEMENT DES STADES DE DEVELOPPEMENT,  
ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE PROTEINES  
STRUCTURALES ET PREMIERE IDENTIFICATION DES GLYCANES**

---

#### **JURY**

Rapporteurs : M. Jean-François DUBREMETZ, DR CNRS, Université Montpellier II  
M. Jean-Claude MICHALSKI, DR CNRS, Université Lille I  
Président : M. Jacques BOHATIER, Professeur, Université Clermont-Ferrand I  
Examineur : M. Christian VIVARÈS, Professeur, Université Clermont-Ferrand II  
Directeur de thèse : M. Gérard PRENSIER, Professeur, Université Clermont-Ferrand II



*"Car l'homme n'est pas tenté d'oublier qu'il est un animal intelligent, tandis qu'il peut lui arriver d'oublier qu'il est un animal sociable." Jean Rostand.*

## REMERCIEMENTS

---

Il m'est d'avis que tout travail de thèse qui réussit la longue traversée menant à sa présentation est assisté par d'autres esprits et d'autres mains que ceux de son seul auteur. C'est donc avec enthousiasme et sincérité que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui, à leur manière, m'ont aidé à mener à bien cette thèse (en espérant avoir l'indulgence de ceux que j'oublie de mentionner !)

Je remercie Monsieur Christian Amblard directeur du Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de son unité.

Je remercie également Monsieur le Professeur Christian Vivarès, responsable de l'équipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, de m'avoir fait confiance en me proposant un sujet de DEA, et par la suite divers axes de thèse rendant cette expérience de recherche diversifiée et intéressante.

Je remercie Messieurs Jean-François Dubremetz et Jean-Claude Michalski pour l'honneur qu'ils me font d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Monsieur Jacques Bohatier pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont également à mon directeur de thèse, le Professeur Gérard Prensier qui m'a transmis une grande partie de son savoir-faire et de son expérience en microscopie électronique. Mon manque de confiance récurrent s'est heureusement souvent heurté à son esprit positif. Son enthousiasme pour nos derniers travaux sur les reconstructions tridimensionnelles a été très motivant. Merci pour avoir laissé s'exprimer ma créativité et m'avoir permis d'acquérir une indépendance et un état d'esprit qui me seront utiles dans l'avenir.



J'ai une dette incomparable envers Guy Méténier, notre encyclopédie sur pied. Un immense merci à Guy sans qui la rédaction de ce texte et des publications aurait été beaucoup plus difficile. Merci pour sa façon de transmettre son savoir, ses précieuses idées et ses corrections constructives et pour le temps passé à échanger ensemble. Je regrette seulement que les futurs étudiants n'aient pas le privilège de croiser son chemin.

Thank you to my "English Man", Mister Hubert, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité même à des milliers de kilomètres d'ici et ses encouragements constants.

Je tiens également à remercier Fred, Catherine et Hicham, de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, ils ont toujours été là pour discuter et me guider.

Les voyages forment la jeunesse et au cours de cette thèse, j'ai eu la chance de pouvoir expérimenter cette maxime. Je remercie Monsieur Jean-Claude Michalski pour m'avoir accueillie au sein de son unité et m'avoir permis une initiation au domaine de la glycobiologie structurale par maître Yann Guérardel, merci Yann. Trois autres merci: à Manu, pour son soutien sans faille sous la douce pluie du Nord; à Estelle, pour nos fous rires au C9; à Christelle, pour "Lille 2004".

Mes remerciements vont également à tous mes collègues d'enseignements à l'IUT, au CUST et à l'Université grâce à qui j'ai beaucoup appris.

Il y a bien sûr également : Damien, mon informatico-cuisto-bibliothécaire préféré; Ivan, ma commère favorite; et Bubu, le photographe fou; Annie et Marie A, les inséparables; Delph, la jolie maman, Loulou, le poète; Virginie, la discrète; Marie D, la tête en l'air; Mr Vincenot, le photographe; Isa, Manu, Patrick, Valérie, N' Dongo, Jacqueline, Brigitte, Johanna, J-C, Malik, N' Gore, Nadia, Aline, Elena, Laurence, Seb, mes collègues de DEA, les étudiants de passage et j'en oublie...Une pensée sympathique à tous les membres du laboratoire qui savent rendre agréable ce cadre de travail.

Mais non je ne vous ai pas oublié ! Celles sans qui tout aurait été un peu plus difficile, qui sont devenues bien plus que des collègues de thèse, qui m'ont supportée et soutenue tous les jours, je nomme : la blonde, maladroite et courageuse, Mumu, ainsi que mon admiratrice la plus fidèle, la bombe à caractère, Cécile ! MERCI à vous !



J'ai une pensée particulière pour mes amis, ceux qui ont essayé de comprendre le pourquoi de toutes ces heures passées sur le plateau des Cézeaux ! Certains ont même le mérite de me côtoyer depuis de longues années : Marie-Aude, Yann, Buz, Jérémie, Lise, Cédric, Natach, Tim, Kevin, Julien, Nicky, Marie, Céline, Marie-Laure, Nat, Gwen, ...

Je crois qu'il ne sera pas inutile de remercier celui qui, après les heures passées au laboratoire m'a supportée avec la bonne humeur constante qui le caractérise, celui à qui cette thèse aura certainement gâché quelques mois de plénitude..., celui qui même à l'autre bout de la France ne compte pas les heures pour venir me reconforter, celui avec qui j'espère vivre d'autres moments de bonheur, merci mon Ludo !

Il me faut tout de même remercier ceux sans qui tout cela n'aurait pas été possible : mes parents ! Avec ma sœur et ma grand-mère ils m'ont apporté l'énergie, l'affection et la confiance nécessaires pour mener à bien ma tâche. Merci Maman !

Un clin d'œil à toute ma famille et ma belle famille !

Ce texte représente pour moi à la fois un aboutissement et un début : un aboutissement parce qu'il constitue le fruit de mon travail de ces 5 dernières années, un début parce qu'il marque le début de la prochaine étape de ma vie.

Merci à tous d'avoir rendu cette expérience intense, passionnante et marquante.

Bonne lecture !



# TABLE DES MATIERES

---

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>7</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>10</b>
<b>1. LES MICROSPORIDIES</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Les microsporidioses</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Parenté microsporidies-champignons</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Organisation de la spore</b>	<b>15</b>
1.3.1. Enveloppe	15
1.3.2. Appareil invasif	16
1.3.3. Sporoplasme	17
<b>1.4. Germination sporale et internalisation du parasite</b>	<b>18</b>
<b>1.5. Interface hôte-parasite et développement intracellulaire</b>	<b>19</b>
1.5.1. Interface hôte-parasite	19
1.5.2. Mérogonie	19
1.5.3. Sporogonie	20
<b>1.6. Deux microsporidies-modèles distinctes</b>	<b>21</b>
1.6.1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	21
1.6.2. <i>Antonospora (Nosema) locustae</i>	22
<b>2. IMAGERIE CELLULAIRE 3D ET HYBRIDATION <i>IN SITU</i>, DES OUTILS APPLICABLES AU SUIVI DU DEVELOPPEMENT PARASITAIRE</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Imagerie cellulaire 3 D</b>	<b>24</b>
2.1.1. Coupes sériées et empilement d'images 2D	24
2.1.2. Tomographie : de la molécule à l'organisme	25
2.1.3. Autres procédés	27
<b>2.2. Hybridation <i>in situ</i></b>	<b>27</b>
2.2.1. Les sondes	28
2.2.2. Méthode avant inclusion en résine époxy	29
2.2.3. Méthode après inclusion en résine hydrophile	29
2.2.4. Méthode sur cryocoupes	29



<b>3. LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Généralités</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Les différents modes de glycosylation</b>	<b>33</b>
3.2.1. N-glycosylation	33
3.2.2. O-glycosylation	35
3.2.3. Le L-fucose	37
3.2.4. Autres modes de glycosylation	40
3.2.5. Stratégies pour l'analyse structurale des glycanes	43
<b>3.3. La glycosylation chez des protistes parasites</b>	<b>43</b>
3.3.1. <i>Trypanosoma</i>	43
3.3.2. <i>Leishmania</i>	45
3.3.3. <i>Toxoplasma</i>	46
3.3.4. <i>Plasmodium</i>	47
3.3.5. <i>Giardia</i>	49
<b>3.4. La glycosylation chez des champignons</b>	<b>49</b>
3.4.1. Les différentes voies de glycosylation	50
3.4.2. Cas de la O-mannosylation	50
<b>3.5. Données sur la glycobiologie des Microsporidies</b>	<b>53</b>
3.5.1. Particularités cytologiques du système endomembranaire	53
3.5.2. Glucides détectés	53
3.5.3. N-glycosylation ?	55
3.5.4. O-glycosylation	55
3.5.5. Synthèse d'ancres GPI	56
3.5.6. Interactions hôte-parasite, un rôle possible des glycanes ?	56
<b>RESULTATS</b>	<b>58</b>
<hr/>	
<b>1. LES STADES DE DEVELOPPEMENT D' <i>E. CUNICULI</i>: UNE ANALYSE ULTRASTRUCTURALE 3D</b>	<b>59</b>
Matériel et Méthodes	60
Résultats	61
Discussion	65
<b>2. EXPRESSION DE DEUX PROTEINES PARIETALES AU COURS DU DEVELOPPEMENT INTRACELLULAIRE D' <i>E. CUNICULI</i></b>	<b>71</b>
<u>Article:</u> " Expression of two cell wall proteins during the intracellular development of <i>Encephalitozoon cuniculi</i> : an immunocytochemical and <i>in situ</i> hybridization study with ultrathin frozen sections"	
<b>3. LA GLYCOSYLATION CHEZ LES MICROSPORIDIES</b>	<b>85</b>
<b>3.1. Les O-glycanes majeurs des spores de deux espèces microsporidiennes sont représentés par des oligosaccharides à mannose non ramifiés et présentant des liaisons <math>\alpha</math>-1,2.</b>	<b>85</b>



<b><u>Article</u></b> : " Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing $\alpha$ -1,2 linkages"	
<b>3.2. Données complémentaires à l'étude de la O-mannosylation</b>	<b>106</b>
Matériels et méthodes	106
Résultats/ Discussion	107
<b>3.3. Présence de protéines fucosylées dans la paroi microsporidienne</b>	<b>110</b>
Matériels et méthodes	110
Résultats/Discussion	112
<b>4. PROTOCOLE DE SEPARATION DES STADES PARASITAIRES D' <i>E. CUNICULI</i> SUR GRADIENT DE PERCOLL</b>	<b>118</b>
<b><u>Article</u></b> : " An improved procedure for Percoll gradient separation of sporogonial stages in <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (Microsporidia)"	
<b><u>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u></b>	<b>128</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>137</b>



*"L'honneur de la science n'est pas d'établir des vérités définitives, mais de s'exposer constamment au démenti : elle se distingue par là des idéologies et des religions, et c'est ce qui fait d'elle un savoir exemplaire."  
Jean-François Mattei.*

# Introduction



# INTRODUCTION

---

Il est probable qu'il existe plus d'espèces parasites à la surface de la Terre qu'il n'existe d'espèces libres. La relation de dépendance du parasite envers l'hôte est poussée à l'extrême dans le cas du parasitisme intracellulaire obligatoire. Dans le monde très diversifié des Eucaryotes unicellulaires, le phylum des Apicomplexa est un exemple de groupe représenté par de nombreuses espèces ne pouvant vivre qu'au sein d'autres cellules, certains d'entre elles étant des pathogènes humains particulièrement connus et faisant l'objet de recherches intensives (*Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*...). Le phylum des Microspora est un autre exemple important, à cette différence que la physiologie et la biochimie de ces microsporidies est encore faiblement documentée, même si un regain d'intérêt pour leur étude a été lié à la reconnaissance d'un statut de parasite opportuniste en émergence pour certaines espèces (Desportes-Livage, 1996) puis à l'obtention de la séquence complète du génome de l'une d'elles *Encephalitozoon cuniculi* (Katinka *et al.*, 2001).

Antérieurement considérées comme des représentants de cellules eucaryotes très primitives (archézoaires), les microsporidies sont désormais classées près des champignons, à la lumière des résultats d'analyses phylogénétiques pour diverses séquences protéiques. Comme leur nom l'indique, ces organismes sont capables de former des spores et leur adaptation au parasitisme intracellulaire est marquée par une structure originale, le tube polaire, évoquant un nématocyste. Le tube polaire enroulé à l'intérieur de la spore microsporidienne peut être propulsé hors de cette cellule, afin de devenir le vecteur de l'entité infectieuse qui sera inoculé à la cellule-hôte. Suite à cette infestation, le développement du parasite peut se dérouler au sein d'une vacuole parasitophore, comme chez *Encephalitozoon cuniculi*, ou bien au contact direct du cytoplasme de la cellule-hôte, comme chez *Antonospora locustae*. Les deux phases majeures de ce cycle sont la phase de prolifération ou mérogonie et la phase de différenciation ou sporogonie. Durant cette seconde phase, la conversion sporoblaste-spore est marquée par la construction d'une paroi chitino-protéique très rigide et du long tube polaire appartenant à un appareil spécifique, dit appareil invasif ou appareil d'extrusion.

Au centre de nos préoccupations, la différenciation sporale microsporidienne a été suivie au niveau ultrastructural chez *E. cuniculi*, grâce à une technique de reconstruction tridimensionnelle à partir de coupes sériées. En raison de l'asynchronisme de la germination



sporale et du cycle de ce parasite en culture, la majorité des autres travaux ont porté sur le stade sporal, le plus accessible mais sans doute le moins actif au plan métabolique. Toutefois, une méthode d'hybridation *in situ* sur cryocoupes a été développée pour la détection, au cours du cycle parasitaire, des transcrits de gènes d'intérêt codant deux protéines structurales majeures de la paroi. Particulièrement difficile à atteindre, l'un de nos objectifs consistait en la séparation des différents stades intracellulaires en vue d'études biochimiques comparatives. Un protocole basé sur la centrifugation en gradient de densité Percoll-saccharose a pu être mis au point pour les stades sporogoniques.

L'annotation de la séquence du génome d'*E. cuniculi* a révélé un protéome eucaryote « minimal » et un métabolisme potentiel très simplifié (Katinka *et al.*, 2001). La méconnaissance actuelle de modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations, et leur implication éventuelle dans les mécanismes de reconnaissance et d'invasion des cellules-hôtes nous a incité à débiter une identification des glycanes associés aux protéines sporales chez *E. cuniculi* et *A. locustae*. Une voie majeure de O-mannosylation a été caractérisée, suite aux analyses physico-chimiques des fractions glycaniques. La O-fucosylation semble une autre voie possible chez les microsporidies, bien que non prédite au niveau génique.



*"Il n'y a rien de vivant dans  
une cellule sauf l'ensemble."  
Lucien Guénot.*

*Etude*

*Bibliographique*



# 1. LES MICROSPORIDIÉS

---

Dans la seconde moitié du XIX<sup>e</sup> siècle, une épidémie ravagea l'industrie du ver à soie en France. La maladie, appelée pébrine, était causée par *Nosema bombycis*, un parasite unicellulaire identifié et assimilé à une levure par Nägeli en 1857. Ce micro-organisme correspond à la toute première espèce connue d'un taxon eucaryote composé exclusivement de parasites intracellulaires obligatoires et nommé « Microsporidies » par Balbiani en 1882. Toutes les microsporidies sont en effet capables de survivre dans l'environnement sous forme de petites spores à organisation caractéristique. La spore microsporidienne est revêtue d'une paroi riche en chitine et contient un long filament enroulé en spirale, dit « filament polaire » ou « tube polaire », dont l'extrusion brutale permet l'inoculation du matériel sporoplasmique infectieux à une nouvelle cellule-hôte. Plus de 1200 espèces dans plus d'une centaine de genres différents ont été décrites pour le phylum Microspora (Sprague, 1977), leurs spectres d'hôtes couvrant la quasi-totalité du règne animal (Canning, 1993). Parmi ces espèces deux modèles se distinguent : *Encephalitozoon cuniculi*, parasite de mammifères et *Antonospora locustae*, infectant les insectes.

## 1.1. Les microsporidioses

Les voies de dissémination des microsporidies sont encore mal définies. Les spores sont inévitablement une source de contamination de l'environnement, principalement de l'eau (Dowd *et al.*, 1998). Pour les poissons, le risque d'infection microsporidienne est particulièrement accru par les facteurs de stress liés à un élevage intensif (transport, confinement, hypoxie...). De nombreuses spores sont excrétées dans les fèces ou l'urine par les hôtes infectés, rendant concevable une transmission directe fécale-orale ou par l'intermédiaire de l'eau. Certaines microsporidioses humaines pourraient être des zoonoses. Un passage de l'animal à l'Homme est vraisemblable pour *Encephalitozoon cuniculi* dont les isolats issus de patients sont de même sous-type que ceux provenant de chiens et de lapins (Mathis *et al.*, 1997). La transmission verticale est relativement fréquente chez les microsporidies parasites d'insectes et de crustacés (Avery et Undeen, 1990). Quelques cas de transmission transplacentaire ont été décrits pour des parasites de mammifères (Mohn *et al.*, 1982). L'étude des microsporidies a suscité un intérêt croissant depuis la pandémie du SIDA

Espèces microsporidiennes	Symptômes																	
	diarrhées	cholangites	cholécystites	hépatites	péritonites	encéphalites	kératoconjonctivites	rhinites	sinusites	bronchites	pneumonies	infections urinaires	urétrites	néphrites	prostatites	infections musculaires	infections disséminées	
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	x	x	x					x	x	x	x							
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	x	x	x				x	x	x		x	x		x			x	
<i>Encephalitozoon hellem</i> <sup>(1)</sup>							x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	x			x	x	x	x	x	x		x						x	
<i>Trachipleistophora hominis</i> <sup>(1)</sup>							x	x	x								x	
<i>Trachipleistophora anthropophthera</i> <sup>(1)</sup>						x											x	x
<i>Pleistophora</i> spp.																	x	
<i>Vitaforma corneae</i> <sup>(2)</sup>							x					x						
<i>Nosema ocularum</i> <sup>(2)</sup>							x											
<i>Brachiola connor</i> <sup>(2)</sup>																		x
<i>Brachiola vesicularum</i> <sup>(1)</sup>																		x
<i>Brachiola algerae</i>							x											
<i>Microsporidium africanum</i> <sup>(2)</sup>							x											
<i>Microsporidium ceylonensis</i> <sup>(2)</sup>							x											

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

(Desportes-Livage, 1996). Quatorze espèces au sein de huit genres microsporidiens ont été reconnues responsables de pathologies humaines variées (**Tableau 1**), celles-ci concernant principalement les patients immunodéprimés. Les infections sont restreintes à certains organes (intestin, œil, muscle, foie, rein...) ou disséminées. Les désordres gastro-intestinaux sont les plus fréquents. Près de 50% des cas de diarrhée chronique chez les individus infectés par le VIH sont imputables aux deux microsporidies *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis* (Franzen et Muller, 2001). Des atteintes oculaires plus ou moins profondes ont été rapportées tant chez des sujets immunocompétents que chez des sujets immunodéprimés (Joseph *et al.*, 2005). La séroprévalence des microsporidies dans des populations européennes immunocompétentes a été évaluée entre 2 et 22% (del Aguila *et al.*, 2001; Kucerova-Pospisilova *et al.*, 2001; van Gool *et al.*, 1997).

Le diagnostic d'une microsporidiose humaine fait souvent appel à la mise en évidence des spores directement dans les selles, les urines ou les biopsies de tissus. Leur détection en microscopie photonique est facilitée par l'utilisation de fluorochromes spécifiques de la chitine, tel que l'Uvitex 2B et le Calcofluor (van Gool *et al.*, 1993). Une recherche en immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques ainsi que le sérodiagnostic sont également réalisés (Enriquez *et al.*, 1997; van Gool *et al.*, 1997). L'amplification PCR de séquences d'ARNr 16S (Weiss *et al.*, 1994) permet un diagnostic au niveau de l'espèce (Fedorko *et al.*, 1995).

Deux molécules utilisées dans le contrôle d'infections chez les insectes se sont révélées plus ou moins efficaces chez l'Homme : l'albendazole et la fumagilline. Bloquant la polymérisation des microtubules, l'albendazole a permis de traiter des infections dues à *Encephalitozoon* spp. chez plusieurs patients sidéens (Franzen *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1995). Inhibant la méthionine-aminopeptidase de type II, la fumagilline est efficace pour soigner certaines atteintes oculaires (*E. hellem*) et intestinales (*Enterocytozoon bieneusi*) (Molina *et al.*, 1997), mais sa toxicité est élevée. Le TNP-470, un analogue de fumagilline moins toxique, est actif contre *Encephalitozoon* spp. et *Vittaforma corneae* (Coyle *et al.*, 1998). Plus récemment, deux agents anti-mitotiques ont montré une efficacité dirigée spécifiquement contre *Encephalitozoon* (Ouarzane-Amara *et al.*, 2001). L'introduction de la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) en 1996, qui désigne un traitement contre le VIH composé de trois médicaments ou davantage, a été associée à une diminution significative de la mortalité due aux microsporidies (Miao *et al.*, 2000).



## 1.2. Parenté microsporidies-champignons

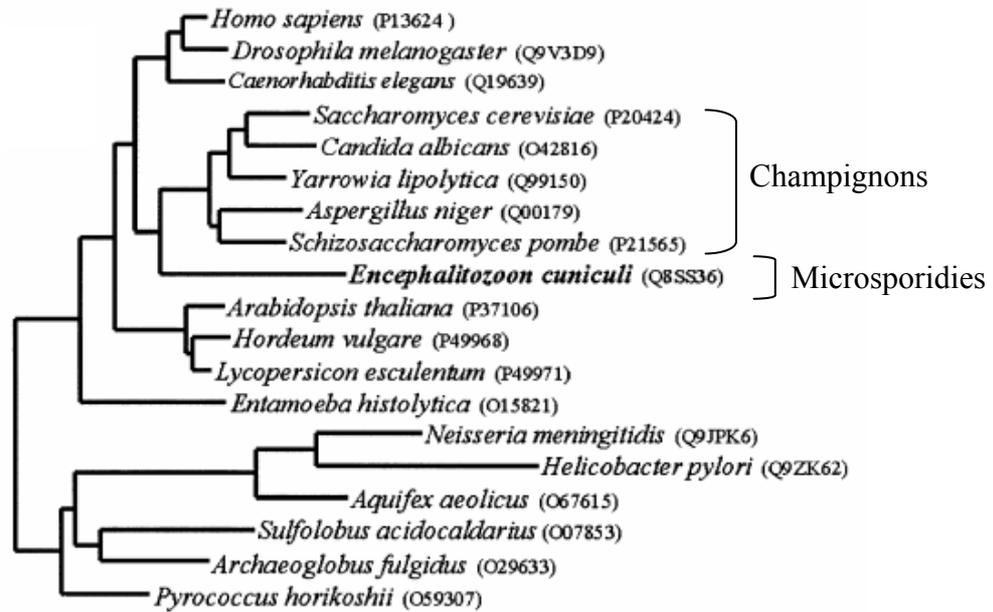
La complexité cellulaire des microsporidies est significativement réduite par rapport à la plupart des autres Eucaryotes : absence de mitochondries, de peroxyosomes et de centrioles, appareil de Golgi non structuré en dictyosomes, ribosomes 70S avec ARNr 16S et 23S (Curgy *et al.*, 1980). L'appareil nucléaire est représenté soit par un seul noyau, soit par un diplocaryon correspondant à deux noyaux intimement accolés. La division est soit binaire, soit multiple (formation de plasmodes). La mitose est de type fermé et chaque pôle du fuseau mitotique est marqué par une petite plaque opaque aux électrons, dite plaque polaire ou SPB (« spindle pole body »). Le cycle biologique est plus ou moins complexe, avec 1 ou 2 hôtes, mais le développement intracellulaire implique toujours une phase de multiplication (mérogonie) suivi d'une phase de différenciation (sporogonie).

Les particularités cytologiques des microsporidies sont telles que leur position taxinomique et leur origine évolutive ont été longtemps débattues (Vossbrinck *et al.*, 2004). Au début du siècle dernier, la présence commune de spores munies d'un filament polaire avait fait regrouper les Microsporidia avec les Myxosporidia et les Actinomyxida au sein de l'ordre des Cnidospora parmi les protozoaires. Il fut reconnu ultérieurement que ces deux derniers groupes divergeaient fortement des microsporidies : état multicellulaire, filament polaire de type nématocyste ne permettant pas l'introduction du sporoplasme dans une cellule-hôte, parenté avec les cnidaires révélée par les phylogénies d'ARNr. Deux phyla furent alors distingués : Myxozoa pour ces cnidaires dégénérés et Microspora pour les seules microsporidies, sans relation évidente avec un autre groupe de Protistes. Dans les années 1980, la caractérisation d'ARNr microsporidiens et les premières phylogénies moléculaires basées sur l'ARN de la petite sous-unité ribosomique ont amené à supposer que les microsporidies étaient d'origine très ancienne. Les principaux arguments étaient les suivants :

- les constantes de sédimentation des ribosomes, de leurs sous-unités et de leurs ARN sont similaires à celles observées chez les eubactéries (Curgy *et al.*, 1980; Ishihara et Hayashin, 1968)

- l'ARNr 5,8S n'existe pas sous forme libre, la séquence correspondante restant liée à l'extrémité 5' de l'ARNr 23S, tout comme chez les Procaryotes (Vossbrinck et Woese, 1986)

- suite au séquençage de l'ARNr 16S chez *Vairimorpha necatrix*, l'analyse phylogénétique comparative indiquait une divergence de la lignée microsporidienne à la base de l'arbre des Eucaryotes (Vossbrinck *et al.*, 1987)

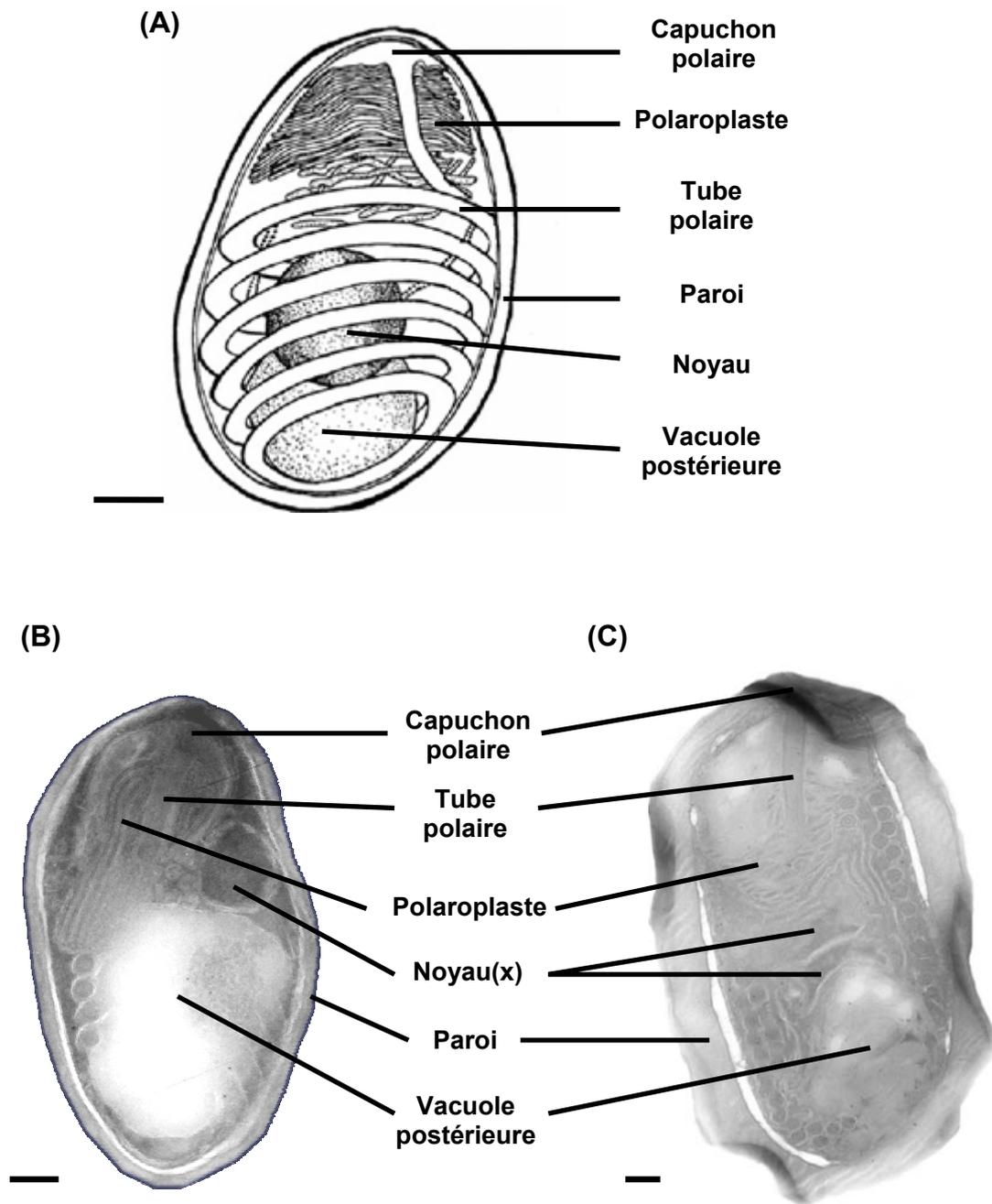


**Figure 1.** Arbre phylogénétique des Eucaryotes basé sur la protéine SRP54, protéine universelle, appartenant au complexe ribonucléoprotéique SRP (signal recognition particle). *Encephalitozoon cuniculi* émerge près des champignons. Numéros d'accension SWISSPROT entre parenthèses (d'après Thomarat et al., 2004).

- comme les microsporidies, les diplomonadines sont dépourvues de mitochondries et la phylogénie d'ARNr incluant *Giardia lamblia* montrait aussi une divergence très précoce (Sogin *et al.*, 1989).

L'hypothèse de la persistance de certaines lignées eucaryotes, qui auraient divergé avant l'endosymbiose ayant conduit à la formation des mitochondries, fut alors proposée par Cavalier-Smith (1987). L'auteur créa le phylum Archezoa pour regrouper les protozoaires amitochondriaux, supposés représenter les Eucaryotes les plus primitifs. Une dizaine d'années plus tard, cette hypothèse est fortement ébranlée par la mise en évidence de gènes codant une HSP70 de type mitochondrial chez plusieurs microsporidies (Germot *et al.*, 1997; Hirt *et al.*, 1997; Peyretailade *et al.*, 1998). Une perte secondaire des mitochondries pendant l'évolution de ces parasites devenait donc plus vraisemblable que l'absence d'endosymbiose chez leur ancêtre commun. L'hypothèse du maintien d'un organe dérivé de la mitochondrie ("mitosome") a été proposée sur la base de la présence de gènes codant des homologues de protéines mitochondriales chez *E. cuniculi*, pour rendre compte notamment de la conservation et de la compartimentation d'enzymes de biosynthèse des amas Fe-S (Katinka *et al.*, 2001). Un homologue d'HSP70 mitochondrial a pu être localisé dans de petites structures vésiculaires délimitées par deux membranes chez *Trachipleistophora hominis* (Williams *et al.*, 2002).

L'hypothèse Archezoa est finalement abandonnée suite à la congruence d'analyses phylogénétiques effectués avec les séquences de diverses protéines conservées : les  $\alpha$ - et  $\beta$ -tubulines, la grande sous-unité d'ARN polymérase II, la protéine TBP se liant à la boîte TATA ou seryl-tRNA synthétase... (Vossbrinck *et al.*, 2004). La divergence des microsporidies apparaît beaucoup plus tardive puisque le branchement de leurs séquences est régulièrement observé à proximité de celles des champignons. Un exemple d'arbre, obtenu pour une protéine du complexe SRP, est montré **Figure 1**. Cette connexion avec les champignons est retrouvée également pour l'ARNr 23S et il est montré que la position basale observée initialement n'est qu'un artefact (phénomène d'attraction des longues branches) lié à l'évolution rapide des séquences (van de Peer *et al.*, 2000; Thomarat *et al.*, 2004; Katinka *et al.*, 2001; Keeling et Fast, 2002). Soulignons que le transfert du phylum Microspora dans le règne Fungi est en accord avec certaines caractéristiques cellulaires et moléculaires communes aux microsporidies et aux champignons : formation de spores, mitose avec SPB, noyaux appariés ressemblant aux dicaryons, paroi riche en chitine, métabolisme du tréhalose, présence d'une même insertion dans le gène du facteur d'élongation EF-1 $\alpha$ , gènes séparés de



**Figure 2. Structure de la spore.** (A) Schéma d'une spore d'*E. cuniculi* (d'après Franzen et Muller, 1999). Photographies en microscopie électronique à transmission (MET) sur cryocoupes d'une spore d'*E. cuniculi* (B) et d'*Antonospora locustae* (C). Echelle = 200 nm.

thymidylate synthase et dihydrofolate réductase... Ainsi, la toute première assignation de *Nosema bombycis* à un champignon, réalisée par Nägeli, apparaît correcte 150 ans plus tard !

### 1.3. Organisation de la spore

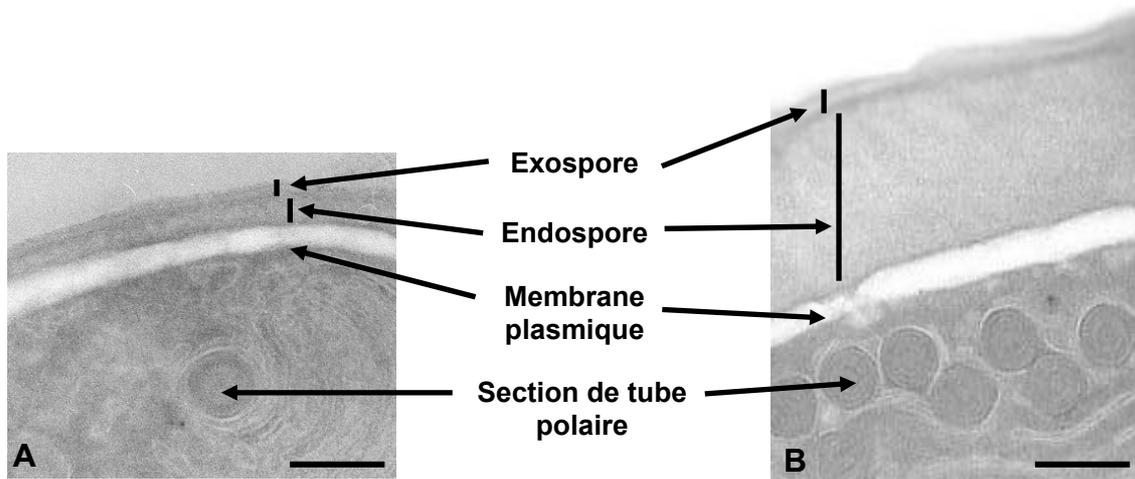
La taille des spores microsporidiennes est très variable selon les genres considérés (de 1 à 20  $\mu\text{m}$ ), cette taille étant particulièrement réduite chez *Enterocytozoon bieneusi* (1,1-1,6  $\mu\text{m}$ ). Leur forme est souvent ovale mais certaines spores sont pratiquement sphériques alors que d'autres sont filiformes (**Figure 2**).

#### 1.3.1. Enveloppe

La membrane plasmique de la spore mature est surmontée d'une épaisse paroi rigide procurant la protection contre les agressions extérieures lorsque la spore est libérée dans le milieu environnant. Ainsi, les spores de *Encephalitozoon cuniculi* peuvent survivre à un pH de 4 ou 9 durant 24 h, à 56°C pendant 1 h et à 4°C pendant 2 ans, sans perdre leur pouvoir infectieux (Koudela *et al.*, 1999). La paroi permet aussi le maintien d'une pression osmotique interne élevée, nécessaire à l'extrusion du tube polaire (Frixione *et al.*, 1992). Deux couches principales sont distinguées : l'exospore et l'endospore (**Figure 3**).

##### Exospore

Couche externe et opaque aux électrons, l'exospore a une épaisseur de 25 à 30 nm et contient essentiellement du matériel protéique. Son aspect peut être homogène ou stratifié et des projections plus ou moins régulières sont souvent observées. En cryodécoupage, elle se présente sous forme de granules entremêlés de courtes fibres (Vavra *et al.*, 1986). Deux protéines d'exospore ont été identifiées chez *E. intestinalis* : SWP1 (50 kDa) et SWP2 (150 kDa) (Hayman *et al.*, 2001). La prédiction d'un peptide signal au début de chaque séquence laisse supposer un transit *via* le système réticulum endoplasmique (RE)-Golgi. Seule SWP1 est présente chez *E. cuniculi* (Bohne *et al.*, 2000). Cette dernière est exprimée de façon différentielle pendant le cycle de développement. Absente dans les mérontes, SWP1 apparaît en début de sporogonie quand les parasites migrent de la périphérie vers le centre de la vacuole parasitophore puis est abondamment représentée dans les spores matures.



**Figure 3.** Cryocoupes de la paroi d' *E. cuniculi* (A) et *A. locustae* (B) observées en MET. Reposant sur la membrane plasmique de la cellule, l'endospore, plus épaisse pour *A. locustae*, est recouverte d'une couche protectrice supplémentaire, l'exospore. Des sections transversales de tube polaire sont apparentes pour les deux espèces et l'espace clair entre la membrane plasmique et l'endospore est un artéfact du à la coupe. Echelle = 100 nm.

## **Endospore**

L'endospore est la couche interne, claire aux électrons et au contact de la membrane plasmique. Elle est plus épaisse que l'exospore (jusqu'à 100 nm chez *Nosema*). L'épaisseur est réduite au pôle antérieur de la spore, zone où le tube polaire est éjecté. La richesse en chitine de cette couche est utilisée pour la détection des microsporidies en épifluorescence (van Gool *et al.*, 1993). L'endospore serait principalement un réseau de fibrilles de chitine associées à des protéines formant des ponts avec l'exospore et la membrane plasmique, participant ainsi au maintien de la forme de la spore (Bigliardi *et al.*, 1996). La localisation de deux protéines au niveau de l'endospore a été montrée chez *E. cuniculi* : EnP1 et EnP2/SWP3 (Peuvel-Fanget *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). La protéine EnP1 (40 kDa) est visualisée à tous les stades de développement du parasite. Son messenger, majoritaire dans le pool total d'ARNm, est détecté très tôt après l'infestation des cellules. Une chitine désacétylase putative a été localisée à l'interface endospore-membrane plasmique (Brosson *et al.*, 2005).

### **1.3.2. Appareil invasif**

L'appareil invasif ou appareil d'extrusion est un ensemble spécialisé de quatre éléments cytoplasmiques : le capuchon polaire, le tube polaire, le polaroplaste et la vacuole postérieure.

#### **Capuchon polaire**

Parfois assez improprement nommé « disque d'ancrage », le capuchon polaire est situé au pôle antérieur de la spore, à proximité de la zone amincie de l'endospore. Cette structure PAS-positive est riche en glycoconjugués (Vavra, 1972). Deux parties sont distinguées :

- le sac polaire, qui est une structure vésiculaire aplatie formant un dôme qui coiffe le cytoplasme antérieur de la spore.
- le disque d'ancrage proprement dit, de forme biconvexe et présentant une série de couches plus ou moins denses. Ce disque assure une étroite connexion entre la partie centrale du sac polaire et l'extrémité antérieure du tube polaire.

#### **Tube polaire**

Le tube polaire comprend une partie antérieure rectiligne appelée manubrium, ancrée au capuchon polaire, et une partie postérieure enroulée sur un ou plusieurs rangs et nettement plus longue que le manubrium. Le nombre de tours peut varier de 4 à 30, selon les espèces (Canning, 1993). La longueur du tube extrudé est 3 à 4 fois supérieure à celle du tube



intrasporal et son diamètre peut varier de 0,1 à 0,15µm. L'examen ultrastructural révèle 6 couches concentriques entourées d'une membrane, nombre se réduisant à 3 après extrusion.

La biogenèse du tube polaire implique une importante sécrétion de protéines cytologiquement marquée par l'hypertrophie d'un réseau d'origine golgienne (Keohane et Weiss, 1998). Trois protéines de tube polaire différentes (PTP1, PTP2 et PTP3) ont été identifiées chez *E. cuniculi* (Delbac *et al.*, 1998b; Delbac *et al.*, 2001; Peuvél *et al.*, 2002). Des homologues de PTP1 et PTP2 ont été retrouvés chez *E. hellem* (Keohane *et al.*, 1998) et *E. intestinalis* (Delbac *et al.*, 2001) et plus récemment chez *A. locustae* et *Paranosema grylli* (Polonais *et al.*, 2005).

### **Polaroplaste**

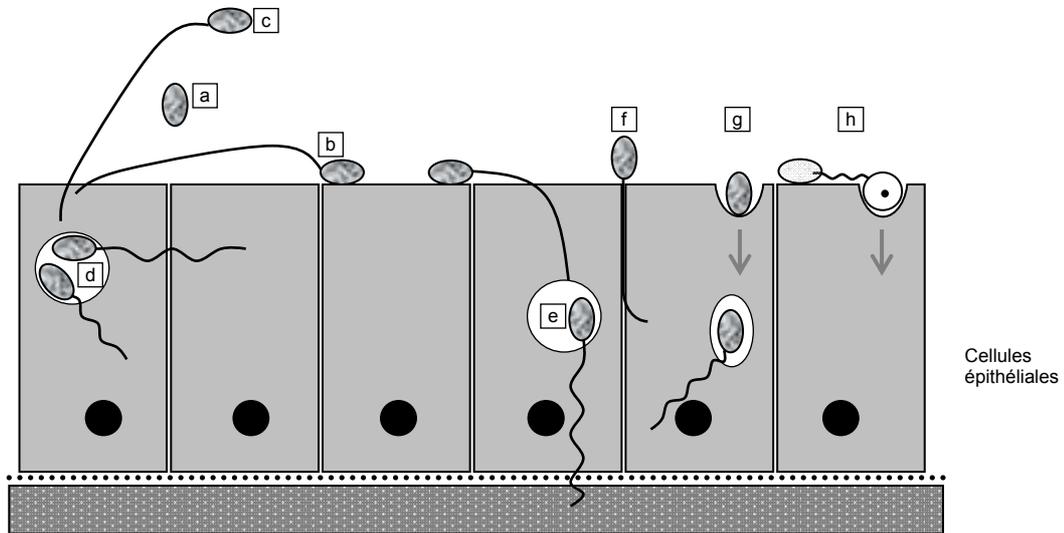
Le polaroplaste s'étend sur la plus grande partie de la région antérieure de la spore, entre le capuchon polaire et le(s) noyau(x), et encercle le manubrium. Sa partie antérieure, dite lamellaire, est caractérisée par un empilement de structures membranaires très aplaties (succession de vésicules aplaties ou série de replis d'un seul système ?). Il serait à l'origine de la membrane plasmique du sporoplasme libéré à l'intérieur de la cellule-hôte (Weidner *et al.*, 1984). La partie postérieure ou vésiculaire est représentée par des éléments tubulo-vésiculaires dont le contenu est opaque aux électrons. L'absence de données sur sa composition moléculaire ne permet pas de trancher actuellement entre l'hypothèse d'une sécrétion spécifique et celle d'un réarrangement de l'appareil de Golgi.

### **Vacuole postérieure**

Cette vacuole est de taille très variable et curieusement absente chez le genre *Nosema*. Son contenu présente fréquemment des amas très opaques aux électrons, de nature chimique inconnue. Cependant, une catalase, enzyme responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène, a été détectée au niveau de la vacuole de *Spraguea lophii*, microsporidie de poisson (Weidner et Findley, 2003). Le gonflement de la vacuole jouerait un rôle essentiel dans la décharge sporoplasmique durant la germination sporale.

## **1.3.3. Sporoplasme**

Le terme « sporoplasme » désigne la totalité de l'entité infectieuse qui est transférée dans la cellule-hôte. En conséquence, il comprend l'appareil nucléaire (un seul noyau ou un diplocaryon) et le cytoplasme sans l'appareil invasif. Les éléments identifiables dans ce



**Figure 4. Modes d'entrée hypothétiques des spores microsporidiennes dans des cellules épithéliales.** (a) Spore libre. (b) L'adhésion de la spore est suivie de l'extrusion du tube polaire et de la pénétration du parasite par la membrane apicale de la cellule. (c) Le tube polaire reconnaît directement la cellule et injecte le matériel infectieux. Des spores situées dans la vacuole parasitophore peuvent infester secondairement la même cellule, des cellules adjacentes (d) ou bien un autre tissu (e). Une pénétration basolatérale impliquerait l'insinuation du tube polaire au niveau des jonctions intercellulaires (f). Enfin, une internalisation par endocytose directe de la spore (g) ou du sporoplasme (h) est aussi envisagée (modifié d'après Vivarès et Méténier, 2001 et Franzen, 2005).

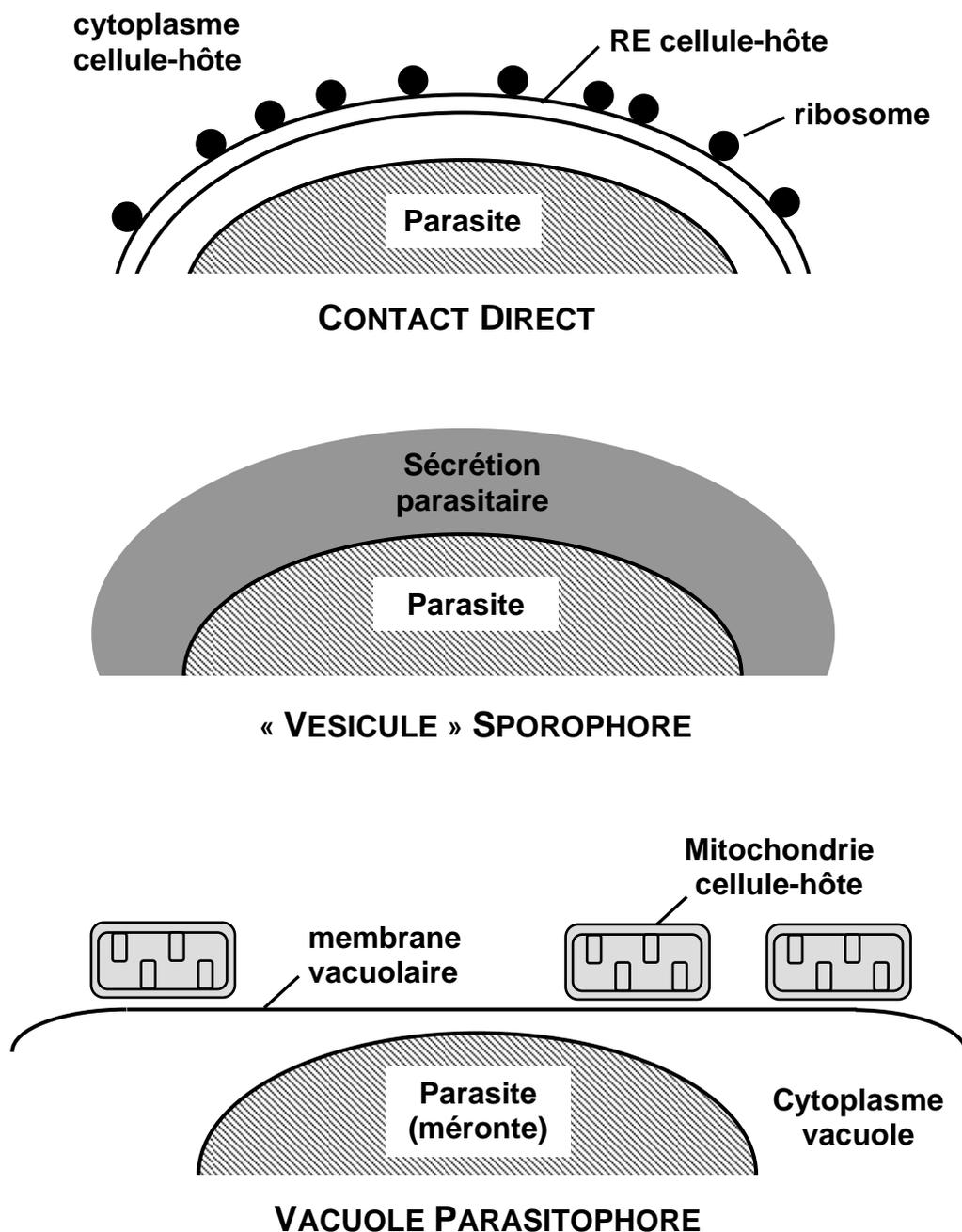
cytoplasme simplifié sont essentiellement le RE et les ribosomes, fortement compactés et formant parfois des rangées très régulières.

#### **1.4. Germination sporale et internalisation du parasite**

Impliquant le transfert du sporoplasme dans une cellule-hôte par l'intermédiaire du tube polaire brusquement extrudé à l'apex de la spore (phénomène de germination), la phase d'infestation microsporienne n'a pas d'équivalent dans le monde vivant. Les modalités précises de la germination sporale et de la pénétration du parasite sont cependant mal comprises.

La germination peut être induite *in vitro* sous des conditions diverses, plus ou moins variables d'une espèce à l'autre : modification du pH, addition de certains ions minéraux ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ...), traitement par une molécule organique neutre (urée) ou polyanionique (mucine). Chez *Spraguea lophii*, parasite de baudroie, l'inhibition de la germination par le vérapamil a fait envisager un influx d'ions  $\text{Ca}^{++}$  pour le signal externe physiologique qui serait à l'origine d'une cascade d'activation interne impliquant des protéine-kinases et une molécule effectrice au niveau d'un système membranaire interne (polaroplaste) ou du tube polaire lui-même (Pleshinger et Weidner, 1985). Certains constituants de la paroi sporale pourraient être impliqués dans un phénomène d'adhérence initiale qui a été observé chez *E. intestinalis* en culture, l'interaction s'effectuant avec des glycosaminoglycane des cellules-hôtes CHO (Hayman *et al.*, 2005). Pour rendre compte de l'extrusion du tube polaire, il a été invoqué soit une évagination similaire au retournement d'un doigt de gant, soit le glissement de deux tubes préalablement emboîtés l'un dans l'autre (Keohane et Weiss, 1999). Chez les microsporidies aquatiques, l'expulsion du sporoplasme dans le tube polaire dépendrait d'une augmentation de pression osmotique intrasporale résultant de l'hydrolyse du tréhalose en glucose (Undeen et Vander Meer, 1999). Un influx d'eau provoquerait alors le gonflement de la vacuole postérieure qui pousserait le sporoplasme dans la lumière du tube polaire. La création d'un gradient de protons à partir de l'environnement alcalin autour de la spore est une autre possibilité (Dall, 1983).

Selon l'hypothèse classique, le tube polaire serait suffisamment rigide pour traverser la membrane plasmique d'une cellule-hôte, à l'image de l'aiguille d'une seringue. Le sporoplasme entouré par une membrane tirant son origine du polaroplaste (Weidner *et al.*, 1984) serait alors directement internalisé, sans intervention d'un phénomène d'endocytose. Rappelons que la majorité des espèces microsporidiennes se multiplie au contact direct du



**Figure 5. Principaux types d'interface hôte-parasite.** Exemples d' *A. locustae* (A), assez répandu chez les microsporidies, avec un développement direct au contact du cytoplasme de la cellule-hôte. En (B) le parasite peut être entouré d'une sécrétion d'origine parasitaire, la vésicule sporophore. (C) Observé plus rarement, certaines microsporidies, comme *E. cuniculi*, se développent au sein d'une vacuole dite parasitophore mais dont l'origine n'est pas totalement établie (Fasshauer et al, 2005).

cytoplasme-hôte. Une internalisation du sporoplasme par endocytose pourrait justifier la membrane de la vacuole parasitophore existant chez quelques espèces comme celles du genre *Encephalitozoon*. (Franzen, 2005). Le domaine baso-latéral de la membrane plasmique des entérocytes serait le site privilégié de pénétration d' *E. intestinalis*, à en juger par des images en immunofluorescence sur la distribution périphérique de l'actine dans la cellule-hôte (Foucault et Drancourt, 2000). Les spores d' *E. cuniculi* peuvent aussi entrer par phagocytose dans des cellules fibroblastiques, épithéliales et embryonnaires. Il a été montré que le nombre de spores internalisées non germées (vivantes ou mortes) est 10 fois plus important que le nombre de sporoplasmes (Couzinet *et al.*, 2000). La **Figure 4** illustre différentes hypothèses pour l'internalisation de l'agent infectieux.

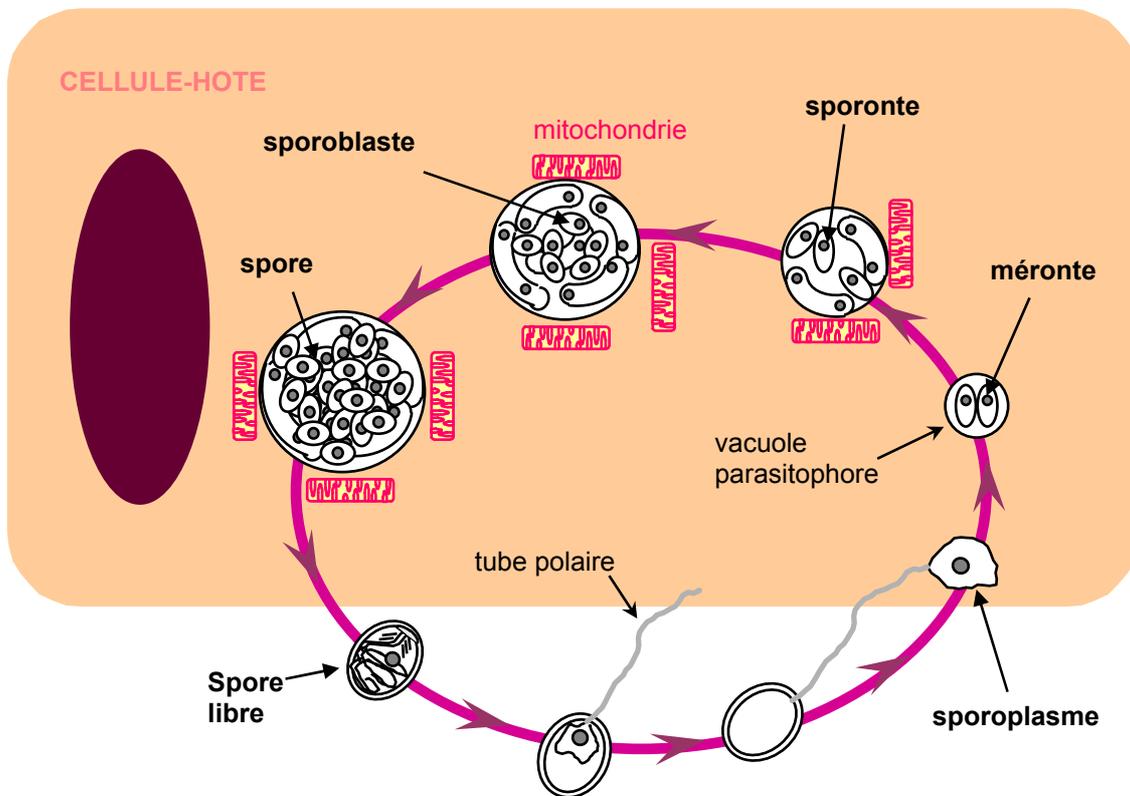
## **1.5. Interface hôte-parasite et développement intracellulaire (Figures 5, 6 et 7)**

### **1.5.1. Interface hôte-parasite**

Une fois entrée dans le cytoplasme d'une cellule-hôte, la microsporidie maintient un contact étroit avec celui-ci. Plusieurs types d'interface sont distingués (**Figure 5**). Fréquemment, le développement du parasite s'effectue au contact direct du cytoplasme de la cellule-hôte, et la frontière hôte-parasite peut dans certains cas être marquée par une couche concentrique du RE de la cellule-hôte, l'aire membranaire la plus proche du parasite étant dépourvue de ribosomes (*Nosema*, *Endoreticulatus*...). Un autre type de frontière est matérialisé par l'accumulation d'une sécrétion d'origine parasitaire pendant la sporogonie, constituant la "vésicule" sporophore (*Amblyospora*, *Trachipleistophora*...). Plus rarement, les parasites sont isolés dès le début de leur cycle par la membrane d'une vacuole dite parasitophore (*Encephalitozoon*...), cette membrane étant vraisemblablement issue de l'hôte.

### **1.5.2. Mérogonie**

Débutant après l'internalisation du sporoplasme, la mérogonie est une phase de multiplication très active de cellules appelées mérontes. En cas de division multiple, il s'agira de la formation d'un plasmode mérogonial. Les mérontes individualisés sont de forme irrégulière. Malgré un RE peu développé, leur cytoplasme est riche en ribosomes. Le complexe golgien n'est pas repérable sous forme de dictyosomes. Dès le stade méronte, des filaments d'actine



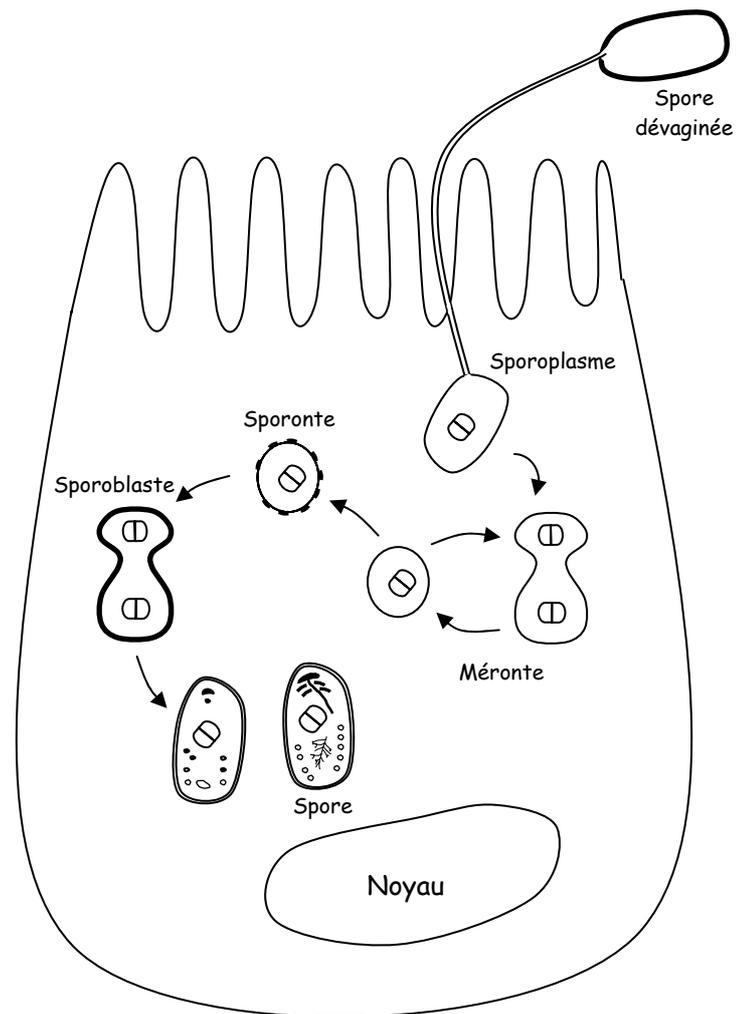
**Figure 6.** Cycle de développement d' *E. cuniculi*. La spore expulse son sporoplasme dans le cytoplasme de la cellule-hôte après extrusion du tube polaire. Un nouveau cycle avec une phase de multiplication (mérogonie) et une phase de différenciation (sporogonie) conduisant à la formation des spores matures est alors réalisé à l'intérieur d'une vacuole parasitophore entourée par les mitochondries de la cellule-hôte. Ces spores sont finalement libérées, ainsi que tous les autres stades, lors de l'éclatement de la cellule-hôte.

ont pu être mis en évidence sous la membrane plasmique chez *E. cuniculi* et *E. hellem* (Bigliardi *et al.*, 1999). L'observation de microtubules avait été jusqu'alors limitée à ceux du fuseau mitotique étiré entre les deux plaques polaires (Desportes, 1976).

### 1.5.3. Sporogonie

La sporogonie commence avec la transformation des mérontes en sporontes (ou bien formation d'un plasmode sporogonial). Cette conversion est caractérisée par un dépôt de matériel opaque aux électrons sous forme de lamelles conduisant à un revêtement dont l'aspect est similaire à celui de la future exospore. Chez le genre *Encephalitozoon*, cette phase est également marquée par le détachement du parasite de la membrane de la vacuole parasitophore puis sa migration vers le centre de la vacuole (Pakes *et al.*, 1975). On observe une augmentation générale et progressive de la densité cytoplasmique liée à un accroissement du nombre de ribosomes et de citernes du RE. L'appareil golgien est vraisemblablement représenté par de petits amas vésiculaires.

Les sporontes sont capable de subir la division pour donner des sporoblastes qui se différencieront progressivement en spores. Pendant cette maturation, le sporoblaste prend souvent un aspect crénelé et diminue de volume, son cytoplasme devenant de plus en plus dense aux électrons (Cali et Takvorian, 1999). Une intense activité sécrétoire conduit à la formation de grandes vésicules à contenu dense, précurseurs du tube polaire. La paroi s'épaissit avec individualisation progressive d'une couche interne translucide à l'origine de l'endospore. L'enroulement du tube polaire et les autres éléments de l'appareil invasif deviennent visibles. Il a été parfois considéré que le tube polaire se formerait uniquement à partir du RE (Desportes-Livage *et al.*, 1996) mais la plupart des auteurs s'accordent pour une participation de l'appareil de Golgi (Takvorian et Cali, 1996). Le tube polaire semble être organisé par des citernes du RE qui fusionnent ensuite avec les vésicules golgiennes. Selon Sprague et Vernick (1969) et Jensen et Wellings (1972), le complexe golgien serait également impliqué dans la biogenèse du polaroplaste, du sac polaire et de la vacuole postérieure. Mais plus récemment, chez *Enterocytozoon*, Desportes-Livage *et al.* (1996) suggèrent que le polaroplaste lamellaire serait originaire de l'enveloppe nucléaire et également du RE, et que le polaroplaste vésiculaire serait issu des vésicules ou des citernes du RE. La vacuole postérieure serait, elle, formée à partir de vésicules golgiennes en fin de sporogonie lorsque le tube polaire est déjà mis en place (Canning et Lom, 1986). La fin de la sporogénèse est indiquée



**Figure 7. Cycle de développement de *Nosema*.** Une spore injecte son sporoplasme diplocaryotique dans le cytoplasme de la cellule-hôte débutant la phase de prolifération. La transition vers la phase sporogonique est indiquée morphologiquement par des sécrétions parasites produisant une membrane plus épaisse. Chaque sporonte produit deux sporoblastes qui se différencient en la production de deux spores. Le cycle se déroule en intégralité au contact direct avec le cytoplasme de la cellule-hôte (d'après Cali et Takvorian, 1999).

par une complète polarisation des organites et une forte opacité cytoplasmique. Les spores matures pourront être libérées dans le milieu extérieur par lyse de la cellule-hôte.

## 1.6. Deux microsporidies-modèles distinctes

Deux espèces microsporidiennes infectant des hôtes très différents et représentatives de genres phylogénétiquement distants (**Figure 8**), ont été utilisées au cours de ce travail : *Encephalitozoon cuniculi*, parasite de mammifères et *Antonospora locustae*, parasite d'insectes. Leurs principales différences sont résumées **Tableau 2**.

### 1.6.1. *Encephalitozoon cuniculi*, Levaditi, 1923

Fréquemment rencontrée chez un grand nombre de mammifères dont les rongeurs, les carnivores, les ruminants et les primates, *E. cuniculi* a été clairement associé à un premier cas de microsporidiose humaine (Matsubayashi *et al.*, 1959). Il s'agit de la première microsporidie mise en culture (Shaddock, 1969) et c'est de toute évidence la mieux documentée au niveau moléculaire. Espèce monocaryotique (mononucléée), elle présente une caryocinèse liée à la cytokinèse. Lors de la sporogonie, les sporontes ne subiront qu'une seule division cellulaire conduisant à la formation de deux sporoblastes. La spore mature mesure 2-2,5 x 1-1,5 µm et le tube polaire présente 5 à 6 tours de spires sur une rangée. Durant l'intégralité du cycle de développement, les mérontes restent étroitement accolés à la membrane de la vacuole parasitophore, le réseau mitochondrial de la cellule-hôte étant observé à proximité de la vacuole. Ce cycle asynchrone montre un développement centripète, les spores matures étant observées au centre de la vacuole.

L'obtention du caryotype moléculaire d' *E. cuniculi* a révélé un génome haploïde de seulement 2,9 Mpb, réparti sur 11 chromosomes linéaires (Biderre *et al.*, 1995). Cette taille du génome représente moins du quart de celui de *Saccharomyces cerevisiae* (12,5 Mpb) et se situe donc dans la gamme de taille de certains génomes bactériens. Ce génome eucaryote très compact a été séquencé (Katinka *et al.*, 2001). Environ 2000 séquences codantes ont été prédites et l'annotation a fait envisager une importante simplification métabolique. Les données sur les voies de biosynthèse des glucides et de la glycosylation des protéines seront commentées dans la troisième partie de cette analyse bibliographique. Les familles multigéniques et autres séquences répétées sont peu nombreuses, les introns sont rares et très

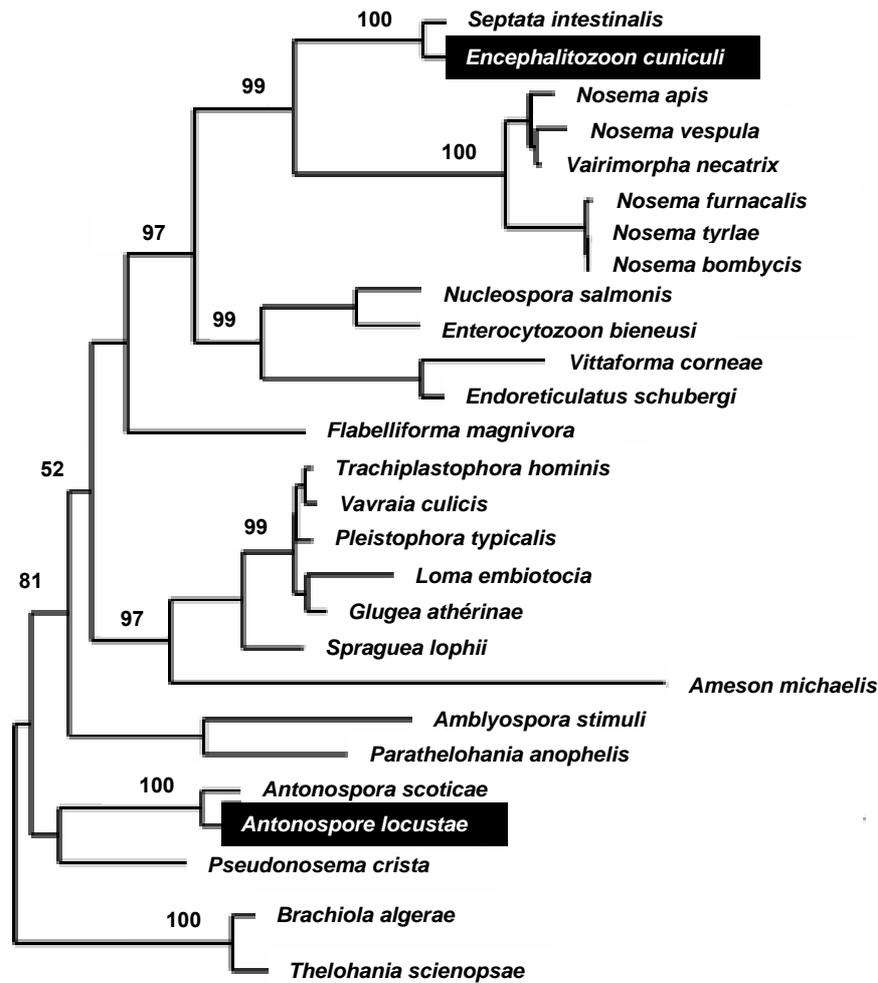


Figure 8. Arbre phylogénétique des microsporidies basé sur l'étude de la petite sous unité d'ARN ribosomique (d'après Slamovits et al, 2004).

Microsporidie	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	<i>Antonospora locustae</i>
Taille spore (µm)	2-2,5 x 1-1,5 µm	2-2,5 x 4-4,5 µm
Tours de spires	5-6	12 (2 rangs)
Noyau(x)	1 (monocaryon)	2 (diplocaryon)
Interface hôte-parasite	vacuole parasitophore	contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte
Taille du génome nucléaire	2,9 Mbp	5,3 Mbp
Hôtes majeurs	mammifères (homme...)	insectes (criquet...)

Tableau 2. Récapitulatif des différences majeures observées entre les deux microsporidies modèles étudiées dans ce travail : *Encephalitozoon cuniculi* et *Antonospora locustae*.

courts. Les espaces intergéniques sont très réduits (129 bp en moyenne). La réduction touche également les séquences codant les protéines (taille moyenne : 360 acides aminés). La comparaison avec les protéines homologues d'autres organismes indique une perte de régions non essentielles et de certains domaines impliqués dans des interactions protéine-protéine (Texier *et al.*, 2005; Vivarès, 2001).

Une analyse du protéome d'une population cellulaire contenant les stades sporogoniaux tardifs (principalement spores immatures et matures) a récemment été publiée (Brosson *et al.*, 2006). Les protéines majeures ont été extraites au moyen de traitements séquentiels et identifiées par spectrométrie de masse selon deux stratégies complémentaires. Un total de 177 protéines différentes a pu être identifié, permettant de dresser une première carte protéique d'*E. cuniculi*. Ces protéines présentes participent aux sécrétions, aux métabolismes énergétiques et glucidiques, au contrôle du cycle cellulaire ainsi qu'à la survie de la spore dans l'environnement. Certaines sont présentes sous de multiples isoformes dues à des modifications post-traductionnelles. Ces modifications, telles que les phosphorylations et les glycosylations, sont très peu connues chez les microsporidies et leur étude à l'échelle de l'organisme représente donc un nouveau domaine d'investigation.

### **1.6.2. *Antonospora (Nosema) locustae*, Canning 1953**

Originellement isolée du criquet migrateur africain, cette espèce était assignée au genre *Nosema*. Son transfert au genre *Antonospora* a été justifié par les résultats d'une récente étude phylogénétique associée à des observations morphologiques (Slamovits *et al.*, 2004). Son spectre d'hôtes a été évalué à 102 espèces d'insectes incluant principalement les lépidoptères, diptères et coléoptères (Sokolova et Lange, 2002). Seule microsporidie utilisée comme insecticide, elle sert au contrôle biologique d'insectes agricoles comme les criquets ou les sauterelles aux USA.

Cette espèce diplocaryotique (binucléée) présente comme *E. cuniculi*, la fission binaire et une unique division chez le stade sporonte. Cependant des différences existent au niveau de la spore qui mesure 2-2,5 sur 4-4,5  $\mu\text{m}$  et du tube polaire qui est organisé en deux rangs avec 12 tours de spires. L'exospore présente une structure formée de 4 couches minces, caractéristique du genre *Antonospora*. La présence ou l'absence d'une catalase, constitue un bon exemple de divergence métabolique entre genre. En effet, son activité a été démontrée chez *Spraguea lophii* (Weidner et Findley, 2002) et un gène a été caractérisé chez *A. locustae* (Fast *et al.*, 2003) alors qu'aucun homologue n'a été retrouvé dans le génome d'*E. cuniculi*.



Le séquençage du génome d'*Antonospora locustae* (5,3 Mpb) est actuellement en cours (*N. locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole), les séquences de 199 contigs sont consultables sur le site web: <http://jbpc.mbl.edu/Nosema/Contigs/>, et une base de donnée d'assemblage constamment mise à jour, est disponible depuis peu: <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>.

*A. locustae* a fait l'objet d'études significatives en termes de métabolisme et phylogénie (Fast et Keeling, 2001) et se présente comme un modèle émergent en biologie microsporidienne.



## 2. IMAGERIE CELLULAIRE 3D ET HYBRIDATION *IN SITU*. DES OUTILS APPLICABLES AU SUIVI DU DEVELOPPEMENT PARASITAIRE

---

Il est possible d'aborder la complexité du développement parasitaire de multiples façons, parmi elles, la visualisation des structures cellulaires dans l'espace et l'hybridation *in situ* sont des outils de choix.

### 2.1. Imagerie cellulaire 3 D

L'élucidation de la structure tridimensionnelle (3D) des composants cellulaires visualisés en microscopie électronique est un enjeu majeur de la biologie moderne. Plusieurs techniques d'imagerie 3D tendent à fournir une vision globale de l'organisation cellulaire avec de plus en plus de précisions. Elles peuvent ainsi contribuer à la compréhension de certaines relations structure-fonction, de la même façon que les techniques de diffraction par rayons X et de résonance magnétique nucléaire appliquées aux macromolécules biologiques.

#### 2.1.1. Coupes sériées et empilement d'images 2D

##### 2.1.1.1. Construction du modèle 3D

Le modèle 3D résulte de l'empilement de segmentations des images 2D de coupes sériées (de 60 à 100 nm) pratiquées au travers du matériel biologique. La première étape consiste à acquérir des images numériques des coupes. Après constitution d'une pile d'images en nombre suffisant, celles-ci sont alignées deux à deux manuellement par translation et rotation. Les images sont ensuite segmentées, ce qui signifie que les régions d'intérêt sont détournées. L'empilement des segmentations peut alors être effectué.

##### 2.1.1.2. Evolution de la technique

Si certaines reconstructions 3D étaient et sont encore réalisées à partir de coupes semi-fines observées en microscopie photonique, c'est l'avènement de la microscopie électronique à transmission (MET) qui a permis une avancée dans la visualisation de structures intracellulaires avec une résolution d'image importante.

<b>Type de tomographie</b>	Moléculaire	Cellulaire
<b>Taille de l'échantillon</b>	1-100 nm	< 1µm
<b>Prise d'images</b>	> 1000 de plusieurs objets	< 300 d'un objet unique
<b>Technique de préparation</b>	cryomicroscopie	Inclusion et coupes

*Tableau 3. Résumé des principales différences entre les tomographies moléculaire et cellulaire.*

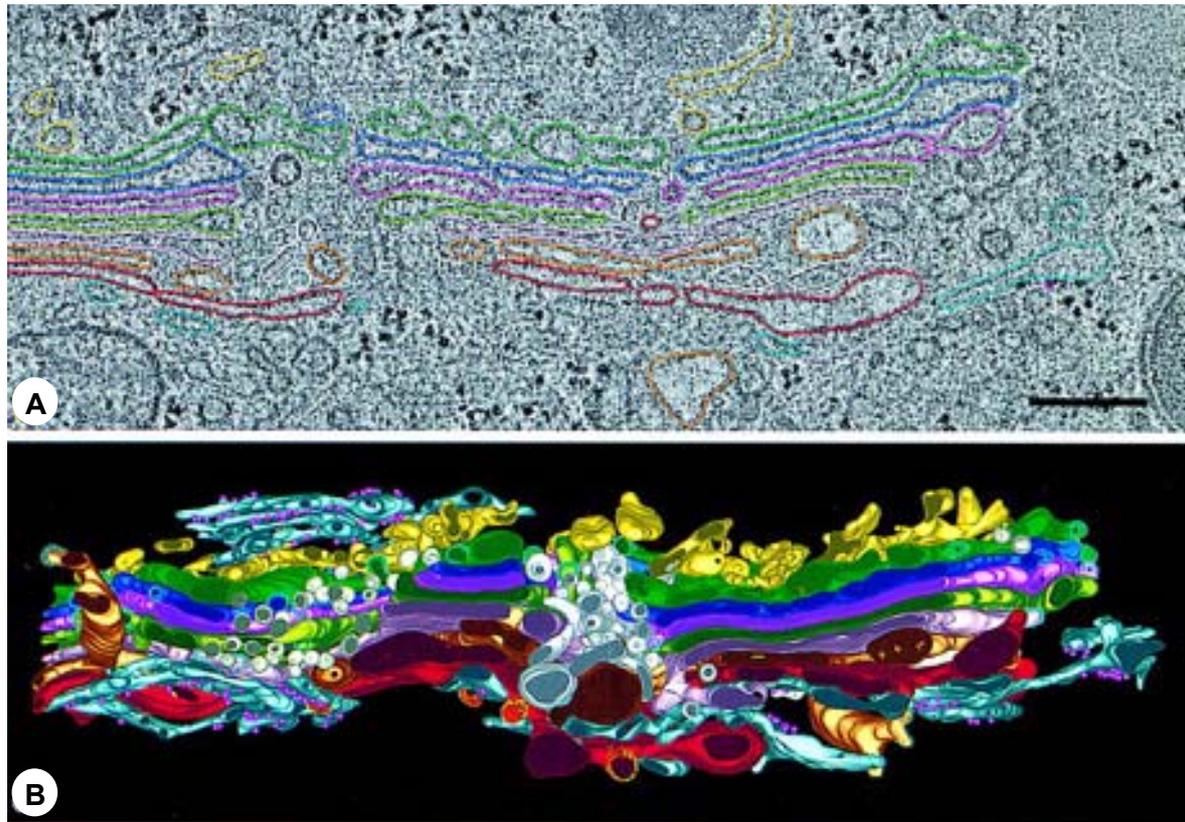
Dans la technique d'origine, les électronographies étaient agrandies au rapport correct en tenant compte de l'épaisseur de la coupe, puis les contours des structures cellulaires étaient dessinés par transparence sur des plaques de verre. Les différentes plaques étaient ensuite superposées et alignées optiquement en respectant l'axe des abscisses et des ordonnées dans l'espace et des paires stéréoscopiques étaient obtenues en prenant deux vues dont l'angle entre les axes était de 7°. Les exemples d'utilisation de cette méthode en parasitologie sont nombreux. Pour le genre *Plasmodium*, citons l'étude de processus digestifs chez *P. bergeri* (Slomianny *et al.*, 1985) et *P. falciparum* (Slomianny, 1990) ainsi que la détermination du caryotype (Prensier et Slomianny, 1986) et la reconstruction de la mitochondrie chez *P. falciparum* (Slomianny et Prensier, 1986). Différents compartiments cellulaires de *P. bergeri* ont également été examinés en 3D après accentuation du contraste des membranes par la technique iodure de zinc-tétraoxyde d'osmium (Slomianny et Prensier, 1990).

La technique s'est progressivement améliorée avec le développement de logiciels informatiques pour le traitement d'images, et la création de microscopes plus puissants. De plus, de nouveaux procédés de préparation de l'échantillon sont apparus comme la congélation haute pression qui permet de vitrifier l'échantillon sans ajout de cryoprotectant, préservant ainsi au mieux la structure native des molécules (Dubochet, 1995). Cette congélation est suivie d'une cryosubstitution (l'échantillon revient à température ambiante sans subir de dommages) et d'une inclusion en résine classique.

A l'heure actuelle, les modèles 3D sont assez rapidement réalisables. Les clichés sont numérisés soit directement par un système annexé au microscope, soit indirectement par un scanner, puis superposés à l'aide d'un logiciel (Midas, Photoshop...). Les contours peuvent être dessinés avec une palette graphique, et des logiciels de reconstruction comme IMOD (Kremer *et al.*, 1996) permettent ensuite de visualiser les images 3D. Ces outils ont été utilisés pour la reconstruction 3D du stade tachyzoïte de *Toxoplasma gondii*, démontrant ainsi l'existence d'une seule mitochondrie (Melo *et al.*, 2000). Des changements morphologiques du chondriome et du RE dans les cellules infectées par *T. gondii* ont pu être mis clairement en évidence (Magno *et al.*, 2005).

### **2.1.2. Tomographie : de la molécule à l'organisme**

La tomographie électronique est le développement le plus récent de la microscopie électronique. On distingue la tomographie moléculaire, plus ancienne, permettant la reconstitution d'un objet <100 nm; et la tomographie cellulaire, dont le développement date



*Figure 9. Exemple de reconstruction tomographique 3D d'une portion de l'appareil de Golgi à partir de cellules rénales de rat congelées de façon ultrarapide et cryosubstituées. (A) Cliché extrait du tomogramme et délimitation des contours (B) Représentation 3D. Echelle : 250 nm (d'après Ladinsky et al, 1999).*

des années 1990 et qui peut s'appliquer à certaines problématiques parasitaires (**Tableau 3**) (Baumeister *et al.*, 1999).

#### **2.1.2.1. Principe de la tomographie cellulaire**

Cette technique vise à obtenir et reconstruire en trois dimensions les volumes d'organites cellulaires. Elle est basée sur l'acquisition en MET d'un faible nombre de projections (100 à 200) d'un seul et même objet biologique sous différents angles d'inclinaison ou tilt (tous les degrés). Ces projections sont alignées, combinées et, grâce à un logiciel de reconstruction, une image synthétique en 3D de l'objet est créée à partir des images brutes. La résolution est de 5 à 8 nm.

En vue d'une meilleure préservation de l'échantillon, celui-ci est soit congelé rapidement dans l'éthane (Dubochet, 1995) soit sous haute pression. Si ses dimensions le nécessitent, des cryocoupes sont réalisées. L'échantillon vitrifié peut être directement introduit dans le microscope à l'aide d'un porte-objet cryo. Un protocole immunocytochimique avec des anticorps couplés à l'or colloïdal peut être appliqué dans le but de déterminer la position exacte des protéines antigéniques sur l'ensemble de l'organite étudié.

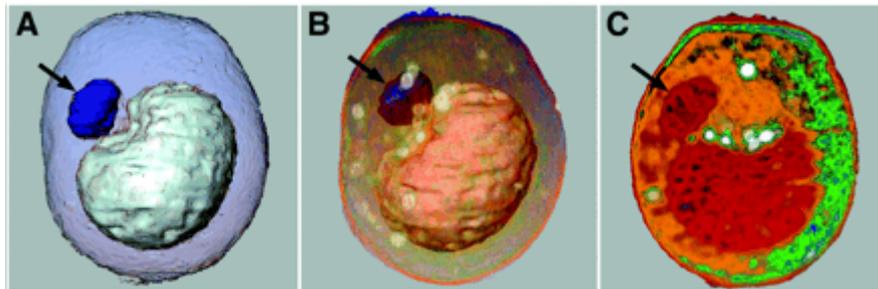
#### **2.1.2.2. Réussites ...**

La tomographie utilisant des microscopes électroniques à haut voltage (1000 KV) a permis de résoudre avec succès la structure 3D du RE (Martone *et al.*, 1993), des mitochondries (Mannella *et al.*, 1994), de l'appareil de Golgi (Ladinsky *et al.*, 1999) (**Figure 9**), ou des cinétosomes (O'Toole *et al.*, 2003). D'autres éléments ont pu être reconstitués en se servant de microscopes électroniques standards : chromosomes (Horowitz *et al.*, 1997) et bactériophages (Bohm *et al.*, 2001).

#### **2.1.2.3. ... et limites!**

L'exposition de l'échantillon au faisceau d'électrons durant l'enregistrement des images peut entraîner des dommages limitant la résolution finale. Dans le cas d'échantillons cellulaires de taille plus importante, il est souvent nécessaire d'effectuer des sections et donc une fixation chimique suivi d'un enrobage en résine qui peut dénaturer des composants de l'échantillon.

Aussi spectaculaires soient-elles, les applications actuelles de la tomographie cellulaire sont limitées aux cellules ayant moins de 0,5-1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, c'est-à-dire principalement certaines bactéries, ou à des régions suffisamment minces d'autres cellules (axones de neurones, par exemple). Elle n'est donc pas la méthode de choix pour l'étude globale des



*Figure 10. Cryo-tomographie aux rayons X d'une cellule entière de Saccharomyces cerevisiae. Trois vues utilisant différents algorithmes de reconstruction. (A) Combinaison entre une surface externe translucide et une surface opaque pour les organelles internes. La flèche indique le noyau et la vacuole occupe la majorité du cytoplasme de la cellule. (B) Surfaces de A combinées avec un rendu de volume permettant de distinguer les gouttelettes lipidiques en blanc. (C) Coupe virtuelle de 0,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur générée par ordinateur (d'après Larabell et Le Gros, 2004).*

cellules eucaryotes. Un premier succès a été obtenu avec la forme amibe de *Dictyostelium discoideum*, cela en raison de sa faible épaisseur (< 1 µm) qui rendait possible la vitrification et la réalisation d'un nombre raisonnable de projections (Medalia *et al.*, 2002).

### 2.1.3. Autres procédés

Des informations structurales en 3D peuvent être obtenues au moyen de la **microscopie confocale**. Celle-ci peut être couplée à la technique des coupes sériées, comme cela a été le cas pour une étude du transport golgien chez *P. falciparum* (Elmendorf et Haldar, 1994).

La **microscopie électronique à balayage** rend, elle aussi, un "effet 3D". En utilisant une nouvelle technique de préparation de l'échantillon pour l'imagerie 3D sur coupes épaisses, (Schatten et Ris, 2004) ont réussi à visualiser des relations entre les membranes du parasite *Toxoplasma gondii*, de la vacuole parasitophore et de la cellule-hôte.

La **cryo-tomographie aux rayons X** est une technique récente générant des informations 3D sur cellules entières, avec une résolution de 60 nm. Au niveau d'énergie du rayonnement électromagnétique utilisé, les matériaux organiques absorbent plus que les molécules d'eau, ce qui produit un contraste naturel quantifiable dans les cellules hydratées. La reconstruction d'une cellule de levure (5 µm) après congélation ultrarapide a pu être effectuée en seulement 3 minutes (**Figure 10**) (Larabell et Le Gros, 2004).

Les progrès dans la motorisation des microscopes et le développement de nouvelles sondes fluorescentes compatibles avec le vivant ont permis d'accéder à l'observation de cellules vivantes multi-marquées en 3D et dans le temps. La **déconvolution d'images** (technique permettant l'amélioration de l'image acquise) pourra autoriser un suivi de l'évolution des différentes structures subcellulaires dans le temps et dans l'espace.

## 2.2. Hybridation *in situ*

A la fin des années 1960, l'introduction de l'hybridation *in situ* (HIS) en microscopie photonique (John *et al.*, 1969; Pardue et Gall, 1969) a ouvert une nouvelle ère en histologie et biologie cellulaire. Cette technique permet de détecter une séquence d'acide nucléique (ADN ou ARN) en rendant visible sa localisation au niveau chromosomique, cellulaire ou tissulaire. Elle est couramment utilisée chez la drosophile pour la localisation de gènes sur les chromosomes polytènes et celle d'ARNm à différents stades du développement embryonnaire. Chez le protozoaire parasite *Plasmodium bergeri*, l'HIS avec des sondes ADN



fluorescentes a permis par exemple la détection de l'ARNm codant l'antigène de surface Pbs21 qui semble être régulé durant la reproduction sexuée (Thompson et Sinden, 1994; Vervenne *et al.*, 1994). La localisation du messager d'une protéine flagellaire chez *Trypanosoma cruzi* a pu être réalisée par HIS après inclusion en paraffine du tissu cardiaque infecté (Lane *et al.*, 2003).

Dès 1971, Jacob *et al.*, ont réussi à adapter l'HIS à la microscopie électronique en mettant en évidence la localisation d'ARNr à l'aide de sondes marquées au tritium. Les études en MET sont cependant beaucoup moins nombreuses qu'en microscopie photonique. Pour celles rapportant la distribution d'ARNm spécifiques, nous citerons le messager de l'hormone de croissance dans l'hypophyse du rat (Morel *et al.*, 1989) et celui du récepteur d'oestrogènes dans l'ovaire de mouton (Tomanek *et al.*, 1997). A notre connaissance, une seule étude a jusqu'alors concerné un ARNm de protozoaire parasite intracellulaire, à savoir la mise en évidence d'une expression stade-spécifique du messager d'une translocase ATP/ADP chez *Plasmodium falciparum* (Jambou *et al.*, 1995).

### **2.2.1. Les sondes**

Quatre types de sondes sont définis : sondes ADN bicaténaire, sondes ADN monocaténaire, sondes ARN et sondes oligonucléotidiques. Les sondes ADN et ARN peuvent être marquées radioactivement mais elles posent des problèmes de sécurité, de stabilité et de délai d'exposition, ce qui a amené au développement de sondes non radioactives ou « froides » (Baumann, 1985). La localisation immunocytochimique des hybrides ADN-ARN ou ARN-ARN au moyen d'anticorps spécifiques a été décrite (Rudkin et Stollar, 1977), mais c'est la mise au point du système avidine-biotine qui a apporté une amélioration significative (Heitzmann et Richards, 1974). Avec la synthèse d'UTP marqué à la biotine, la production d'acides nucléiques biotinylés est devenue possible (Langer *et al.*, 1981) et a ouvert de nouvelles perspectives en HIS non radioactive. Les oligonucléotides de synthèse sont usuellement marqués enzymatiquement en 3' par une désoxynucléotidyl-transférase terminale (Guitteny *et al.*, 1988).

En raison de l'intérêt pour leur application aux eucaryotes unicellulaires de faible taille, les différentes méthodes de préparation du matériel biologique pour l'HIS à l'échelle ultrastructurale, sont présentées ci-dessous avec leurs avantages et inconvénients.



### **2.2.2. Méthode avant inclusion en résine époxy** (Morel et Cavalier, 2001)

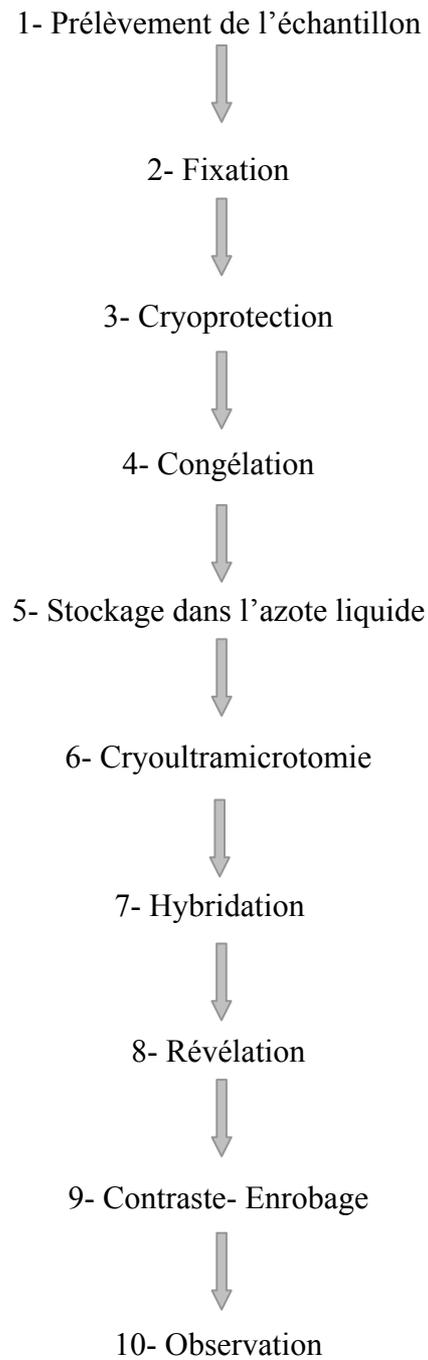
L'HIS est exécutée avant inclusion sur des coupes épaisses (de 50 à 100  $\mu\text{m}$ ) qui seront par la suite enrobées dans une résine époxy afin de réaliser des coupes ultrafines. Après une fixation particulière (par perfusion puis immersion en paraformaldéhyde 4%), les différentes étapes sont donc les suivantes : réalisation des coupes épaisses, hybridation, révélation (immunologique) inclusion, ultramicrotomie, contraste et observation. Cette technique permet une bonne conservation des structures cellulaires et une préservation convenable des acides nucléiques. Cependant, si les sondes pénètrent facilement les coupes épaisses pour former les hybrides, il n'en est pas de même pour des macromolécules (anticorps, enzyme) ou particules (or colloïdal) utilisées dans les méthodes de révélation immunologique. De ce fait, les sondes utilisées sont principalement radioactives. Cette méthode doit donc faire appel au procédé long et délicat de révélation autoradiographique et apparaît la moins résolutive.

### **2.2.3. Méthode après inclusion en résine hydrophile** (Sternberger, 1979)

L'HIS s'effectue sur des coupes ultrafines de tissu préalablement inclus dans une résine acrylique dont la nature hydrophile facilite l'hybridation des acides nucléiques. La fixation du tissu (paraformaldéhyde) est suivie de déshydratation, d'imprégnation par la résine et d'inclusion finale dans la même résine. Après ultramicrotomie, les coupes sont prétraitées (déprotéinisation) puis soumises à l'hybridation. La révélation des hybrides s'effectue par immunomarquage puis les coupes sont contrastées. Cette méthode respecte bien les acides nucléiques, assure une conservation correcte de la morphologie et présente une résolution élevée. L'inconvénient majeur est sa faible sensibilité car seule la surface de coupe est accessible à la sonde. Cependant, dans le cas d'acides nucléiques très représentés dans l'échantillon biologique, cette approche est suffisante.

### **2.2.4. Méthode sur cryocoupes** (Pickel *et al.*, 1975)

L'HIS est appliquée à des coupes de tissu préalablement congelé rapidement. Après fixation aldéhydique, cryoprotection avec un agent tel que le saccharose ou le DMSO puis congélation dans l'azote liquide, les cryocoupes sont produites au moyen d'un ultramicrotome équipé d'un



*Figure 11. Différentes étapes de la méthode d'hybridation in situ sur cryocoupes.*

système de refroidissement (**Figure 11**). Puis sont réalisées successivement l'hybridation, la révélation (immunologique ou radioactive), le contraste et l'enrobage en méthylcellulose. La congélation permet le maintien de l'eau tissulaire qui préserve ainsi au maximum l'intégrité des acides nucléiques. Cet avantage, associé à celui de la pénétration des réactifs dans toute l'épaisseur de la coupe, confère à la technique par ultracryotomie une sensibilité maximale. En outre, le procédé est rapide et la résolution est élevée.

Cette méthode combine donc les avantages des précédentes, ce qui a justifié son choix pour notre travail sur des ARNm microsporidiens.

<b>Ose</b>	<b>Abréviation</b>
Glucose	Glc
Mannose	Man
Galactose	Gal
N-acétylglucosamine	GlcNAc
N-acétylgalactosamine	GalNAc
Fucose	Fuc
Xylose	Xyl
Acide sialique	Sia
Acide glucuronique	GlcA

*Tableau 4. Liste des oses communs utilisés et leur abréviation.*

## 3. LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES

---

### 3.1. Généralités

Les recherches sur les composés glucidiques ont été particulièrement fructueuses durant la première moitié du siècle dernier. Par la suite, avec les premiers pas de la biologie moléculaire, l'étude de ces composés est passée au second plan par rapport à celle des acides nucléiques et des protéines. Ceci notamment en raison de difficultés techniques dans le séquençage des hétéroglycanes complexes et de l'absence de relation directe avec les séquences d'ADN. Le développement ultérieur de technologies facilitant l'exploration des séquences glycaniques a conduit à l'émergence d'une nouvelle discipline appelée glycobiologie. Proposé par Rademacher *et al.* (1988), ce terme rend compte d'interfaces fécondes entre biochimie des glucides, biologie moléculaire et biologie cellulaire. Dans sa plus large définition, la glycobiologie couvre l'étude des structures, de la biosynthèse et des fonctions des glucides libres et liés.

Les oligosaccharides retrouvés communément chez les eucaryotes sont définis par la nature de la liaison entre les unités monosaccharides (**Tableau 4**) et par la partie non glycanique qui peut être un lipide ou une protéine. Les glycanes des glycosphingolipides (glycolipides majoritaires) localisés dans les membranes plasmiques, montrent une incroyable diversité (plus de 200 structures différentes). Outre leur participation à l'organisation membranaire, ils contribuent à la protection contre l'environnement et peuvent se lier à des récepteurs membranaires divers.

A la différence des glycolipides, les possibilités de liaison entre le glycanes et la protéine sont multiples. En effet, la glycosylation des protéines est la plus commune mais également la plus complexe et la plus diversifiée des modifications post-traductionnelles. Retrouvée chez tous les Eucaryotes (plus de 50% des protéines humaines sont glycosylées), elle a récemment été mise en évidence chez quelques Procaryotes (Schmidt *et al.*, 2003).

Les progrès dans les méthodes analytiques, en particulier dans celles basées sur la spectrométrie de masse, ont permis des descriptions structurales d'oligosides de plus en plus détaillées et la découverte de nouveaux modes de glycosylation. De nombreuses études impliquant l'inhibition de la glycosylation et des déglycosylations chimiques ou enzymatiques ont permis d'appréhender les rôles joués par les glycanes dans les glycoprotéines. Ces rôles peuvent être classés dans trois catégories principales :



### 1. Stabilisation et protection de la conformation protéique

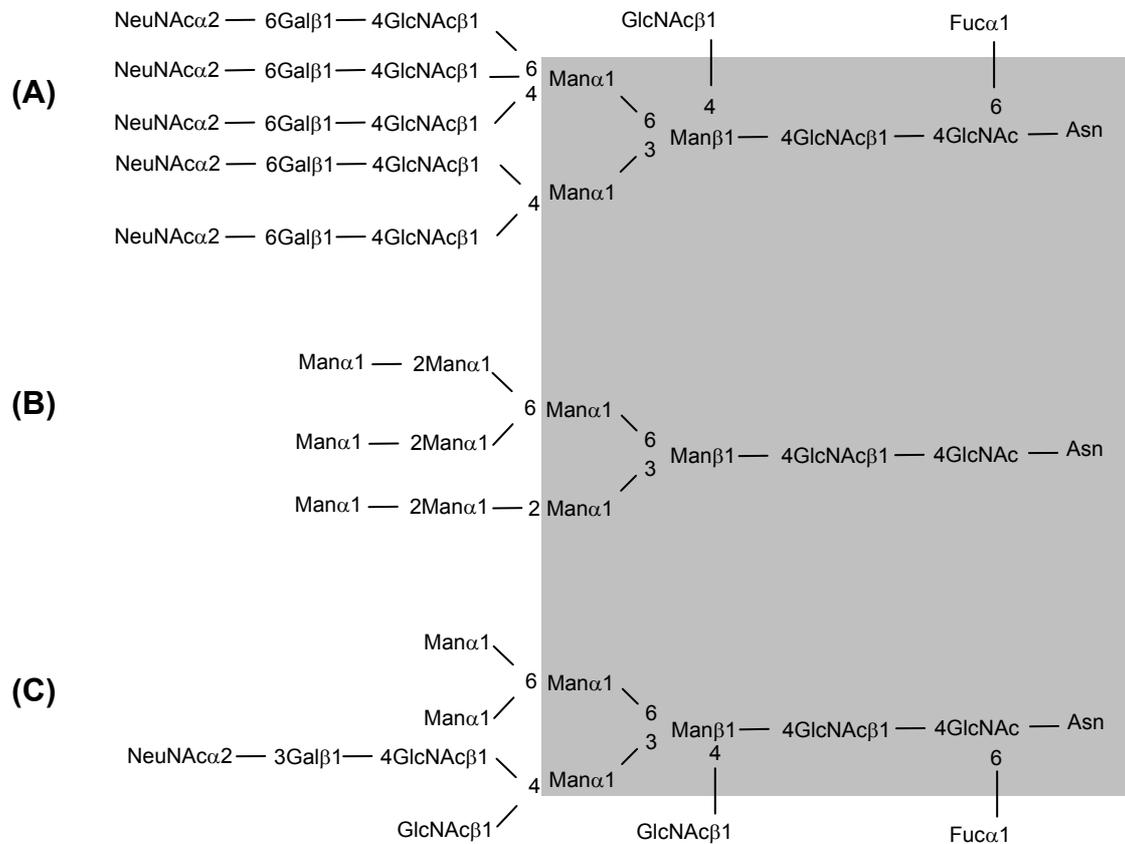
Les glycanes contribuent à la mise en place de la structure spatiale de la protéine en influençant son repliement, et ils permettent donc son maintien dans une conformation biologiquement active. Leur caractère hydrophile favorise la solubilisation de la protéine en milieu aqueux et les interactions avec d'autres molécules hydrophiles. Ils jouent aussi un rôle de bouclier en recouvrant une partie de la surface de la protéine. Ils sont donc déterminants dans la protection contre les attaques protéolytiques ainsi que dans le masquage d'épitopes peptidiques, entraînant alors une diminution du pouvoir antigénique, comme c'est le cas pour de nombreuses protéines virales.

### 2. Modulation du trafic intracellulaire

Les glycanes règlent la durée de vie des protéines, la désialylation de certaines hormones entraînant une élimination plus rapide de ces glycoprotéines (Morell *et al.*, 1971). Ils modulent également le transport intracellulaire des glycoprotéines en interagissant avec des récepteurs spécifiques. Ils contrôlent la vitesse de sécrétion et interviennent dans le ciblage vers le lysosome. La phosphorylation du mannose-6 est requise dans certains types cellulaires pour le trafic des enzymes lysosomales (Brown et Farquhar, 1984). Un système de contrôle de qualité assuré par des glucosidases garantit que seules les protéines correctement repliées poursuivent toutes les étapes de leur maturation, jusqu'à leur adressage.

### 3. Intervention dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire

Les glycoprotéines de surface sont impliquées dans divers processus de reconnaissance. Les liaisons sucres-sucres jouent un rôle spécifique dans l'adhésion entre cellules. Par exemple, l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales est médiée par le récepteur de la famille des sélectines (Lowe, 2003). Chez l'insecte une galectine est reconnue par les lipophosphoglycanes de *Leishmania* (Kamhawi *et al.*, 2004). Certains glycanes agissent comme des récepteurs spécifiques pour les virus, bactéries (Boyle et Finlay, 2003) et parasites. Les acides sialiques des cellules sont reconnus par les Trypanosomes (Schenkman *et al.*, 1993) et le Toxoplasme (Monteiro *et al.*, 1998). Au contraire, d'autres agissent en masquant les épitopes reconnus par des microorganismes, des toxines ou des anticorps auto-immuns. Des relations de symbiose entre animaux et micro-organismes seraient aussi aidées par des interactions impliquant des glycanes.



**Figure 12. Les trois sous groupes de N-glycanes. (A) Type complexe. (B) Type riche en mannose. (C) Type hybride. La structure grise est le coeur trimannose commun à tous les N-glycanes. Les structures en dehors peuvent varier d'un glycanes à l'autre.**

## 3.2. Les différents modes de glycosylation

La glycosylation offre une grande variété de structures glycaniques due à la diversité des oses, des isoméries et des liaisons qui unissent ces oses. Chez les Eucaryotes, deux grands types de glycosylation sont distingués en fonction du lien covalent entre le glucide et la chaîne polypeptidique :

- la N-glycosylation, quand la liaison s'effectue sur un résidu asparagine (Asn) par l'intermédiaire de l'atome d'azote de sa fonction amide (type GlcNAc- $\beta$ -Asn);

- la O-glycosylation, quand la liaison est réalisée sur un résidu amino-acide hydroxylé, le plus souvent sérine (Ser) ou thréonine (Thr), *via* un atome d'oxygène.

Des glycanes N- et O-liés peuvent co-exister au sein d'une même glycoprotéine.

Protéines membranaires résidentes du réticulum endoplasmique (RE) ou de l'appareil de Golgi, les glycosyltransférases assurant l'addition de différents oses constituent des familles bien distinctes. Néanmoins, elles ont en commun une architecture tripartite, représentée par un domaine N-terminal formant une courte « queue » cytoplasmique, un seul domaine transmembranaire et une région « tige » portant le domaine catalytique C-terminal.

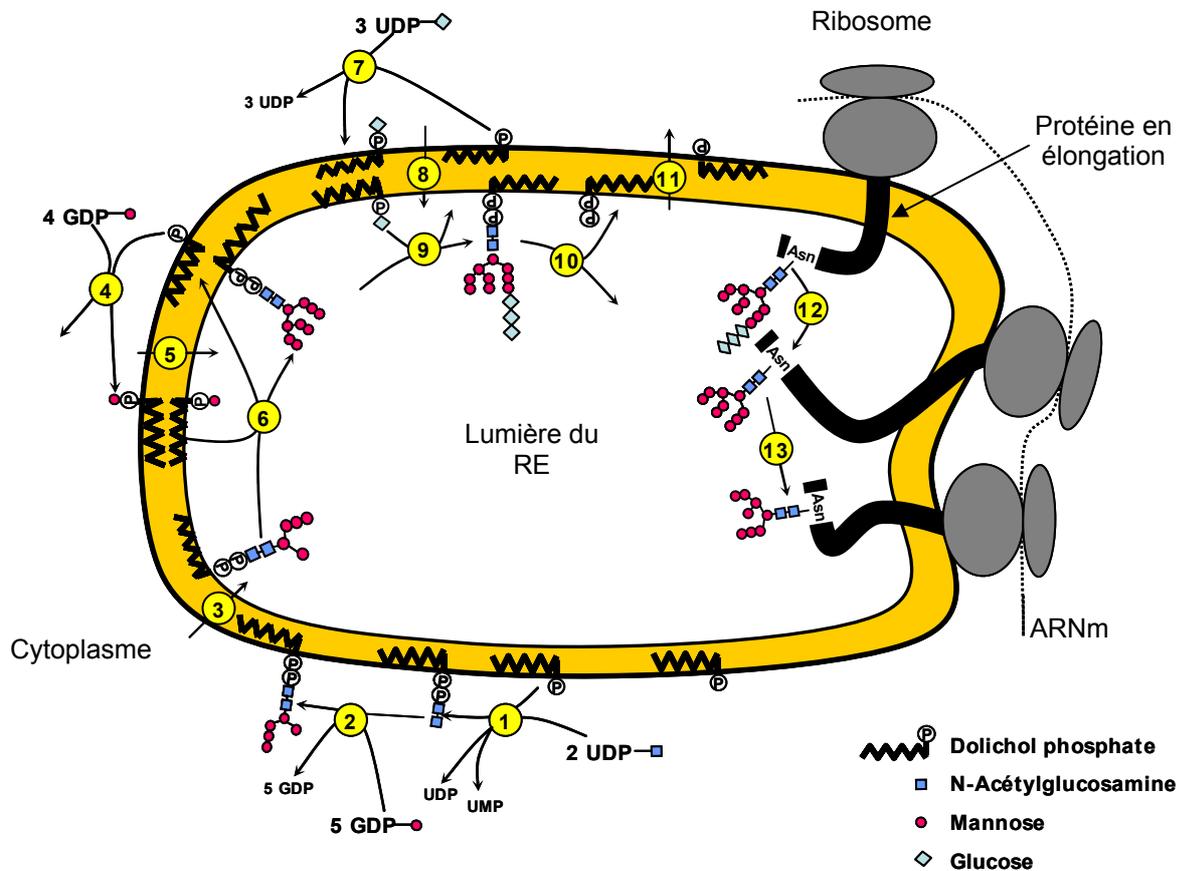
### 3.2.1. N-glycosylation

Tous les N-glycanes sont caractérisés non seulement par l'attachement à Asn mais aussi par un noyau commun pentasaccharidique ramifié, contenant 2 résidus N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et 3 résidus mannose (Man), soit : (GlcNAc)<sub>2</sub>(Man)<sub>3</sub>. En fonction de la nature des oses ajoutés à ce noyau, on distingue trois types de N-glycanes: le type « riche en mannose », le type « hybride » et le type « complexe » (**Figure 12**).

Chez les cellules eucaryotes, la voie « classique » de N-glycosylation des protéines débute dans le RE granulaire et se termine dans l'appareil de Golgi.

Dans le RE granulaire: (Abeijon et Hirschberg, 1992) (**Figure 13**)

L'oligosaccharide synthétisé au niveau du RE est lié par covalence au dolichol (Dol), un alcool à longue chaîne carbonée, synthétisé dans le cytosol. Le précurseur d'ose utilisé par chaque glycosyltransférase est un nucléotide-ose : GDP-Man, UDP-Glc ou UDP-GlcNAc. Les 4 principales étapes sont les suivantes:



**Figure 13. Topographie du cycle du dolichol.** Les enzymes impliquées à chaque étape de ce cycle sont: **1:** N-acétylglicosaminyl-1-P-transférase et N-acétylglicosaminyltransférase; **2:** cinq mannosyltransférases (GDP-Man dépendantes); **3:** "flipase"; **4 et 5:** Dol-P-Man synthase; **6:** quatre mannosyltransférases (Dol-P-Man dépendantes); **7 et 8:** Dol-O-Glc synthase; **9:** glucosyltransférases; **10:** oligosaccharyltransférase (OST); **11:** Dol-pyrophosphatase; **12:**  $\alpha$ -glucosidase I et II; **13:** RE  $\alpha$ 1,2-mannosidase. (d'après Abeijon et Hirschberg, 1992).

1) la synthèse d'un heptasaccharide ramifié, riche en mannose: phosphorylation de Dol à partir d'ATP sur la face cytosolique de la membrane du RE puis addition séquentielle au dolichol-phosphate (Dol-P) de 2 GlcNAc et 5 Man, donnant : Dol-(GlcNAc)<sub>2</sub>(Man)<sub>5</sub>.

2) le basculement de Dol-(GlcNAc)<sub>2</sub>-(Man)<sub>5</sub> par un mécanisme de flip-flop à travers la membrane, l'oligosaccharide se trouvant désormais dans la lumière du RE.

3) la complexification de l'arborisation par addition de 4 Man supplémentaires et 3 résidus glucose (Glc). Ces oses sont transportés dans la lumière du RE par l'intermédiaire d'autres molécules de dolichol, comme précédemment. Le motif final est Dol-(GlcNAc)<sub>2</sub>(Man)<sub>9</sub>(Glc)<sub>3</sub>.

4) le transfert de l'oligosaccharide complet à une chaîne polypeptidique en cours de synthèse au niveau d'un polysome lié et traversant progressivement la membrane du RE, suivi d'élagage (Silberstein et Gilmore, 1996). Le transfert accompagné de la formation de la liaison N-glycosidique est catalysé spécifiquement par une N-oligosaccharide-protéine transférase ou oligosaccharyltransférase (OST). Le premier GlcNAc de l'oligosaccharide est lié à un résidu Asn appartenant à une séquence consensus tripeptidique : Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, X étant un acide aminé quelconque, sauf la proline (Bause, 1983). Des glycosidases présentes dans la lumière du RE enlèvent successivement les 3 Glc et un Man, cet élagage conduisant au glycoconjugué (Protéine)-(GlcNAc)<sub>2</sub>(Man)<sub>8</sub> qui peut alors avoir accès à l'appareil de Golgi.

#### Dans le Golgi:

Des processus de déglycosylation et de reglycosylation interviennent pendant la maturation de la glycoprotéine dans les différents saccules de l'appareil de Golgi (Schachter, 1986). Dans le compartiment cis, se déroule la phosphorylation des mannoses, modification indispensable à la maturation des enzymes lysosomales et à leur adressage vers ce compartiment. Au niveau du compartiment médian, l'élagage de mannose se poursuit par action de mannosidases spécifiques pour ne conserver de la structure initiale que le noyau commun pentasaccharidique (Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>. L'arborisation glucidique se complexifie ensuite de façon variable selon les protéines considérées, des glycosyltransférases spécifiques assurant l'addition de GlcNAc et de L-fucose (Fuc). Elle se termine dans le compartiment trans par ajout de galactose (Gal), de N-acétylgalactosamine (GalNAc), ou d'acides sialiques tels que l'acide N-acétyl-neuraminique (NeuAc ou NANA)...(**Figure 12**).



Il est possible que des voies de N-glycosylations cytoplasmique, nucléaire et mitochondriale existent. Des marquages lectines indiquent une abondante présence de glycanes contenant du GlcNAc, mannose et fucose dans le noyau et le cytoplasme. Quelques enzymes comme une dolichy-Man phosphate synthase ou des sialyltransférases ont été localisées dans ces compartiments (Gasnier *et al.*, 1992). Mais dans ces organites, la O-glycosylation est jusqu'à présent la seule forme reconnue (Hart, 1997) et les exemples de N-glycanes cytoplasmiques sont probablement originaires de la voie de sécrétion. L'étude d'une protéine mitochondriale N-glycosylée a révélé une importation du RE (Chandra *et al.*, 1998). Il a également été montré la présence de protéines N-glycosylées au niveau du chloroplaste mais elles transiteraient par le RE (Villarejo *et al.*, 2005).

Le seul autre type de N-glycosylation différent du familier GlcNAc-Asn correspond à une liaison entre glucose et asparagine. Identifiée pour la première fois sous la forme Glc- $\beta$ -Asn chez une archéobactérie du genre *Halobacterium* (Wieland *et al.*, 1983), la forme alternative Glc- $\alpha$ -Asn a été mise en évidence dans l'association d'une chaîne de trois Glc à une protéine de la lame basale de cellules animales (Shibata *et al.*, 1988).

### 3.2.2. O-glycosylation

L'attachement d'un glycanes à un résidu Ser ou Thr de la chaîne polypeptidique dépend d'un ose dont la nature est plus variable que pour la N-glycosylation:

- Ser/Thr-O-GalNAc (N-acétylgalactosamine) pour la O-glycosylation de type « mucine », la plus répandue parmi les glycoprotéines animales et végétales (Hang et Bertozzi, 2005)
- Ser-O-Xyl (xylose) caractérisant l'association aux longues chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) (Green et Northcote, 1978; Ueno *et al.*, 2001)
- Ser/Thr-O-Man (mannose) pour le type « levure », découvert chez *Saccharomyces cerevisiae* (Sentandreu et Northcote, 1969) et assigné initialement aux seuls champignons
- Ser/Thr-O-Gal (galactose) d'abord détecté dans des extensines végétales (Lamport *et al.*, 1973) puis retrouvé dans des cellulases bactériennes (Gerwig *et al.*, 1993)
- Ser/Thr-O-Fuc (L-fucose) dans des protéines de *Dictyostelium* (Riley *et al.*, 1993) aussi bien que dans certains facteurs de coagulation (Harris et Spellman, 1993)

Une transférase spécialisée catalyse la formation de chacune de ces liaisons O-glycosidiques et l'élongation du O-glycane repose exclusivement sur l'addition séquentielle

<b>GAG</b>	<b>Disaccharide</b>	<b>Nb unités /chaîne</b>
héparine/héparane sulfate	GlcNAc – GlcA	20-140
chondroïtine sulfate	GalNAc – GlcA	40
kératane sulfate	GlcNAc – Gal	4
acide hyaluronique	GlcNAc – GlcA	1

*Tableau 5. Les 4 principaux types de GAG, et la nature de leurs chaînes disaccharidiques.*

d'oses au niveau de l'appareil de Golgi. Les O-glycanes sont généralement moins ramifiés que la plupart des N-glycanes et présentent souvent des structures biantennaires. Les nucléotide-oses servant de précurseurs (UDP-Gal, GDP-Man, CMP-NeuAc...) sont synthétisés dans le cytosol et doivent entrer dans la lumière des compartiments golgiens via des perméases spécifiques.

Les O-glycanes de type mucine contiennent communément GlcNAc, Gal, Fuc et acides sialiques. Leurs chaînes complexes sont divisées en trois régions distinctes : (1) le noyau (« cœur »), incluant la liaison avec l'axe peptidique, (2) le squelette, région charnière linéaire ou ramifiée, et (3) la périphérie, terminant la chaîne. La comparaison des séquences d'acides aminés entourant les sites connus de cette O-glycosylation n'a pas conduit à l'émergence d'une séquence consensus. Quelques prédictions sont cependant possibles. La présence de proline aux positions -1 et +3 favoriserait l'attaque des résidus Ser/Thr (Wilson *et al.*, 1991). La proline interrompt les hélices  $\alpha$  et peut favoriser la formation de feuilletts  $\beta$ . C'est effectivement au niveau des feuilletts  $\beta$  que sont observés la plupart des sites de O-glycosylation. Par contre, les résidus Ser/Thr proches d'un résidu Asn modifié par N-glycosylation ne pourraient pas être soumis à O-glycosylation, en raison de l'encombrement stérique.

L'association d'une protéine à une ou plusieurs chaînes de GAG (jusqu'à une centaine) constitue une macromolécule où la partie glycanique prédomine fortement, justifiant l'appellation protéoglycane (Ruoslahti, 1988). Polymères linéaires d'unités disodiques [osamine-acide uronique] liées en  $\beta$ , les GAG présentent quatre types principaux : héparine/héparane sulfates, chondroïtine sulfates, kératane sulfates et acide hyaluronique (**Tableau 5**). Chaque chaîne commence par un résidu xylose qui est O-lié le plus souvent à une sérine appartenant à la séquence consensus Glu/Asp-X-Ser-Gly. Les protéoglycanes sont localisés à la surface des cellules et dans les matrices extracellulaires. Capables d'interagir avec de nombreux ligands, ils sont donc impliqués dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Leur pouvoir immunogène est faible, la partie protéique étant fortement masquée par les GAG.

La glycosylation de type « levure » ou O-mannosylation contraste avec le cas précédent par la formation de courtes chaînes composées de 1 à 6 unités Man pouvant être bi-substituées. Bien qu'elle soit caractéristique d'une grande variété de protéines chez des



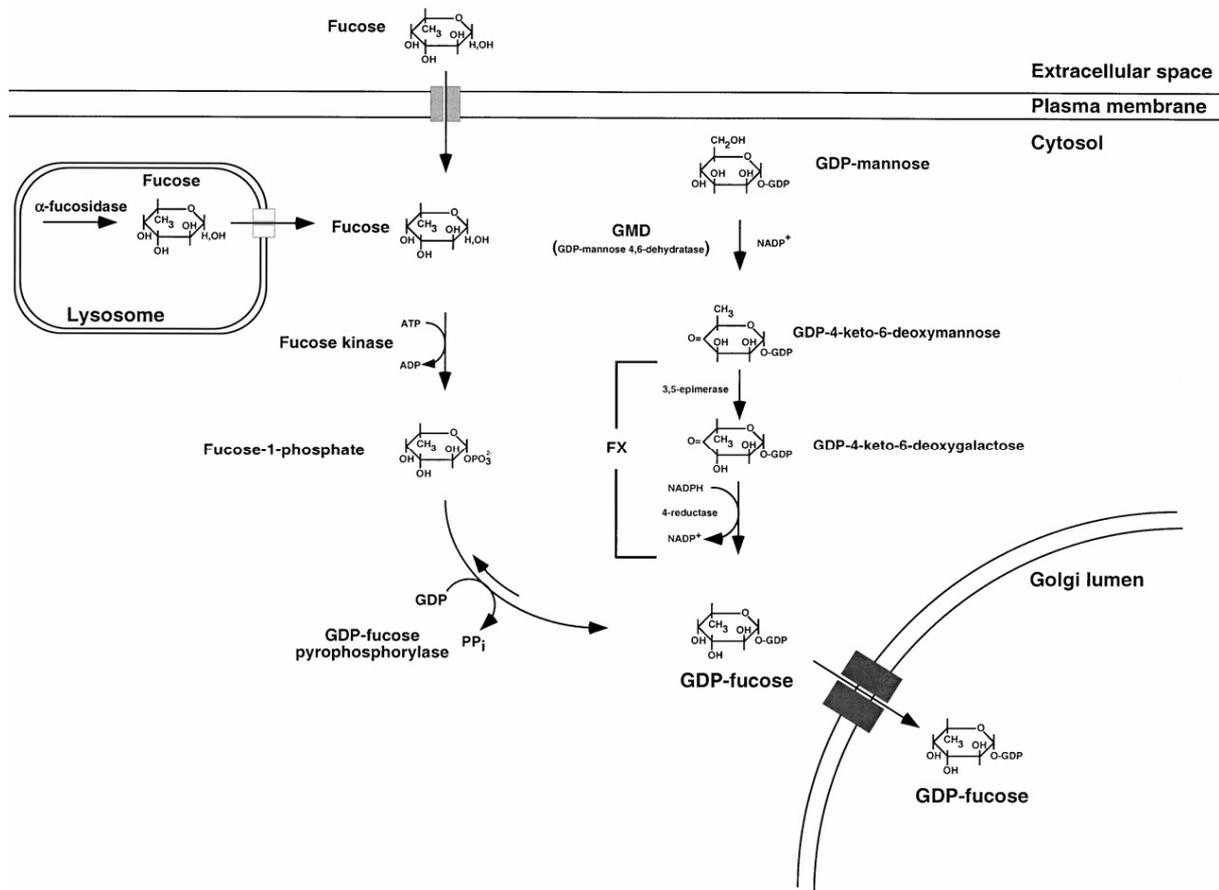
levures et autres champignons (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999), elle peut s'effectuer aussi chez des animaux. L'association Glc-Man-O-Thr a été démontrée dans le collagène de la cuticule du ver Annélide *Nereis* (Spiro et Bhoyroo, 1980). Les premières preuves de la capacité de O-mannosylation par les mammifères ont été fournies au travers d'études sur les protéoglycanes du cerveau de rat (Krusius *et al.*, 1986) puis sur le dystroglycane du système nerveux (Chiba *et al.*, 1997) et de muscles squelettiques (Sasaki *et al.*, 1998). Des glycopeptides cérébraux du lapin présentent une abondante famille de chaînes à mannose O-liées, certains résidus Man étant bi-substitués comme chez *Saccharomyces* (Chai *et al.*, 1999). La plupart de ces chaînes partagent un noyau de la forme Gal- $\beta$ 1,4-GlcNAc- $\beta$ 1,2-Man-O-Ser/Thr qui est modifiable par Fuc, GalNAc et des acides sialiques.

Il est à souligner une importante variante de la O-glycosylation, la modification O-GlcNAc, consistant en l'attachement d'une seule structure monomérique (N-acétylglucosamine) sur Ser/Thr et affectant des protéines qui résident dans le noyau et le cytosol (Torres et Hart, 1984). Elle se réalise chez divers Eucaryotes, allant du protozoaire *Plasmodium* (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1993) à l'Homme (Torres et Hart, 1984). Il semblerait que cette modification s'effectue de façon réciproque ou exclusive sur des sites identiques ou adjacents à la phosphorylation (Hart, 1997). La modification O-GlcNAc est très dynamique et répond aux stimuli cellulaires. Elle est de ce fait majoritairement impliquée dans des processus de régulation. Une glycoprotéine contenant de nombreuses modifications O-GlcNAc est liée au facteur de transcription eIF-2, le protégeant alors de la phosphorylation par des kinases maintenant ainsi l'initiation de la synthèse protéique (Datta *et al.*, 1989).

Les dérivés hydroxylés de la proline et de la lysine, ainsi que la tyrosine pourvue d'un groupe phénolique, peuvent aussi servir à l'établissement d'une liaison O-glycosidique : hydroxyproline liée à Gal dans certains collagènes et à l'arabinose (Ara) dans des protéines de paroi végétale (Kieliszewski *et al.*, 1995), hydroxylysine liée à Ara dans les extensines de plantes, tyrosine liée à Glc dans la glycogénine (Smythe *et al.*, 1988a) et dans des glycoprotéines de surface bactérienne (Christian *et al.*, 1993).

### **3.2.3. Le L-fucose, un ose impliqué dans différentes formes de glycosylation**

Le L-fucose (Fuc), ou 6-deoxy-L-galactose est un dérivé du mannose appartenant à la série L.



**Figure 14. Biosynthèse du GDP-fucose.** Dans les cellules de mammifère, le fucose est synthétisé par deux voies distinctes : la voie de novo et une voie de secours alternative (d'après Becker et Lowe, 2003).

Il est l'un des 8 sucres reconnus essentiels à une activité optimale des communications intercellulaires dans le corps humain.

Le fucose est rencontré dans des glycoprotéines et des glycolipides, et peut être directement lié de façon covalente à la chaîne polypeptidique. Son rôle le plus étudié est dans l'adhésion cellulaire comme composant essentiel d'un ligand de la famille des sélectines (lectines exprimées dans les cellules sanguines et vasculaires). Les résidus fucose des glycoprotéines participent à des processus biologiques tel que : l'inflammation, le développement, les interactions microbes-hôtes... De plus, étant le sucre immunodominant des glycoprotéines, sa présence augmenterait la réponse antigénique

### **3.2.3.1. Biosynthèse du L-fucose**

Deux voies cytosoliques permettent la formation de GDP-Fuc (**Figure 14**). La voie constitutive *de novo* implique la conversion de GDP-Man en GDP-Fuc en deux étapes catalysées par la GDP-mannose-4,6-dehydratase (GMD) et la GDP-4-ceto-6-deoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4-reductase (FX) (Tonetti *et al.*, 1996). Cette synthèse a été conservée durant l'Evolution et les enzymes correspondantes ont été clonées à partir de certaines bactéries, plantes, et mammifères. Dans la voie alternative, dite de « secours », l'activité de la fucokinase produit le fucose-1-phosphate à partir de fucose et d'ATP. La GDP-fucose pyrophosphorylase catalyse ensuite la formation du GDP-fucose à partir de fucose-1-phosphate et de GTP. Cette voie utilise le fucose libre extracellulaire ou celui issu du catabolisme des glycoconjugués par une ou plusieurs activités fucosidase (Johnson et Alhadeff, 1991). Le système de transport du fucose est encore peu caractérisé mais semble opérer par diffusion facilitée spécifique (Wiese *et al.*, 1994).

### **3.2.3.3. La fucosylation chez les mammifères**

Composant des N-glycanes, des O-glycanes et des glycolipides, la plupart du temps le fucose est une modification terminale. Chez les vertébrés, une caractéristique commune aux N-glycanes de type hybride et complexe (**Figure 12**) est l'ajout par une fucosyltransférase spécifique d'un résidu fucose en  $\alpha$ 1-6 sur le GlcNAc lié à l'Asn de la protéine. Chez les plantes et les invertébrés, le fucose est rajouté en  $\alpha$ 1-3 toujours sur le résidu GlcNAc à l'extrémité réductrice de la chaîne. Des  $\alpha$ 1-2 fucosyltransférases sont également présentes chez l'homme, elles sont responsables de la synthèse des antigènes H des groupes sanguins dont le fucose terminal est un élément essentiel.



Les premières preuves de l'utilisation du fucose dans des liaisons O-glycosidiques avec les résidus hydroxylés de protéines ont été apportées par Hallgren *et al.* (1975) et Klinger *et al.* (1981) qui identifièrent les composés Glc-Fuc-O-Thr et Fuc-O-Ser/Thr dans l'urine humaine et les cellules de rat, respectivement. La liaison à une protéine spécifique a ensuite été démontrée avec une urokinase recombinante, plus précisément au niveau d'un domaine de type EGF (Kentzer *et al.*, 1990). La même modification est retrouvée dans l'activateur plasminogène tissulaire (Harris *et al.*, 1991), et quelques facteurs de coagulation humains (Harris et Spellman, 1993) ainsi que dans des récepteurs Notch impliqués dans la signalisation (Moloney *et al.*, 2000). La O-fucosylation a aussi été montrée au niveau de répétitions thrombospondine de type 1 (forme Glc-Fuc-O-Ser/Thr) (Hofsteenge *et al.*, 2001). Le fucose est O-lié comme monosaccharide (Fuc-O-Ser/Thr), tétrasaccharide (NeuAc-Gal-GlcNAc-Fuc-O) (Harris et Spellman, 1993), di- ou trisaccharide intermédiaire (Moloney *et al.*, 2000). La séquence consensus pour cette modification, dans diverses protéines, est CXXGG(S/T)C (Harris et Spellman, 1993). Toutefois, la O-fucosylation sur les répétitions thrombospondine est caractérisée par un consensus significativement différent : CSX(S/T)CG (Hofsteenge *et al.*, 2001).

Ce processus dépend d'une ou plusieurs O-fucosyltransférases golgiennes dont la première a été identifiée dans les cellules CHO (Wang *et al.*, 1996). Ces enzymes reconnaissent, outre la séquence consensus primaire, des éléments structuraux tridimensionnels du domaine EGF. Responsable de la synthèse du disaccharide Glc-Fuc, la O-fucose  $\beta$ 1-3glucosyltransférase est capable d'allonger la chaîne avec d'autres résidus Fuc (Moloney et Haltiwanger, 1999).

Une pratique courante dans l'étude de la fucosylation est l'utilisation d'une lignée de cellules CHO mutantes Lec1 qui sont incapables de synthétiser les N-glycanes complexes. L'incorporation de Fuc marqué dans des protéines de cette lignée est donc synonyme d'une utilisation alternative du fucose, dans la O-fucosylation par exemple (Stults et Cummings, 1993).

#### 3.2.3.4. La fucosylation chez *Dictyostelium discoideum*

Répondant à un manque de nutriments par une voie alternative de développement sous une forme multicellulaire, *Dictyostelium discoideum* présente de nombreuses similarités avec les cellules animales. Divers glycanes de ce myxomycète sont très immunogènes chez les mammifères. Les protéines fucosylées semblent avoir un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la couche externe de la paroi des spores de *D. discoideum*, compte tenu

Espèce	Protéine	Propriétés (stade de développement)
<i>Trypanosoma brucei</i>	- VSG - PARP/procycline	glycoprotéines du « cell coat » (forme sanguine) glycoprotéines du « cell coat » (forme procyclique)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	- Ssp-4 - Antigène 1G7 90kDa - Famille GP 85 - 35/ 50 kDa - 10D8 Ag	protéine de surface majeure (amastigote) protéine de surface majeure (métacyclique) trans sialidases (trypomastigote) accepteur majeur d'acide sialique (épimastigote) accepteur majeur d'acide sialique (métacyclique)
<i>Leishmania spp.</i>	- gp63 - PSA-2	protéase de surface (promastigote) antigène de surface (promastigote)
<i>Toxoplasma gondii</i>	- P22, P23, P30, P35, P43	protéines de surface (tachyzoite)
<i>Plasmodium falciparum</i>	- p76 - MSA-1 - MSA-2	protéase de surface (mérozoite, schizonte) antigène majeur de surface (mérozoite) antigène de surface (mérozoite)
<i>Giardia lamblia</i>	- GP49	surface (trophozoite)

**Tableau 6. Exemples de protéines à ancre GPI chez des protozoaires parasites (d'après Mc Conville et Ferguson, 1993).**

d'observations réalisées sur la souche mutante HL250. Cette souche est incapable de transformer GDP-Man en GDP-Fuc, de sorte qu'en l'absence de Fuc extracellulaire, aucune fucosylation ne peut avoir lieu. Le taux de germination est faible, l'enveloppe sporale devenant perméable et ses protéines sensibles aux attaques protéolytiques. (Gonzalez-Yanes *et al.*, 1989)

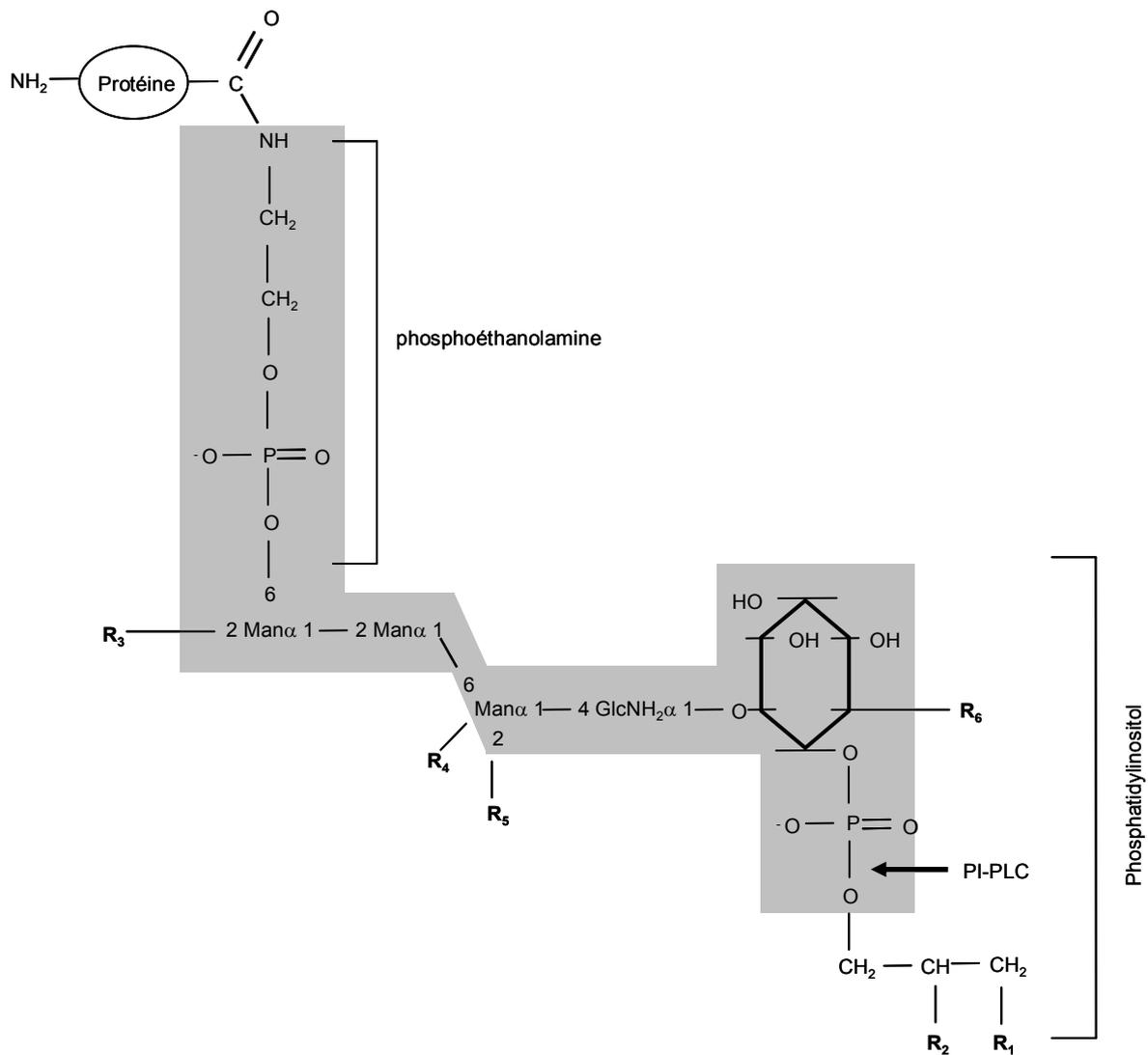
Comme chez les mammifères, le fucose est utilisé dans les N- et O-glycosylations. Au moins 5 types de fucosylation ont été décrits :

- Pour les N-glycanes, une fucosylation de type "core", avec liaison en  $\alpha 1,6$  à GlcNAc, cas le plus répandu dans les protéines N-glycosylées animales, est retrouvé lors de la croissance végétative (cellules prolifératives) alors qu'une fucosylation de type "périphérique" avec liaison en  $\alpha 1,3$ , comme chez les insectes ou les plantes, prédomine lors du développement du stade multicellulaire (limace) (Ivatt *et al.*, 1984).
- Association de Fuc à une protéine cytosolique (FP21), catalysée par une fucosyltransférase cytosolique non conventionnelle (liaison pas encore caractérisée mais semblant être de type O) (Gonzalez-Yanes *et al.*, 1992).
- O-fucosylation de la protéine SP96 de l'enveloppe sporale, similaire à celle pour les domaines EGF (Riley *et al.*, 1993).
- Une analyse de composition montre la présence de Fuc, GlcN et phosphate dans une glycoprotéine de surface (SP29) des préspores (Haynes *et al.*, 1993).
- Un autre épitope fucose O-lié non caractérisé, reconnu par un anticorps monoclonal (mAb83.5), est présent sur les protéines de surface (West et Erdos, 1988). Cet anticorps ne réagit pas avec le O-fucose des modules EGF. L'épitope minimal reconnu est Fuc-1-P et deux résidus Fuc ou plus peuvent augmenter la reconnaissance (Srikrishna *et al.*, 1998). Une étude sur la protéine SP96 suggère que mAb83.5 reconnaît également la structure : Fuc( $\alpha 1-3$ )GlcNAc- $\alpha$ -1-P-Ser (Mreyen *et al.*, 2000).

### **3.2.4. Autres modes de glycosylation**

#### **3.2.4.1. Glypiation**

La glypiation d'une protéine consiste en l'addition d'un groupement glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) à l'extrémité C-terminale. L'insertion de la partie phosphatidylinositol (PI) dans la couche phospholipidique externe de la membrane cellulaire assure un ancrage stable de la protéine à cette membrane, d'où l'appellation « ancre GPI ».



**Figure 15. Structure d'une ancre GPI.** Toutes contiennent une structure conservée (en gris). Le core glycanique,  $Man(\alpha 1,2)Man(\alpha 1,6)Man(\alpha 1,4)$ , est glycosidiquement lié au groupe 6-hydroxyl du phosphoinositol. Des modifications peuvent avoir lieu en R1, R2, R3, R4, R5 et R6 comme une palmitoylation de l'anneau inositol ou un groupement phosphoéthanolamine supplémentaire. L'utilisation d'enzymes spécifiques comme la phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) bactérienne est courante afin d'identifier des protéines ancrées GPI, ces enzymes à forte affinité pour les ancres clivent la structure et relarguent la protéine soluble (d'après Ferguson, 1985).

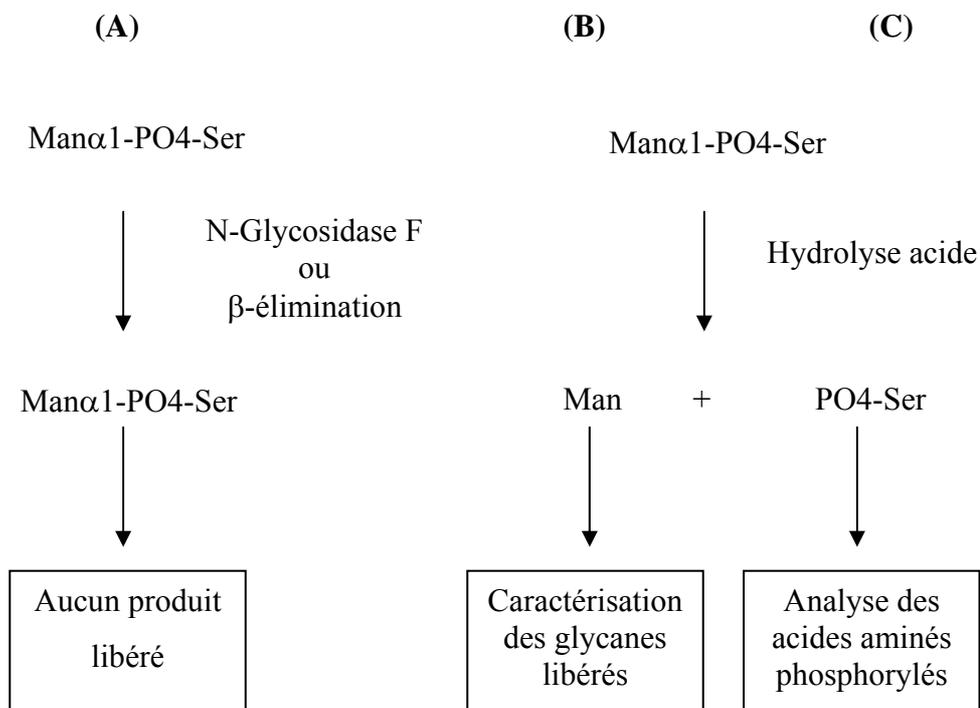
Les structures GPI ont été mises en évidence initialement au niveau des glycoprotéines de surface variables VSG (« Variant Surface Glycoprotein») de trypanosomes (Ferguson *et al.*, 1988) et de l'antigène de surface Thy-1 de lymphocytes de rats (Homans *et al.*, 1988). Depuis, des centaines de protéines à ancre GPI ont été caractérisées chez de multiples organismes allant des archéobactéries aux humains (**Tableau 6**). Ces protéines peuvent être des enzymes, des protéines d'adhésion, des récepteurs.... Le fait qu'une même protéine puisse être attachée à la membrane plasmique *via* une ancre GPI, dans certains cas, ou *via* un domaine transmembranaire, dans d'autres cas, reste une énigme. Les ancres GPI favorisent la mobilité latérale des protéines et interviennent dans des processus de transduction de signaux et d'endocytose. La possibilité de relargage de certaines protéines de surface par action de phospholipases spécifiques suggère aussi un rôle des GPI dans la régulation de l'expression et de l'activité de ces protéines. De plus, en autorisant une densité élevée de molécules protéiques à la surface de la cellule, les GPI facilitent la formation d'un revêtement protecteur, particulièrement efficace chez certains parasites (McConville et Ferguson, 1993).

Les ancres GPI ont un cœur conservé (**Figure 15**) dans lequel un tétraside est flanqué par le phosphatidylinositol et la phosphoéthanolamine, selon la formule suivante : éthanolamine-PO<sub>4</sub>-6Man(α1,2)Man(α1,6)Man(α1,4)GlcNH<sub>2</sub>α1-6inositol-1-PO<sub>4</sub>-lipide. L'éthanolamine permet la liaison au résidu C-terminal de la protéine via une réaction d'amidification. Des variations spécifiques de l'espèce ou du tissu existent pour les substitutions et la partie lipidique.

Révélee pour les VSG de trypanosomes (Masterson *et al.*, 1989), la voie de biosynthèse des GPI consiste en un transfert séquentiel d'oses sur le groupe PI lié à la membrane du RE. L'ancre complète est ensuite attachée à l'extrémité C-terminale d'une protéine nouvellement synthétisée par action d'un complexe transamidase (Udenfriend et Kodukula, 1995). Toute protéine destinée à recevoir une ancre GPI contient, outre le peptide signal N-terminal pour l'entrée dans le RE, une séquence signal GPI caractérisée par une succession de 12 à 20 résidus hydrophobes proche de l'extrémité C-terminale. Après clivage, cette séquence est remplacée dans le RE par le précurseur GPI.

### 3.2.3.2. C-mannosylation

Découverte dans la RNase 2 de l'urine humaine (Hofsteenge *et al.*, 1994), la C-mannosylation implique une liaison covalente de type C-C entre le carbone C1 d'un résidu α-Man et le carbone C2 d'un résidu tryptophane (Trp) de la protéine. De nombreux types cellulaires issus de mammifères transfectés avec la RNase 2 sont capables de C-mannosyler cette protéine.



**Figure 16.** Schéma de l'approche expérimentale pour la caractérisation des phosphoglycoprotéines. La structure montre un exemple simple trouvé chez la phosphatase acide de *Leishmania mexicana*. Afin de démontrer la présence potentielle de phosphoglycoprotéines, trois étapes sont nécessaires. (A) Les sucres ne sont ni N ni O liés à la protéine. (B) Les glycanes sont liés par un phosphate. (C) Le phosphate est lié à un acide aminé de la protéine (d'après Haynes, 1998).

Description générale	Exemples
Composition qualitative et quantitative: nature nombre de monosaccharides configuration (stéréoisomérisation absolue) cycle	Man, Glc, Fuc... Ratio 4: 2:1... D ou L Pyranose ou furanose
Configuration des liaisons (anoméricité)	$\alpha$ ou $\beta$
Position des liaisons (substitutions et points de branchement)	(1-2), (1-4)...
Séquence des oses	$\text{Man}\alpha(1-4)\text{Man}\beta(1-4)\text{GlcNAc}...$
Nature, nombre et localisation des groupements non sucrés	Sulfate, acétate, phosphate...

**Tableau 7.** Caractéristiques de structure primaire d'un glycane complexe

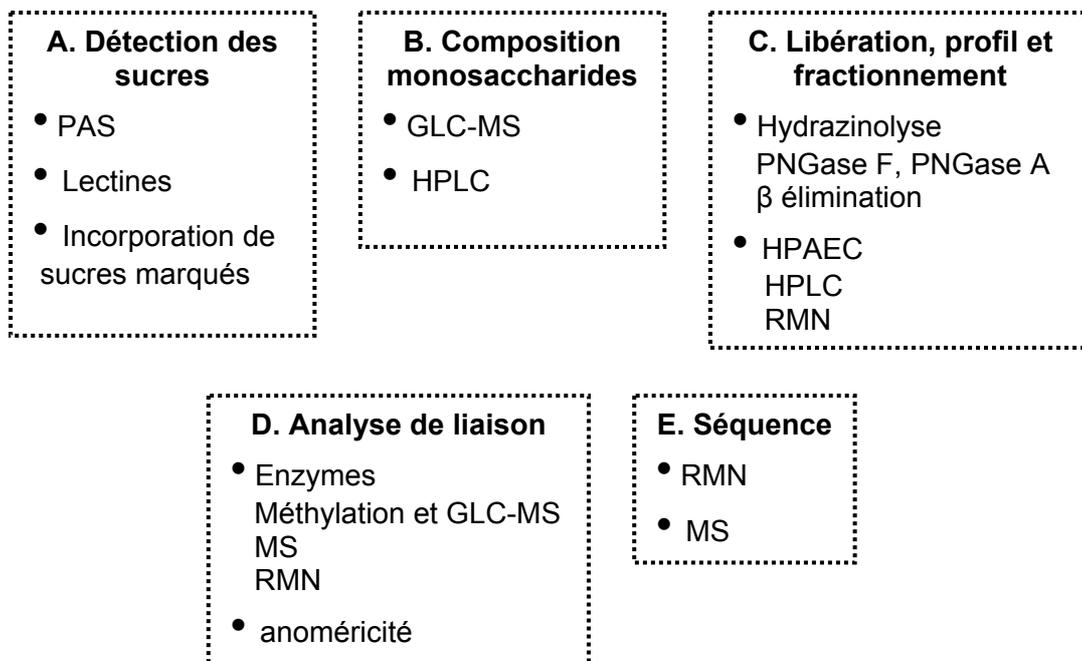
L'interleukine humaine 12, produite dans des cellules CHO a aussi été identifiée comme protéine C-mannosylée (Doucey *et al.*, 1999). La séquence de reconnaissance, Trp-X-X-Trp, où seulement le premier résidu tryptophane est modifié (Krieg *et al.*, 1998), est présente dans plus de 300 protéines de mammifères dont celles présentant la répétition de type thrombospondine (WXXWXXWXXC). La réaction aurait lieu dans le RE avec Dol-P-Man comme donneur de mannose (Doucey *et al.*, 1998).

### 3.2.3.3. Phosphoglycosylation

Certaines glycoprotéines contiennent un ou plusieurs résidus sucrés liés à Ser/Thr *via* une liaison phosphodiester, la modification ayant été nommée phosphoglycosylation (Mehta *et al.*, 1996). La cystéine-protéase I du myxomycète *Dictyostelium discoideum*, a fourni le premier exemple connu, cette protéine lysosomale présentant l'association GlcNAc -1-P-Ser localisée au niveau de domaines sérine-riches (Gustafson et Milner, 1980). L'enzyme responsable, la GlcNAc :Ser-protéine N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase, diffère de l'enzyme phosphorylant les mannoses terminaux (Man6P) pour l'étiquetage des protéines de lysosomes (Merello *et al.*, 1995). La phosphoglycosylation aiderait à la ségrégation de deux groupes de protéases actives à des pH différents pour assurer une digestion optimale des bactéries ingérées par le myxomycète. *Dictyostelium* effectue aussi une phosphoglycosylation impliquant le fucose (Fuc), sous la forme Fuc $\beta$ -1-P-Ser, dans certaines protéines de type mucine comme les cystéine-protéases lysosomales (Srikrishna *et al.*, 1998).

La phosphoglycosylation n'a pas été retrouvée chez les mammifères dont les cystéine-protéases sont dépourvues de domaines riches en sérine. Par contre, elle a lieu chez des protozoaires Kinétoplastidés. Ainsi, les leishmanies synthétisent une famille de glycanes phosphorylés qui sont des polymères d'unités Gal $\beta$ 1-4Man $\alpha$ 1-P et sont O-liés sur Ser à des protéines de type mucine, formant des protéophosphoglycanes (Ilg *et al.*, 1996). Chez les trypanosomes, des glycoprotéines de surface présentent une liaison de type Xyl-1-PO<sub>4</sub> sur Ser/Thr avec une chaîne glucidique de 6 à 7 résidus (Haynes *et al.*, 1996). Une caractéristique commune à toutes les phosphoglycoprotéines est leur pouvoir immunogène élevé mais aucune fonction spécifique n'a été jusqu'alors assignée à la phosphoglycosylation.

Il existe 3 étapes permettant de démontrer la présence de phosphoglycosylation (Figure 16)



**Figure 17. Stratégie pour la caractérisation de la structure des glycanes d'une glycoprotéine.**

**(A)** La présence de sucres est détectée par la méthode à l'acide périodique-Schiff (PAS), l'utilisation de lectines ou bien l'incorporation de sucres radioactifs.

**(B)** Si un ou plusieurs composants de l'échantillon sont glycosylés, la recherche des oses constitutifs comprend les phases suivantes: (1) clivage de toutes les liaisons glycosidiques par hydrolyse acide, (2) fractionnement des oses, (3) détection de chaque ose et quantification du signal. Pour cela, il existe plusieurs méthodes dont la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GLC-MS) et la chromatographie liquide à haute performance ou HPLC.

**(C)** Les glycopeptides sont récupérés par digestion sélective (ex: trypsine) des glycoprotéines puis les glycanes sont libérés. L'hydrazinolysé clive indifféremment les liaisons N- et O-glycosidiques. Les N-glycanes sont libérés de façon spécifique par action d'une enzyme (PNGase A ou PNGase F). Les O-glycanes sont obtenus par β-élimination lors d'un traitement alcalin. Les glycanes sont ensuite séparés par HPLC ou par chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC). Les fractions individuelles peuvent alors être soumises à l'analyse structurale par MS ou résonance magnétique nucléaire (RMN).

**(D)** Pour analyser les liaisons il peut être choisi d'effectuer des digestions par des exoglycosidases suivies d'HPLC, ou une analyse de méthylation avec GLC-MS, ou bien une analyse en MS. L'anomérisation est déterminée par RMN ou par des digestions séquentielles avec des α- et β-exoglycosidases.

**(E)** Les séquences peuvent être identifiées par des approches physicochimiques (RMN, MS).

### 3.2.5. Stratégies pour l'analyse structurale des glycanes

Afin de comprendre pleinement la biologie des glycoconjugués, il est essentiel de connaître la structure de leurs chaînes glucidiques. La diversité naturelle des glycanes rend difficile l'utilisation d'un protocole universel. Une approche flexible est donc nécessaire. Le choix de la stratégie dépend principalement de la quantité et de la pureté des glycanes à analyser. Les paramètres requis pour décrire la conformation d'un sucre sont listés **Tableau 7** et un exemple de stratégie pour la caractérisation de la structure d'un glycanes est présenté **Figure 17**.

### 3.3. La glycosylation chez des protistes parasites

Divers protistes parasites synthétisent des glycanes qui sont requis pour l'invasion de leurs hôtes. Leur stratégie de survie implique fréquemment la participation des glycoconjugués du « cell coat » ou glycocalyx, formant une barrière protectrice contre les agressions externes. La glycobiologie parasitaire est cependant parfois frustrante, car souvent confrontée aux difficultés de culture et/ou de purification de différents stades parasitaires.

L'importance de la glycosylation pendant le cycle des protistes parasites est ici illustrée pour des espèces particulièrement pathogènes chez les humains et appartenant à cinq genres différents (**Tableau 8**):

- les genres *Trypanosoma* et *Leishmania*, assignés à un groupe de Flagellés Kinétoplastidiés possédant un seul flagelle locomoteur et ayant souvent des insectes comme hôtes intermédiaires,
- les genres *Plasmodium* et *Toxoplasma*, parasites intracellulaires formant des spores et représentatifs du grand phylum Apicomplexa,
- le genre *Giardia*, au sein des Flagellés Diplomonadines, considéré comme une lignée eucaryote ancienne (Lloyd et Harris, 2002).

#### 3.3.1. *Trypanosoma*

Deux trypanosomes ont retenu fortement l'attention : *Trypanosoma brucei*, agent de la nagana du bétail et de la maladie du sommeil chez l'Homme (*T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*), sur le continent africain, et *Trypanosoma cruzi*, causant la maladie de Chagas sur le continent sud-américain.

<b>Parasites</b>	<b>Glycoconjugués</b>
<i>Trypanosoma brucei</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>	VSG PARPs Mucines-like GIPLs LPPG O-GlcNAc N-glycosylation
<i>Leishmania</i>	LPG GIPLs GP63 sAP avec N- et O-glycosylation PPG Phosphoglycanes
<i>Toxoplasma</i>	N-glycosylation O-glycosylation: O-GalNAc GPI
<i>Plasmodia</i>	N-glycosylation ? O-glycosylation: O-GlcNAc, O-GalNAc ? GPI
<i>Giardia</i>	Complexes protéiques GalNAc & GalN VSP N-glycosylation ? O-glycosylation ?

**Tableau 8. Différents types de glycoconjugués chez quelques parasites protozoaires.**

Le trypanosome africain *T. brucei* est transmis entre les hôtes mammifères par la mouche tsé-tsé ou glossine. Au cours de son cycle évolutif, il passe de la forme trypomastigote répliquative présente dans la circulation sanguine de l'hôte mammifère à la forme trypomastigote procyclique, puis épimastigote (forme non infectieuse) rencontrée dans l'intestin de l'insecte. Celle-ci est convertie en forme infectieuse, le trypomastigote métacyclique, dans ses glandes salivaires. Pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, la forme trypomastigote a développé un mécanisme de variation antigénique spectaculaire qui implique l'expression séquentielle de glycoprotéines de surface variables antigéniquement distinctes (McCulloch, 2004; Pays *et al.*, 2004). Ces VSG liées à la membrane plasmique par leur ancre GPI (Ferguson *et al.*, 1988), recouvrent d'un manteau homogène et dense la surface du parasite, la masquant ainsi au système immunitaire (Ferguson, 1997). Ce sont des protéines dimériques, chaque monomère portant au moins un site de N-glycosylation occupé par des N-glycanes de type complexe ou riches en mannose (Ferguson, 1997; Ferguson, 1999; Mehlert *et al.*, 1998; Zamze *et al.*, 1991). Cependant, d'après Samuelson *et al.* (2005), *T. brucei* ne posséderait aucune enzyme de N-glycosylation du RE et serait donc incapable de synthétiser les précurseurs Dol-P-oligosaccharidiques. La surface de la forme procyclique est caractérisée par des glycoprotéines acides, à ancre GPI, appelées procyclines ou PARP (« Procyclic Acidic Repetitive Proteins »). Quelques membres sont N-glycosylés et présentent un seul type de glycane de la forme Man<sub>5</sub>GlcNac<sub>2</sub> (Treumann *et al.*, 1997). Les chaînes oligosaccharidiques serviraient de ligands aux lectines dans l'intestin de la glossine. (Mehlert *et al.*, 1998).

Le trypanosome sud-américain *T. cruzi*, est transmis au mammifère par une piqûre de réduve ou triatome (insecte hématophage) laquelle est accompagnée de déjections (auto-infestation) contenant les parasites et son cycle de vie est semblable à celui de *T. brucei*. Le trypanosome se multiplie à l'intérieur de la cellule-hôte sous forme amastigote qui se transforme en trypomastigote dans la circulation sanguine puis en épimastigote dans l'intestin de l'insecte, et enfin en trypomastigote métacyclique, dans ses glandes salivaires.

Il présente un revêtement dense et continu composé d'une couche de glycosylinositolphospholipides (GIPL), de structures pratiquement analogues aux GPI mais dépourvus de phosphoéthanolamine. Ces GIPL renferment des quantités importantes de Gal, GlcNac et acides sialiques. Une famille de glycoprotéines GPI-ancrées possède des caractéristiques semblables aux mucines. Ces protéines « mucin-like » montrent également une glycosylation de type O-GlcNac avec une extension de 1 à 5 résidus Gal (Acosta-Serrano



*et al.*, 2001; Schenkman et Eichinger, 1993) qui sont des accepteurs majeurs d'acides sialiques issus des glycoconjugués de l'hôte (Schenkman et Eichinger, 1993). Ces résidus joueraient un rôle critique dans l'attachement du trypomastigote à la surface cellulaire et la protection du parasite (Pereira-Chioccola *et al.*, 2000). La surface cellulaire de la forme épimastigote de *T. cruzi* est majoritairement recouverte d'un lipopeptidophosphoglycane (LPPG), membre de la famille des GPI composé d'un glycane lié à un phosphocéramide-inositol par l'intermédiaire de GlcN (Previato *et al.*, 1990).

### 3.3.2. *Leishmania*

Les leishmanies provoquent chez l'Homme des lésions viscérales (cas de *Leishmania donovani*, agent du kala-azar en Afrique et Asie) ou cutanées (*L. tropica* en Asie, *L. mexicana* en Amérique Centrale et du Sud, *L. infantum* en France...). Leurs formes flagellées libres dans l'intestin des mouches-vecteurs sont appelées promastigotes extracellulaires. Après introduction dans le sang d'un mammifère, elles donnent des formes intracellulaires non flagellées ou amastigotes qui envahissent les macrophages.

Le promastigote est entouré par un épais glycocalyx composé de lipophosphoglycane (LPG) (Orlandi et Turco, 1987) et de GIPL (McConville et Blackwell, 1991). Couvrant la majeure partie de la surface de cette forme cellulaire, le LPG comprend quatre domaines : une ancre lipidique, un core glycanique, des unités répétées de la forme Gal-Man-PO<sub>4</sub> et un capuchon oligosaccharidique (Turco et Descoteaux, 1992). Il sert de ligand pour des lectines dans l'intestin des mouches et diminue la susceptibilité du parasite aux enzymes digestives. Dans le sang, il protège le promastigote de la lyse médiée par le complément et, dans les macrophages, il inhibe les enzymes hydrolytiques (Turco et Descoteaux, 1992). Les GIPL sont plus abondants à la surface de la forme amastigote. Leurs fonctions sont peu connues, ils interviendraient dans le processus d'invasion des macrophages en se liant à des récepteurs spécifiques du mannose.

GP63 est la principale glycoprotéine de surface des promastigotes. Il s'agit d'une protéase à zinc qui est à la fois GPI-ancrée et N-glycosylée du type riche en mannose (Olafson *et al.*, 1990), type commun à d'autres glycoprotéines de *Leishmania* (Funk *et al.*, 1997). Elle induirait la dégradation de molécules de l'hôte et servirait de ligand pour les récepteurs des macrophages.

Les leishmanies sécrètent une famille de protéines dites sAP (« secreted acid phosphatase ») et des protéophosphoglycans (PPG) qui sont très fortement glycosylés et

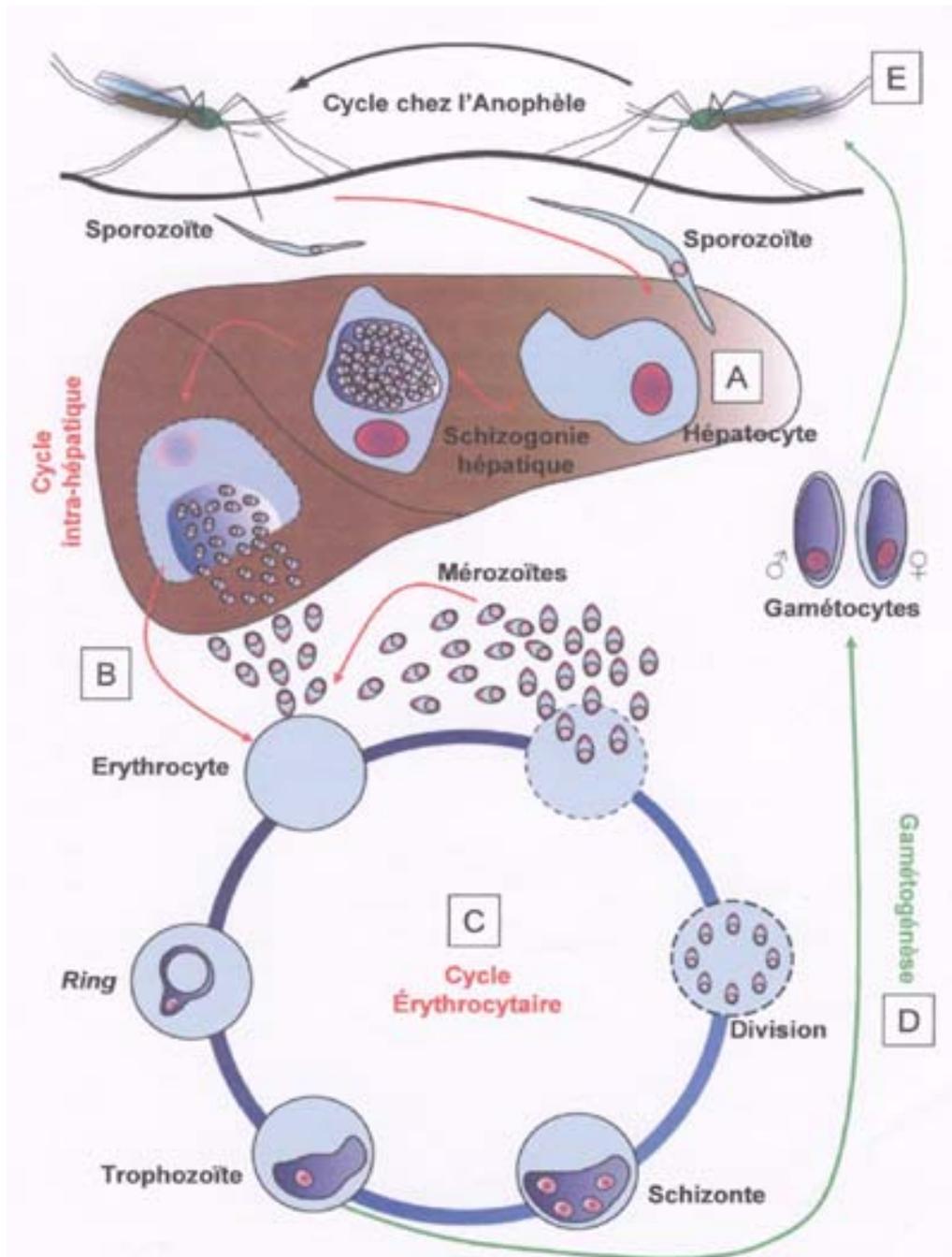


impliqués dans la virulence du parasite. Les sAP sont sécrétées à partir de la poche flagellaire des parasites et sont modifiées par N- et O-glycosylation (Ilg *et al.*, 1994). Les PPG identifiés dans la forme promastigote formeraient un gel capable de protéger le parasite dans l'intestin de la mouche (Ilg *et al.*, 1996). Dans la forme amastigote, ils participeraient à la liaison aux cellules-hôtes et influenceraient la biologie du macrophage infecté en contribuant, par exemple, à la formation de la vacuole parasitophore pour *L. mexicana* (Peters *et al.*, 1997).

### 3.3.3. *Toxoplasma*

Ce genre est représenté par l'espèce *Toxoplasma gondii*, parasite intracellulaire obligatoire, dont le cycle hétéroxène se déroule entre un hôte définitif féliné (principalement le chat) et un ou plusieurs hôtes intermédiaires mammifères (dont l'homme, impasse parasitaire). Une phase de multiplication asexuée (mérogonie) puis sexuée (gamogonie) chez l'hôte définitif, aboutit à la formation d'oocystes contenant chacun 4 sporozoïtes et à leur élimination dans le milieu extérieur. Chez l'hôte intermédiaire, se déroule une phase de multiplication asexuée des tachyzoïtes, contenue dans une vacuole parasitophore dans le cytoplasme de l'hôte, puis des bradyzoïtes conduisant à la formation de kystes tissulaires, formes de résistance et de dissémination. Le passage du parasite entre les hôtes se fait par ingestion des oocystes présents dans le milieu extérieur ou des kystes tissulaires. La variété d'hôtes (Vertébrés) et de tissus que *T. gondii* est capable d'infecter serait due à sa capacité de se lier à multiples GAG (Carruthers *et al.*, 2000).

La première preuve de N-glycosylation chez *T. gondii* a été apportée par la découverte de 4 structures N-liées, dépourvues d'acide sialique et de fucose, sur la glycoprotéine gp23 du stade tachyzoïte (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993). L'un des 5 antigènes majeurs de surface, SAG1 (p30), présente un site potentiel de N-glycosylation qui est inoccupé chez le parasite (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993) mais qui devient actif après expression hétérologue dans des cellules CHO (Kim *et al.*, 1994). Une forme de O-glycosylation *via* GalNAc, limitée à des mono- et disaccharides, a été identifiée dans l'antigène de granule dense, GRA2, du stade tachyzoïte (Zinecker *et al.*, 1998). Plusieurs enzymes de la famille UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransférase (ppGalNAc-T), capables de catalyser les premières étapes de cette glycosylation de type mucine, ont été caractérisées (Stwora-Wojczyk *et al.*, 2004). Les protéines majeures de la surface du tachyzoïte sont GPI-ancrées. Celles-ci sont similaires à celles du trypanosome africain mais elles présentent des branches



*Figure 18. Cycle de développement asexué de Plasmodium falciparum à l'intérieur de son hôte humain.*

Glc-GalNAc sur le coeur mannose (Tomavo *et al.*, 1989), qui semblent requises pour l'immunogénicité (Striepen *et al.*, 1997).

### 3.3.4. *Plasmodium*

La malaria, l'une des plus sévères infections parasitaires sur notre planète, est causée par des parasites du genre *Plasmodium* dont l'espèce la plus virulente chez l'Homme est *P. falciparum*. Son cycle fait intervenir une alternance de phases sexuées chez le moustique Anophèle et asexuées chez l'Homme (**Figure 18**). Durant l'invasion, des éléments de la surface parasitaire reconnaissent des déterminants glucidiques à la surface des cellules-hôtes, par exemple l'héparane sulfate sur les hépatocytes (Pancake *et al.*, 1992) et des acides sialiques sur les érythrocytes (Stubbs *et al.*, 2005). Il ne fait aucun doute que le parasite synthétise aussi des glycoconjugués pouvant être importants dans les processus d'invasion mais leur nature est sujette à controverses.

Bien qu'à l'aide de sucres radiomarqués, Dieckmann-Schuppert *et al.* (1992) n'aient pas réussi à détecter les N-glycanes dans les stades intraérythrocytaires, Kimura *et al.* (1996) affirme que certains stades du parasite réalisent des N-glycosylations de type riche en mannose et hybride, cruciales chez stades intraérythrocytaires pour la maturation du stade anneau en stade méronite. Pour Gowda *et al.* (1997), la fréquence de N-glycosylation serait seulement d'une chaîne glucidique pour 20-40 molécules protéiques. Toutefois, les activités de plusieurs glycosyltransférases golgiennes (sialyltransférase, N-acétylglucosaminyltransférase et galactosyltransférase) n'ont pu être démontrées, suggérant l'absence de la machinerie de N-glycosylation (Schauer *et al.*, 1984). Certaines protéines dont la protéine MSP-1, antigène majeur de surface, montrent des sites potentiels de N-glycosylation. Bien que MSP-1 puisse être glycosylée par des structures riches en mannose dans des systèmes hétérologues (Longacre *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1999) elle ne semble pas l'être chez *Plasmodium* (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1992; Gowda *et al.*, 1997). Cette apparente incapacité ne peut s'expliquer par celle de la production de nucléotide-oses comme UDP-GlcNAC ou GDP-Man puisque ces composés sont utilisés dans la formation des ancres GPI par le parasite (Braun-Breton C. *et al.*, 1990; Gerold *et al.*, 1994; Gowda *et al.*, 1997). Des analyses bioinformatiques du génome de *P. falciparum* ont prédit seulement 4 gènes pour la N-glycosylation, les enzymes codées ne permettant que la modification GlcNAC sur l'asparagine (Aravind *et al.*, 2003; Samuelson *et al.*, 2005).



Les opinions divergent également au sujet de la O-glycosylation chez *P. falciparum*. Durant les années 1990, plusieurs études assimilèrent la O-glycosylation à la forme majeure de glycosylation dans les stades intra-érythrocytaires, en montrant la présence de O-GlcNAc et d'oligosaccharides à GlcNAc terminal (Dayal-Drager *et al.*, 1991; Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1993; Nasir ud Din *et al.*, 1992) ainsi qu'en détectant des activités GlcNAc et GalNAc transférases (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1993). Le parasite effectuerait aussi une glycosylation de type O-GalNAc (Nasir ud Din *et al.*, 1992). La protéine MSP-1 serait modifiée par O-GlcNAc (Hoessli *et al.*, 2003) tandis que MSP-2 serait substituée par O-GlcNAc ou O-GalNAc (Khan *et al.*, 1997). Il faut cependant souligner que certains résultats sont critiquables sur deux points majeurs : (1) la discrimination entre les molécules de *Plasmodium* et celles de cellules sanguines riches en O-GlcNAc n'est pas assez fiable, (2) les glucides provenant des ancrés GPI ont rarement été pris en compte. Ainsi, Gowda *et al.* (1997) concluent à l'absence de modifications de type O-GlcNAc et O-GalNAc dans tous les stades de développement parasitaires. D'après Berhe *et al.* (2000) sur la base de traitements enzymatiques et chimiques ainsi que de liaisons lectines, les protéines du mérozoite MSP-1 et MSP-2 ne présenteraient ni N- ni O-glycanes. Aucune enzyme caractéristique de la synthèse des O-glycanes n'est prédite dans le génome de *P. falciparum* (Aravind *et al.*, 2003).

Par contre, la glypiation est très active chez *Plasmodium*. Il a été clairement montré que des protéines importantes des stades intra-érythrocytaires sont GPI-ancrées : sérine protéase p76 (Braun-Breton *et al.*, 1988), antigènes de surface MSP-1 et MSP-2 (Gerold *et al.*, 1996), antigènes 55-kDa de rhoptrie (Smythe *et al.*, 1988b). Similaire à celle d'autres protozoaires, la structure des ancrés GPI de *Plasmodium* affiche une exception au niveau de son inositol-phosphate (acylation) (Gerold *et al.*, 1999). La présence de GPI peut être reliée à la pathologie (Naik *et al.*, 2000). Durant l'invasion des érythrocytes, les mérozoïtes relarguent une protéine membranaire à ancre GPI de 45 kDa ainsi que des glycolipides probablement aussi GPI ancrés qui vont perforer la membrane des érythrocytes (Smythe *et al.*, 1988b). Notons que *Plasmodium* synthétise également des GPI libres qui sont structurellement différents et capables d'augmenter l'expression des molécules d'adhérence de l'hôte (Schofield *et al.*, 1996).



### 3.3.5. *Giardia*

La Diplomonadine *Giardia intestinalis* est un agent étiologique de diarrhées à travers le monde entier. Le trophozoïte, forme flagellée, se divise activement et colonise l'intestin de nombreux hôtes mammifères en s'accrochant à la surface de l'épithélium au moyen d'un disque ventral aplati. Certains trophozoïtes s'encystent puis les kystes matures sont rejetés dans les excréments et peuvent survivre jusqu'à introduction dans un nouvel hôte.

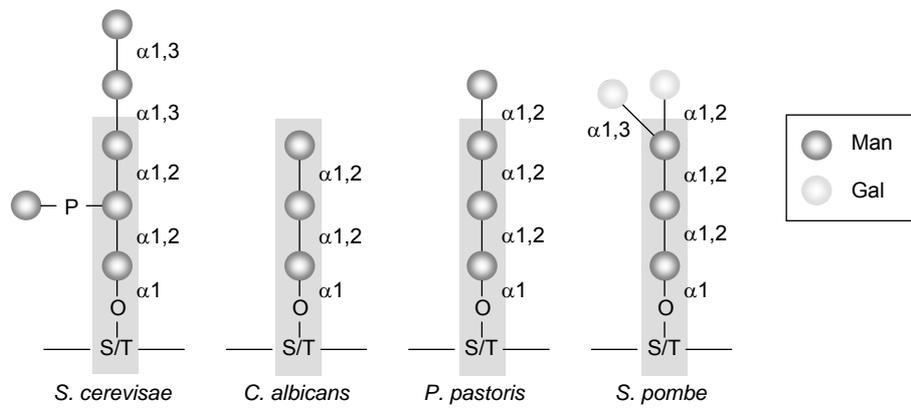
Longtemps supposée chitineuse, l'épaisse paroi de la forme kystique de *Giardia* est en fait surtout composée de complexes glycoprotéiques à base de GalN et GalNAc, mais dont la structure précise est inconnue (Gerwig *et al.*, 2002). Bien qu'ayant un site potentiel de N-glycosylation, aucune étude n'a démontré la présence d'oligosaccharides sur les protéines de paroi dites CWP-1 et CWP-2 (Lujan *et al.*, 1997). La présence de GalNAc, Gal, des enzymes GalN et GalNAc transférases et d'un important ratio de résidus Ser et Thr suggèrent une éventuelle O-glycosylation des protéines (Das et Gillin, 1996).

La surface du trophozoïte présente un revêtement dense composé d'une famille de protéines de surface variables, les VSP (Nash, 1992). Ces protéines O-glycosylées sont principalement impliquées dans la résistance aux protéases de l'intestin et, comme les VSG de trypanosomes, elles induisent un mécanisme d'échappement par variation antigénique (Svard SG *et al.*, 1998). Leurs courtes chaînes di- ou trisidiques contiennent du GlcNAc et du Glc à l'extrémité réductrice (Papanastasiou *et al.*, 1997). Les VSP étant extrêmement abondantes, la O-glycosylation serait prépondérante chez *Giardia* (Hiltpold *et al.*, 2000). Un antigène de surface a été reconnu GPI-ancré (Das *et al.*, 1991).

Récemment, Morelle *et al.* (2005) ont fait part de la présence de N-glycanes de type complexe dans les protéines excrétées par le trophozoïte de *G. intestinalis*, mais selon Robbins et Samuelson (2005), il s'agirait de contaminants issus du milieu de culture. L'analyse du génome montre que *Giardia* ne possède pas tous les gènes nécessaires à la synthèse des N-glycanes et ne pourrait alors pas former l'intermédiaire Dol-P-GlcNAc<sub>2</sub> (Samuelson *et al.*, 2005).

## 3.4. La glycosylation chez des champignons

L'étude des levures-modèles offre une variété d'approches biologiques, génétiques et moléculaires qui ont permis la caractérisation des voies de glycosylation. La majorité des données ci-dessous font référence à *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figure 19. Représentation schématique des différentes formes de O-mannosylation chez les levures.** Les O-mannosyl glycanes sont de taille variable. Le core  $(Man)_{0-2}Man-Ser/Thr$  (boite grise) est commun à toutes les levures étudiées (d'après Willer et al, 2003).

### 3.4.1. Les différentes voies de glycosylation

Les levures présentent trois types de glycosylation : la N-glycosylation, la O-glycosylation et l'attachement d'ancres GPI. Les glycoprotéines prédominantes de *S. cerevisiae* sont des composants de la paroi cellulaire, incluant des mannoprotéines fortement N- et O-glycosylées.

Les protéines N-glycosylées sont retrouvées dans les compartiments cytoplasmiques usuels (RE, Golgi et vacuole) et au niveau de la membrane plasmique. Les étapes initiales de la N-glycosylation dans le RE restent communes à celles de la plupart des Eucaryotes. Par contre, les étapes tardives diffèrent : formation d'un core oligosaccharidique de type Man<sub>8</sub>-<sub>13</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, addition de structures souvent riches en mannose ou galactose et résidus mannoses ajoutés dans le Golgi directement à partir du GDP-Man (Herscovics et Orlean, 1993). Une seule forme de O-glycosylation a été détectée : la O-mannosylation. De nombreuses glycoprotéines de levure présentent des ancres GPI (Conzelmann *et al.*, 1990). La structure GPI est similaire à celle rencontrée dans les glycoprotéines de trypanosomes et de mammifères, la seule différence étant la présence d'un céramide dans la partie lipidique (Conzelmann *et al.*, 1992).

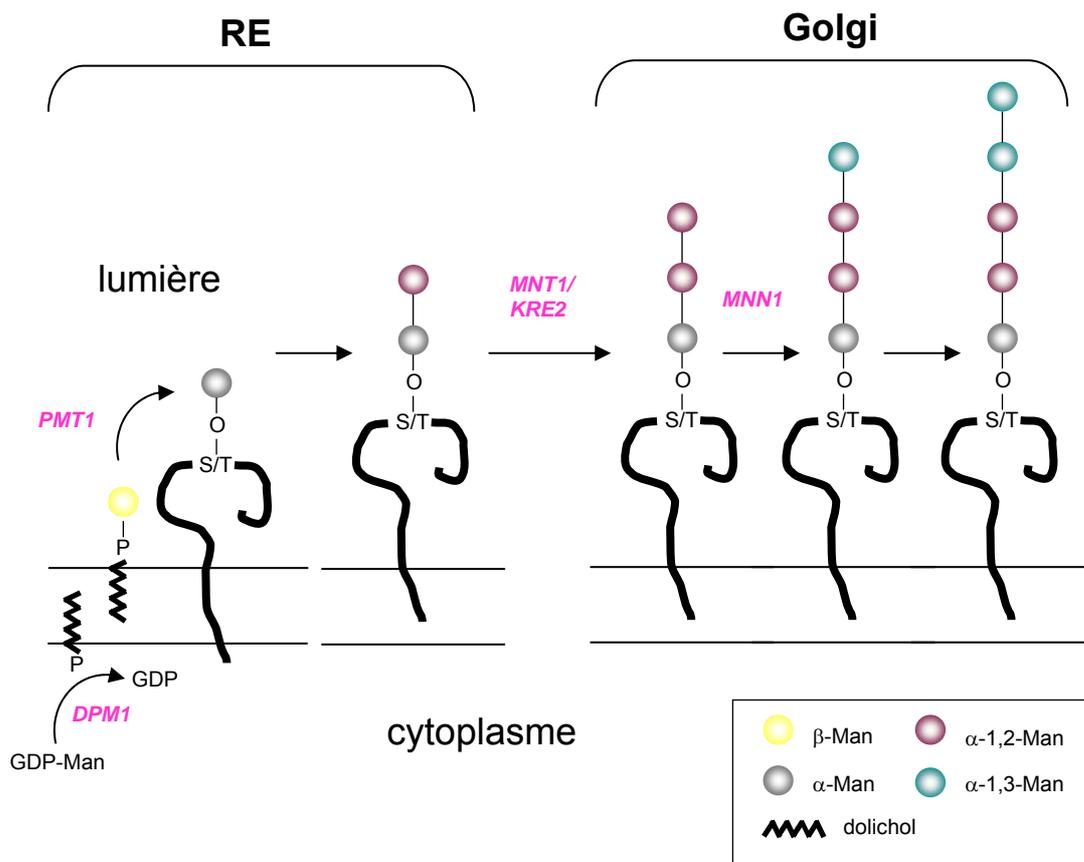
### 3.4.2. Cas de la O-mannosylation

#### 3.4.2.1. Structure des glycanes (Gemmill et Trimble, 1999)

Les chaînes sont courtes mais peuvent être très nombreuses sur une même protéine. Chez divers champignons étudiés, le mannose de l'extrémité réductrice est lié en  $\alpha$  sur Ser ou Thr, puis deux résidus Man sont ajoutés pour former le triose Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man-Ser/Thr. Toutefois, *S. cerevisiae* se distingue par l'addition de Man en  $\alpha$ 1,3 pour donner des courts pentasaccharides linéaires qui peuvent être modifiés par un groupement phosphate. Chez *Candida albicans* et *Pichia pastoris*, les oligomannoses présentent des liaisons  $\alpha$ 1,2 mais sont de taille variable (jusqu'à 7 Man chez *C. albicans*). Chez *Schizosaccharomyces pombe*, l'attachement d'un ou deux résidus Gal conduit à des oligosaccharides ramifiés (**Figure 19**).

#### 3.4.2.2. Etapes de biosynthèse chez *S. cerevisiae*

C'est chez *S. cerevisiae* que la biosynthèse des O-mannosyl-glycanes a été la mieux étudiée. Soulignons tout d'abord que la Dol-P-Man synthase (Haselbeck, 1989), localisée dans le RE et orientée vers le cytoplasme, est codée par le gène *dpm1* essentiel à la viabilité (Orlean *et al.*, 1988), et participe aux trois types de glycosylation. Le Dol-P-Man est en effet le



**Figure 20.** *Attachement et extension des chaînes O-mannosylées. Le GDP-Man est le donneur de tous les résidus mannoses sauf pour la première réaction (d'après Herscovics et Orlean, 1993).*

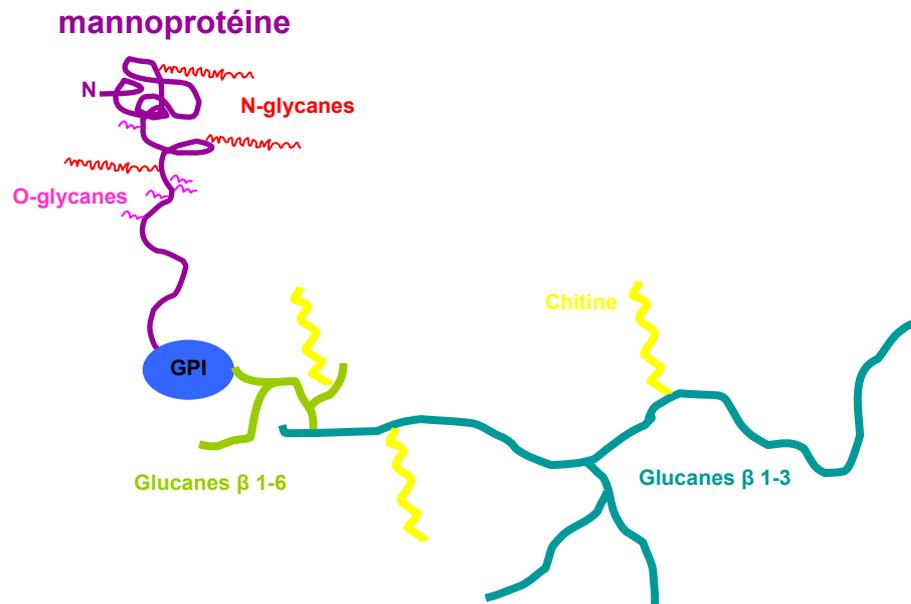
précurseur du premier Man O-lié à une protéine, comme celui des 4 derniers Man du coeur N-glycanique et celui des Man requis pour la glypiation (Orlean, 1990).

La O-mannosylation débute dans le RE par intervention d'une famille d'enzymes PMT (Gentzsch et Tanner, 1996), identifiée sur la base des homologies de séquence avec ScPmt1, la première Dol-P-Man: protein O-mannosyltransférase purifiée chez *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1993). Ces enzymes catalysent le transfert du résidu mannose du Dol-P-Man, en inversant sa configuration, à un résidu Ser ou Thr d'une protéine. Une liaison O- $\alpha$ Man est formée (**Figure 20**). Les déterminants pour la sélection des Ser et Thr qui subiront la mannosylation sont encore inconnus. Sans aucune similarité avec les autres familles de glycosyltransférases, la famille PMT compte 7 membres chez *S. cerevisiae* répartis dans 3 sous-familles: PMT1, PMT2 et PMT4. Des différences entre PMT1/PMT2, d'une part, et PMT4, d'autre part, concernent la formation de complexes dimériques et la spécificité de substrat. Les membres de PMT1 (ScPmt1 et ScPmt5) s'apparient avec ceux de PMT2 (ScPmt2 et ScPmt3) alors que l'unique représentant de PMT4 (ScPmt4) forme un complexe homomérique. Des protéines-substrats distinctes seraient reconnues *in vivo* par les complexes PMT1/PMT2 et PMT4/PMT4 (Gentzsch et Tanner, 1997). Des complexes ScPmt1/ScPmt2 et ScPmt4/ScPmt4 se sont cependant révélés capables d'agir *in vitro* sur un même substrat protéique, mais la spécificité résiderait au niveau de domaines différents (Ecker *et al.*, 2003). Des gènes orthologues ont été clonés chez *C. albicans* (CaPMT1-2 et CaPMT4-6) (Ernst et Prill, 2001), et *S. pombe* (oma1+, oma2+ et oma4+) (Willer *et al.*, 2005).

Après achèvement de la traduction dans le RE, la protéine liée au premier résidu mannose est transférée dans l'appareil de Golgi. Le GDP-Man va alors servir de donneur de mannose pour l'élongation du glycan. Deux familles enzymatiques sont impliquées : des  $\alpha$ 1,2 mannosyltransférases de la famille KTR (9 membres) et des  $\alpha$ 1,3 mannosyltransférases de la famille MNN1 (6 membres) (Lussier *et al.*, 1999). Trois membres de la famille KTR (Ktr1p, Ktr3p et Mnt1p/Kre2) sont responsables du transfert du second et du 3<sup>ème</sup> Man liés en  $\alpha$ 1,2 (Lussier *et al.*, 1997). Les 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> Man sont finalement liés en  $\alpha$ 1,3 grâce à Mnn1p de la famille MNN1. La diversité des mannosyltransférases est aussi en partie justifiée par la biosynthèse des chaînes N-glycaniques.

### 3.4.2.3. Importance biologique

Chez *S. cerevisiae*, la O-mannosylation des protéines est essentielle pour la viabilité car requise pour la croissance et la multiplication cellulaires ainsi que pour la rigidité de la paroi (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). La paroi des formes végétatives de *S. cerevisiae* est une



*Figure 21. Relations entre les composants de la paroi végétative de S. cerevisiae. Modèle hypothétique avec les composants colorés individuellement. Le polypeptide de la glycoprotéine mannosylée est en violet, les chaînes N et O oligosaccharidiques en rouge et rose, respectivement. Il est rattaché au réseau de glucanes par l'intermédiaire d'un reste d'ancre GPI. Les polymères de chitine peuvent être attaché aux deux types de glucanes. Ne sont représentés que quelques points de branchement des glycanes (d'après Lipke et Ovalle, 1998).*

structure d'environ 200 nm d'épaisseur (Klis *et al.*, 2002), globalement composée de 60% de glucane, 40% de mannoprotéines, et 1% de chitine. Sa structure présente deux feuillets dont les différents composants sont ensuite reliés entre eux par des glucanes branchés en  $\beta$ 1,6 (Kollar *et al.*, 1997; Lipke et Ovalle, 1998) (**Figure 21**):

- une couche fibreuse interne composée de glucanes liés en  $\beta$ 1,3 et de chitine
- une couche de polymères de mannose appelés mannanes qui sont liés de façon covalente à des protéines de haut poids moléculaire ou mannoprotéines (Osumi, 1998).

En réponse à la privation de nutriments, les levures forment un stade quiescent capable de survivre dans le milieu extérieur, la spore. La résistance est principalement apportée par un épais manteau, la paroi sporale. Chez *S. cerevisiae*, il s'agit d'une matrice extracellulaire stratifiée complexe comprenant 4 couches distinctes (Coluccio *et al.*, 2004). Les deux couches les plus internes sont similaires à celles de la cellule végétative mais en position inversée, les deux plus externes étant :

- une couche principalement composée de chitosan, un polymère de glucosamine issu de la désacétylation de la chitine, qui va contribuer à l'insolubilité des fibres (Briza *et al.*, 1988).
- la couche la plus externe constituée de dityrosine, dimère de molécules de tyrosine (Briza *et al.*, 1986).

La paroi végétative du pathogène *C. albicans* présente des constituants et une organisation similaires à celles de *S. cerevisiae* (Kapteyn *et al.*, 2000). Chez ce champignon commensal qui peut être pathogène, les phénomènes de glycosylation sont pleinement impliqués dans l'adhésion cellulaire et la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Chaffin *et al.*, 1998).

Un défaut de O-mannosylation peut aussi affecter la stabilité, la localisation et/ou les fonctions propres de protéines individuelles (Sanders *et al.*, 1999; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). De plus, une O-mannosylation aberrante interférerait avec le transport rétrograde des protéines mal repliées dans le RE (Harty *et al.*, 2001) et, un rôle possible dans l'initiation de la N-glycosylation a été suggéré (Ecker *et al.*, 2003). Chez *C. albicans*, une réduction de la O-mannosylation (mutants de PMT), provoque des défauts de morphogénèse, une diminution d'adhérence aux cellules-hôtes et de résistance à certains fongicides, et une atténuation marquée de la virulence dans des systèmes murins (Ernst et Prill, 2001; Prill *et al.*, 2005).

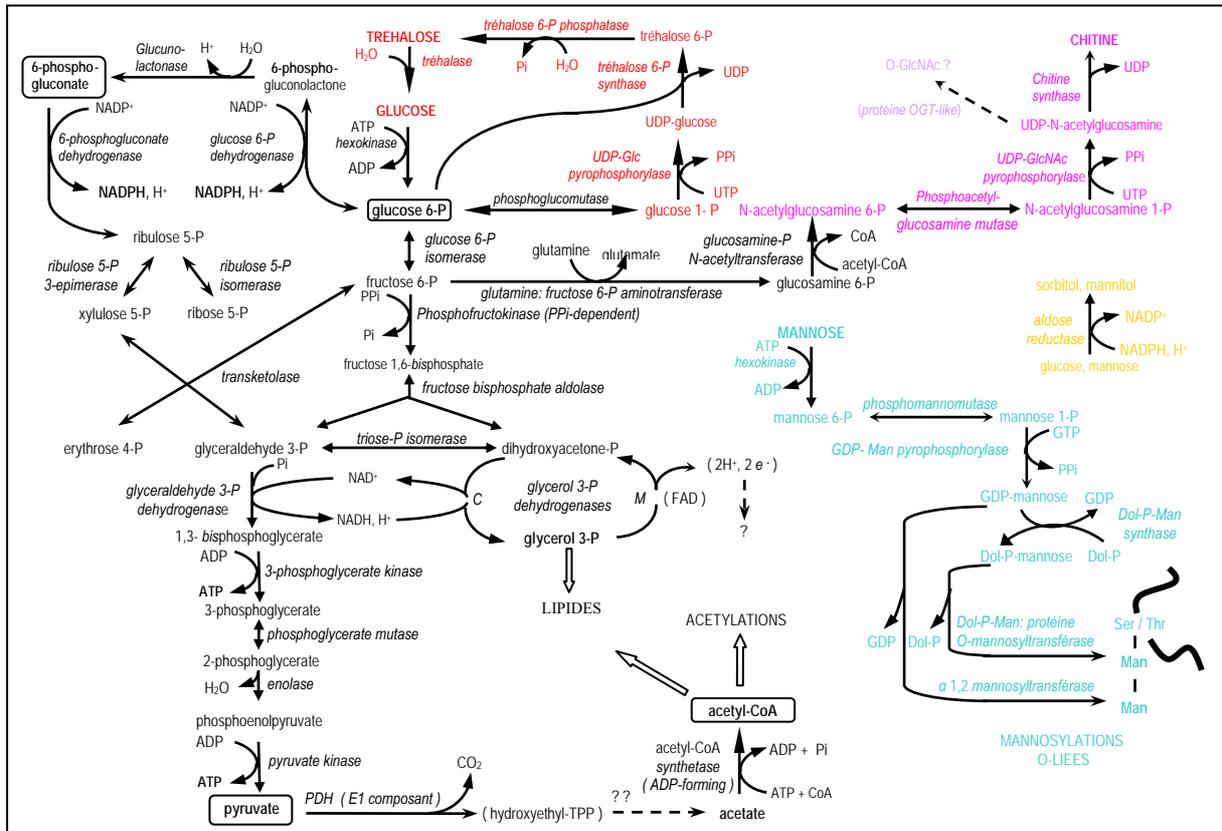


Figure 22. Métabolisme des glucides prédit chez *E. cuniculi* (d'après Vivarès et Méténier, 2004).

### 3.5. Données sur la glycobiologie des Microsporidies

Très peu de choses sont actuellement connues concernant la diversité des sucres et les modes de glycosylation chez les microsporidies. *E. cuniculi* montre une simplification considérable de son métabolisme, la plupart des réactions concernant les sucres sont indiquées **Figure 22**.

#### 3.5.1. Particularités cytologiques du système endomembranaire

Le RE associé à des ribosomes est facilement reconnaissable dans tous les stades de développement des microsporidies, le nombre d'éléments lamellaires augmentant durant la sporogonie. Par contre, l'appareil de Golgi est atypique. Aucune pile de saccules caractéristique d'un dictyosome n'est observée. Les compartiments golgiens semblent être dispersés dans le cytoplasme des mérontes, comme c'est le cas chez la levure *S. cerevisiae* (Nakano, 2004). Le déroulement de la sporogonie est associé à l'apparition d'un réseau tubulo-vésiculaire qui augmente de volume et qui contribue à la biogenèse de trois structures intrasporales majeures : tube polaire, polaroplaste et vacuole postérieure (Bigliardi et Sacchi, 2001). La présence de compartiments golgiens *cis* et *trans* dans ce réseau a été suggérée par la détection cytochimique des activités thiamine pyrophosphatase et nucléoside diphosphatase chez *Glugea stephani* (Takvorian et Cali, 1994; Takvorian et Cali, 1996) et *Nosema grylli* (Sokolova *et al.*, 2001). Une structure référencée comme un "multilayered interlaced network" et participant à l'épaississement de la surface cellulaire des spores et des sporoplasmes de *Brachiola algerae*, pourrait être d'origine golgienne (Cali *et al.*, 2002).

#### 3.5.2. Glucides détectés (Figure 22)

Les études cytochimiques en microscopies photonique et électronique n'ont jamais révélé la présence de particules de glycogène (Vavra, 1972; Vivarès *et al.*, 1976), ce qui est en accord avec l'analyse du génome d' *E. cuniculi* indiquant l'absence de gènes pour les enzymes de biosynthèse et dégradation du glycogène. De plus, ce parasite serait incapable de synthétiser des  $\beta$ 1,3 glucanes comparables à ceux responsables de l'élasticité de la paroi cellulaire chez les champignons. La chitine apparaît comme le polymère glucidique majoritaire chez les microsporidies, son accumulation dans une épaisse couche de la paroi sporale (endospore) contribuant à la rigidité de la spore (Bigliardi *et al.*, 1996; Vavra et Larson, 1999). Les trois enzymes impliquées dans la synthèse de ce polymère de GlcNAc lié en  $\beta$ 1,4 sont codées dans



le génome d'*E. cuniculi* (Katinka *et al.*, 2001) et deux d'entre elles ont été identifiées lors de l'étude du protéome d'*E. cuniculi* (Brosson *et al.*, 2006). Une protéine de type polysaccharide déacétylase a récemment été mise en évidence au niveau de l'endospore de cette espèce et pourrait transformer la chitine en chitosan, polymère plus rigide (Brosson *et al.*, 2005).

Des analyses de glucides extraits en milieu aqueux à partir de spores provenant de différentes espèces, ont montré la présence de quelques oses et de sorbitol mais surtout la prépondérance d'un diholoside non réducteur, le tréhalose (Undeen et Vander Meer, 1999). Deux enzymes-clés du métabolisme du tréhalose ont été retrouvées dans le protéome sporal d'*E. cuniculi* (Brosson *et al.*, 2006). L'hydrolyse de ce composé en deux molécules de glucose pourrait être à l'origine de l'augmentation rapide de pression osmotique intrasporale, requise pour la dévagination du tube polaire chez les espèces aquatiques (Undeen et Vander Meer, 1999). D'après une étude sur les variations de la teneur en sucres et de l'activité tréhalase chez *Nosema grylli*, le tréhalose serait la principale réserve d'énergie, au moins chez les espèces terrestres (Dolgikh et Semenov, 2003). Une implication dans la protection de la spore contre la dessiccation ou le gel, a aussi été envisagée (Méténier et Vivarès, 2001).

La présence de glycoconjugués a été cytochimiquement vérifiée pour au moins trois types de structures sporales: l'exospore, le capuchon polaire et le tube polaire (Desportes-Livage *et al.*, 1996; Vivarès *et al.*, 1976). Le capuchon polaire ou complexe « sac polaire-disque d'ancrage » est le plus fortement marqué par le test PATAg (Periodic Acid-Thiocarbohydrazide-Ag proteinate) chez *Stempellia* (Vavra, 1972). Après application de différentes lectines à des transferts de profils SDS-PAGE de lysats sporaux de *G. plecoglossi*, la réactivité de plusieurs bandes avec la ConA indiquait la prépondérance du mannose dans les glycoprotéines (Kim *et al.*, 1999). La liaison à la ConA a été ultérieurement démontrée pour quelques protéines définies: les protéines d'exospore SWP1 et SWP2 chez *E. intestinalis* (Hayman *et al.*, 2001) et la protéine de tube polaire PTP1 chez *E. hellem*, (Xu *et al.*, 2004), *E. intestinalis* (Peek *et al.*, 2005), *A. locustae* et *Paranosema grylli* (Polonais *et al.*, 2005). La lectine GNA montre également sa capacité de liaison avec la PTP1 de *N. grylli* (Dolgikh VV et Sokolova YY, Emerg. Pathogens 21st Cent.: 1st United Workshop Microsporidia Invertebrate Vertebrate Hosts, Ceske Budijovice, abstr. 12, 2004), *A. locustae* et *P. grylli* (Polonais *et al.*, 2005). Cependant, aucune réaction positive n'a été observée avec la PTP1 d'*E. hellem* (Xu *et al.*, 2004).

Par contre, une déglycosylation chimique drastique ne semble pas avoir d'effet sur les protéines PTP2, PTP3 et SWP1 d'*E. intestinalis* (Peek *et al.*, 2005), résultat en contradiction

<b>Locus chromosomique</b>	<b>Protéine homologue</b>
ECU01_0650	Phosphoacétylglucosamine mutase (PGM3)
ECU02_1300	Dolichyl-P-Man-protéine O-mannosyltransférase (PMT)
ECU03_0150	Transporteur Golgien de GDP-mannose (VGR4)
ECU03_0340	Phosphomanno(gluco)mutase
ECU04_1060	Dolichyl-P- $\beta$ -D-mannosyl synthase (DPM1)
ECU04_1130	$\alpha$ 1,2 mannosyltransférase (KTR)
ECU05_0260	Phosphomannomutase (PMM1)
ECU06_0950	Dolichyl-P-Man-protéine O-mannosyltransférase (PMT)
ECU07_1280	Glucosamine-fructose 6P aminotransférase
ECU07_1760	Glucosamine-P-N-acétyltransférase
ECU09_1210	Phosphatidylinositol N-acétylglucosaminyltransférase
ECU11_0690	Mannose-1-P-guanylyltransférase
ECU11_1780	UDP-N-acétylglucosamine pyrophosphorylase (UAP1)

**Tableau 8. Gènes potentiellement impliqués dans la voie de synthèse des hexosamines et la glycosylation des protéines. D'après les données de l'analyse du génome d' E. cuniculi (Katinka et al, 2001).**

avec les données précédentes (Hayman *et al.*, 2001). L'unique protéine SWP1 d'*E. cuniculi* est insensible au traitement alcalin (Bohne *et al.*, 2000).

### 3.5.3. N-glycosylation ?

Les protéines SWP1 et SWP2 d'*E. intestinalis* étant retenues sur colonnes d'affinité ConA et WGA, un statut N-glycosylé a été supposé pour ces protéines (Hayman *et al.*, 2001). Des sites potentiels de N-glycosylation sont prédits au sein de diverses séquences protéiques chez *E. cuniculi*, y compris la protéine de tube polaire PTP1 présentant les motifs NET, NGT et NIS (Delbac *et al.*, 1998b). L'hypothèse de N-glycosylation n'a cependant pas été étayée par la mise en œuvre de procédures usuelles de déglycosylation pour cette protéine purifiée par HPLC chez *E. hellem* (Xu *et al.*, 2004). En se référant aux données génomiques pour *E. cuniculi*, la capacité de N-glycosylation paraît improbable (Katinka *et al.*, 2001; Vivarès et Méténier, 2004). Un homologue de Dpm1 pourrait être nécessaire à l'incorporation précoce de Man dans les N-glycanes, mais l'enzyme transférant GlcNAc-P sur Dol-P aussi bien que les sous-unités du complexe oligosaccharyltransférase (OST) ne sont pas prédites. De même, aucun gène n'est candidat à une glycosidase de RE, nécessaire à l'élimination de résidus Glc et Man pour donner le core N-glycanique usuel. L'absence d'homologues microsporidiens pour les enzymes-clés de la N-glycosylation a récemment été vérifiée par d'autres auteurs (Samuelson *et al.*, 2005). Le génome d'*E. cuniculi* ne code en effet aucune des glycosyltransférases Alg eucaryotes. De la comparaison des répertoires Alg de différents organismes, il ressort finalement la conception d'une évolution régressive à partir d'un ancêtre commun possédant toutes ces enzymes.

### 3.5.4. O-glycosylation

La O-mannosylation de la protéine PTP1 d'*E. hellem* a été envisagée en s'appuyant sur la capacité de liaison à la ConA parmi 10 lectines différentes, l'élimination de cette liaison par traitement avec NaOH et la connaissance du répertoire génique d'*E. cuniculi* (Xu *et al.*, 2004). Une analyse en spectrométrie de masse montre que cette protéine ne présente pas d'autres modifications (Xu *et al.*, 2004).

L'annotation du génome d'*E. cuniculi* a fait suggérer la O-mannosylation comme seul mode de O-glycosylation (Katinka *et al.*, 2001). Les gènes codant les protéines impliquées sont indiqués **Tableau 8**. Compte-tenu des données acquises chez des levures comme *S.*



*cerevisae* et *C. albicans* (Ernst et Prill, 2001), il est vraisemblable que la O-mannosylation des protéines d'*E. cuniculi* débute dans le RE et se poursuit dans l'appareil de Golgi. Le mannose peut être activé en Dol-P-Man et GDP-Man. Au niveau du RE, deux Dol-P-Man protéine O-mannosyltransférases de la famille PMT (ECU02\_1300 et ECU06\_0950) peuvent servir au transfert du mannose du Dol-P-Man sur un résidu Ser ou Thr d'une protéine. Dans l'appareil de Golgi, un transporteur homologue à la protéine Vrg4 de *Candida* ou *Saccharomyces*, procure le GDP-Man à une  $\alpha$ 1,2 mannosyltransférase similaire à celles de la famille KTR (ECU04\_1130), qui assurera l'addition de résidus Man supplémentaires (Katinka *et al.*, 2001; Vivarès et Méténier, 2004).

La protéine ECU08\_1340 a été annotée comme étant similaire à la sous-unité 110 kDa des O-GlcNAc transférases (OGT) qui ajoutent le GlcNAc aux protéines nucléaires et cytosoliques (Katinka *et al.*, 2001). En fait, l'homologie correspond majoritairement à des répétitions tétratricopeptides ubiquitaires qui sont présentes dans le domaine N-terminal d'OGT, et aucune homologie significative n'est observée avec le domaine C-terminal catalytique (Vivarès et Méténier, 2004). La modification O-GlcNAc ne peut donc pas être prédite pour *E. cuniculi*.

### 3.5.5. Synthèse d'ancres GPI

Aucun travail expérimental n'a été réalisé pour l'identification d'ancres GPI chez les microsporidies. Le génome d'*E. cuniculi* fait cependant considérer une capacité de glypiation sur la base des homologues des trois protéines suivantes : l'enzyme responsable de la production de l'intermédiaire GlcNAc-PI, la protéine membranaire impliquée dans le transfert de phosphoéthanolamine aux mannoses de l'ancre, et le composant catalytique de la transamidase transférant GPI à l'extrémité C-terminale de la protéine (Vivarès et Méténier, 2004).

### 3.5.6. Interactions hôte-parasite, un rôle possible des glycanes ?

Un traitement des spores de *Glugea plecoglossi* par la ConA diminue significativement leur phagocytose par les macrophages du poisson-hôte (Kim *et al.*, 1999). Cette phagocytose se ferait par des interactions lectines-sucre (Leiro *et al.*, 1996).

Les spores d'*E. intestinalis* peuvent adhérer à la surface des cellules-cibles en culture et l'adhérence implique les GAG des protéoglycanes-hôtes (Hayman *et al.*, 2005). En effet, le



traitement des cellules épithéliales intestinales avec des glycanes sulfatés, ainsi que l'utilisation de cellules CHO complètement ou partiellement déficientes en GAG, ont révélé une diminution significative du taux d'adhérence (de 73 à 88%). La liaison s'effectuerait préférentiellement avec le type héparane-sulfate. Hayman *et al.* (2005) ont émis l'hypothèse que la capacité d'infestation de divers tissus et divers mammifères-hôtes par *E. intestinalis* résulterait de l'utilisation de multiples GAG de l'hôte. Le ligand au niveau de la spore microsporidienne reste à déterminer.

Une récente étude réalisée sur des sujets immunocompétents a mis en évidence une réponse immunitaire développée contre des protéines du tube polaire et du capuchon polaire. Une déglycosylation chimique à l'aide d'acide trifluorométhanesulfonique montre que les anticorps sont dirigés contre la fraction glucidique de PTP1 et de protéines de haut poids moléculaire assignées au capuchon polaire (Peek *et al.*, 2005). La mannosylation de PTP1 pourrait accroître la stabilité de la protéine face aux dégradations et protéger le tube polaire des attaques protéolytiques du tractus gastro-intestinal de l'hôte. Le caractère « collant » du tube polaire extrudé fait aussi suggérer des interactions de PTP avec des récepteurs de surface de la cellule-hôte, en préalable à l'étape de pénétration du tube polaire. L'existence d'interactions entre PTP1 mannosylée et cellule-hôte a été étayée par l'observation d'une diminution du taux d'infestation par *E. hellem* de cellules RK13 prétraitées au mannose, contrastant avec une augmentation après traitement au glucose ou au saccharose (Xu *et al.*, 2004). De plus, *E. hellem* se lie plus efficacement aux cellules CHO Lec1, déficientes en N-glycosylation complexe et capables d'une O-fucosylation à leur surface. Des changements dans les glycoprotéines de surface de la cellule-hôte peuvent donc altérer l'efficacité d'infection du parasite (Xu *et al.*, 2004).



*"La science avance par  
degrés et non par bonds."  
Thomas Macaulay.*

# Résultats



# 1. LES STADES DE DEVELOPPEMENT D' *E.* *CUNICULI*: UNE ANALYSE ULTRASTRUCTURALE 3D

---

## Introduction

Les spores des microsporidies présentent un appareil invasif particulier dont l'élément majeur est le tube polaire. Lors de l'invasion, ce long tube est brutalement extrudé à l'apex de la spore et permet l'introduction du sporoplasme (incluant l'appareil nucléaire) dans une cellule-hôte, en préalable à un développement parasitaire strictement intracellulaire. Chez *Encephalitozoon cuniculi*, tous les stades de développement sont confinés à une vacuole parasitophore. Partant du sporoplasme internalisé, ce développement comporte deux phases : (1) une phase proliférative ou mérogonie, durant laquelle les formes cellulaires appelées mérontes se multiplient activement, (2) une phase de différenciation ou sporogonie qui débute par la conversion des mérontes en sporontes ; chaque sporonte subit une seule division et les cellules filles, appelées sporoblastes, se différencient en spores matures qui seront libérées dans l'environnement après lyse de la cellule-hôte. La sporogonie implique la biogenèse d'une épaisse paroi sporale bipartite et de toutes les structures caractéristiques de l'appareil invasif (capuchon polaire, tube polaire, polaroplaste et vacuole postérieure).

Une première description ultrastructurale des principaux stades d'*E. cuniculi*, au niveau de cellules du fluide ascitique d'une souris infectée, a clairement révélé l'état monocaryotique et la division du sporonte en deux sporoblastes, deux critères importants pour exclure l'ancienne assignation d'*E. cuniculi* au genre *Nosema* (Sprague et Vernick, 1971). La comparaison ultérieure de trois isolats issus d'hôtes mammifères différents (lapin, souris et hamster) et maintenus en culture sur des cellules du plexus choroïde de lapin, a montré une même séquence de développement, la présence d'une seule membrane autour du sporoplasme venant d'être internalisé et l'apparition de la membrane de la vacuole parasitophore en début de mérogonie (Pakes *et al.*, 1975).

La technique des coupes sériées suivie de reconstitution tridimensionnelle (3D) est un moyen d'étudier la morphologie spatiale d'une structure biologique. Pour la première fois chez une microsporidie, nous avons ainsi obtenu des modèles 3D d'une vacuole parasitophore et de plusieurs stades de développement d'*E. cuniculi*. Les images de microscopie électronique ont été digitalisées et les modèles construits à l'aide des logiciels Photoshop et IMOD. Nous



avons visualisé l'étroite relation entre les membranes limitant les mérontes et de la vacuole parasitophore, les principaux changements de forme cellulaire et la mise en place de certaines structures internes marquant la sporogénèse microsporidienne.

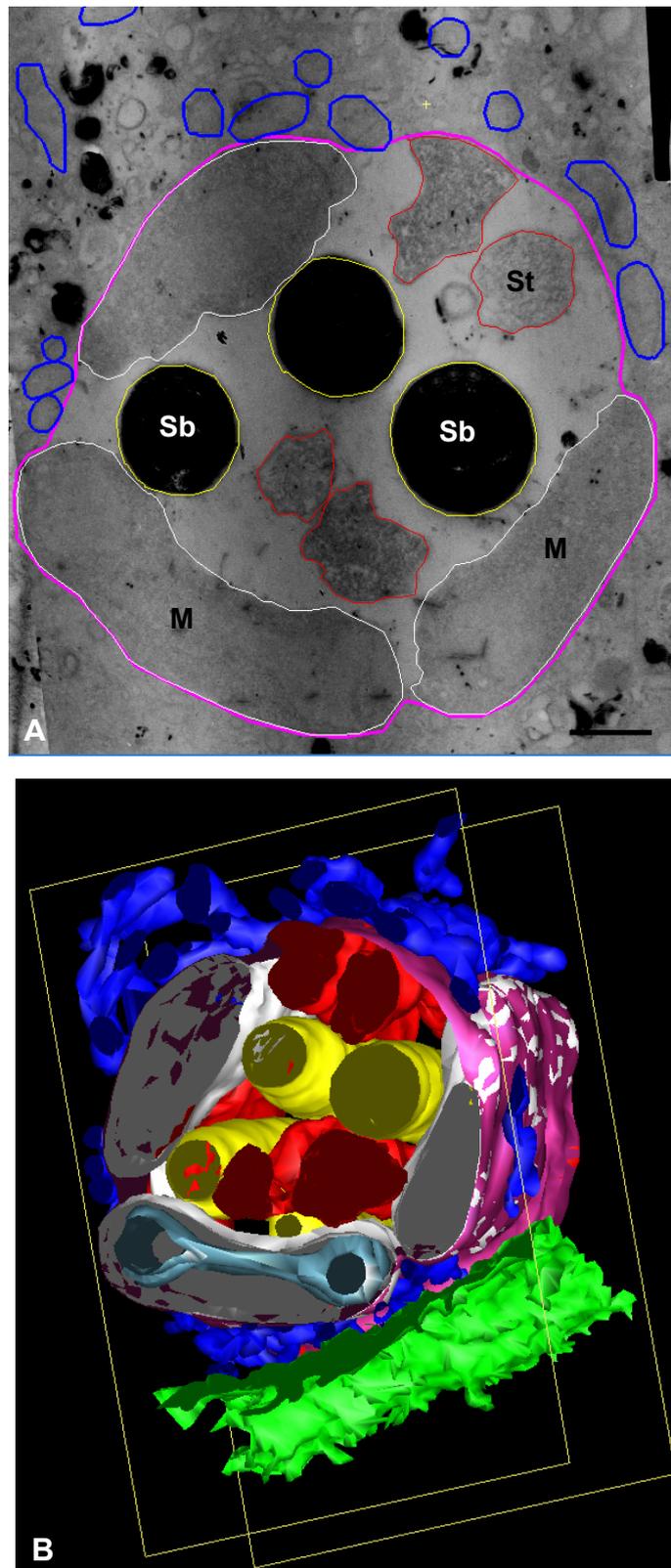
## **Matériel et Méthodes**

### **Préparation des échantillons cellulaires**

*Encephalitozoon cuniculi* est cultivé *in vitro* sur des cellules fibroblastiques HFF (Human Foreskin Fibroblast). Les cultures s'effectuent en milieu MEM (Minimum Essential Medium) supplémenté en L-glutamine 2 mM, sérum de veau fœtal 5%, ampicilline 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , streptomycine 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , fungizone 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , dans une atmosphère à 5% de  $\text{CO}_2$  à 37°C. Les cellules infestées adhérentes sont décollées à l'aide d'un grattoir et récupérées par centrifugation (10 min à 14 000g). Elles sont ensuite lavées en PBS et fixées en PBS-glutaraldéhyde 2,5% 1 h à température ambiante (TA). L'échantillon est alors rincé en PBS-8,5% de sucrose, préincubé dans le tampon ZIO (tampon tris HCl 0,1M pH 4,5 contenant 1,13 M de NaCl, 0,01M de  $\text{CaCl}_2$  et 0,03 M de  $\text{MgCl}_2$ ) et incubés à l'obscurité durant 14 à 20 h dans le milieu ZIO (poudre de zinc, iode,  $\text{OsO}_4$ ). Les cellules peuvent être colorées en tampon phosphate 0,1M pH 6,8 contenant 1mM de DTT pendant 30 min à TA. Les échantillons sont ensuite déshydratés par des concentrations croissantes d'éthanol (50%, 70%, 100%) puis infiltrés à l'oxyde de propylène 3 fois 20 min. L'imprégnation dans un mélange oxyde de propylène-résine Epon, à volumes égaux pendant une nuit, est suivie de l'inclusion finale en résine pure qui polymérise pendant 72 h à 50°C. Une fraction obtenue sur gradient de Percoll contenant un enrichissement en spores dévaginées a été fixée et incluse en résine Epon classique.

### **Obtention des images en microscopie électronique**

Les sections ultrafines sériées (80-90 nm) sont obtenues avec un ultramicrotome UltracutS Leica. Les rubans de coupes sont déposés sur des grilles Nickel à fente et revêtues d'une membrane de collodion. Les observations sont effectuées avec un microscope électronique à transmission Jeol 1200X, à 80 keV. Dans chaque série, les clichés correspondent à une même région. Les images sont digitalisées par scanner.



**Figure 1. Jeune vacuole parasitophore (A)** Coupe en MET, les contours correspondant aux différents éléments structuraux sont dessinés dans IMOD. M, méronte; St, sporonte; Sb, sporoblaste **(B)** Modèle 3D d'une série de 27 coupes sériées. La membrane de la vacuole parasitophore est représentée en rose, les mérontes sont en blanc, les sporontes en rouge et les sporoblastes en jaune. Un noyau en division au sein d'un méronte est visible en bleu clair. Les mitochondries de la cellule-hôte sont en bleu, la membrane de la cellule-hôte en vert et un cadre délimite l'épaisseur et les dimensions des coupes. Echelle = 500 nm

### **Construction des modèles 3D**

Les modèles sont construits en utilisant les logiciels Photoshop et IMOD (<http://bio3d.colorado.edu>). Les images provenant d'une zone particulière ont été alignées en utilisant Photoshop. Etant donné que le faisceau d'électrons peut distordre les coupes ultrafines, les images ont été alignées en respectant les structures d'intérêt et réalignées avec les structures modèles qui étaient distantes de celles-ci. IMOD a été utilisé pour grouper les images alignées et dessiner les contours des structures. Ces contours sont joints pour chaque type de structure avec IMOD mesh, formant finalement le modèle 3D. Chaque stade de développement a été reconstruit au moins trois fois à partir de sections différentes afin d'éliminer toute donnée issue d'un phénomène exceptionnel.

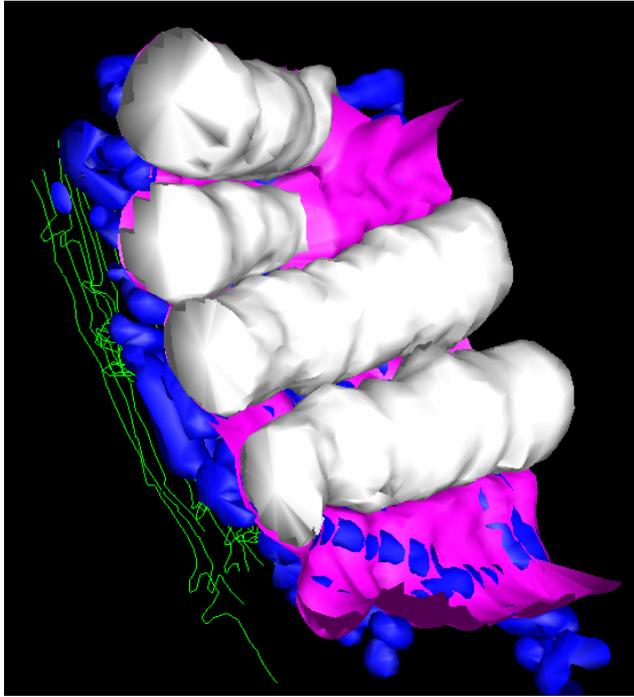
### **Résultats**

La technique contrastante ZIO a été choisie dans le but de marquer au maximum les systèmes membranaires. Un point négatif est l'absence de contraste au niveau de la paroi du parasite. Cet élément, qui est un bon repère pour suivre l'évolution de la sporogonie, n'a donc pas été représenté dans nos reconstitutions. La méthode se heurte aussi à la limite de résolution imposée par l'épaisseur des coupes. La représentation de deux éléments structuraux différents mais localement très proches entraînant une superposition, l'un des deux éléments apparaît alors transparent.

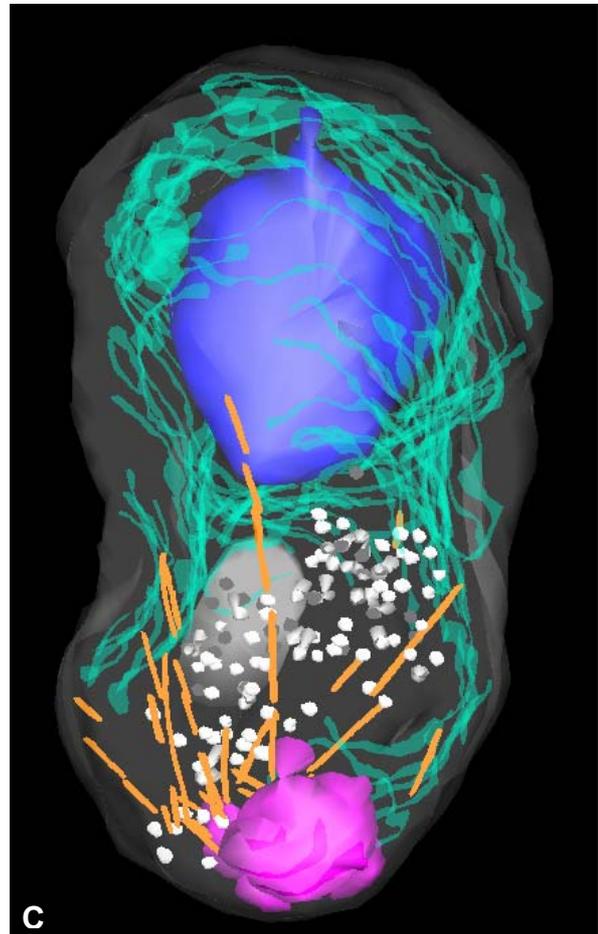
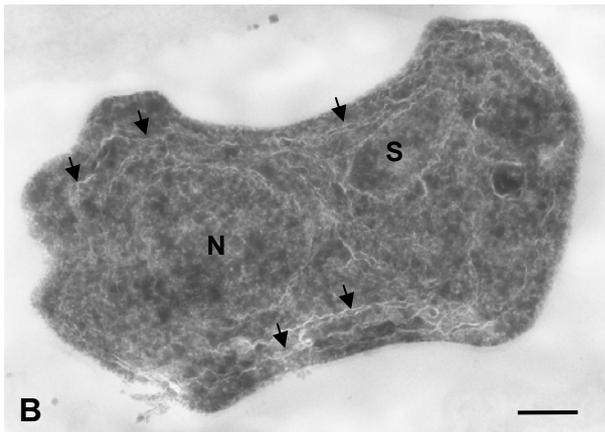
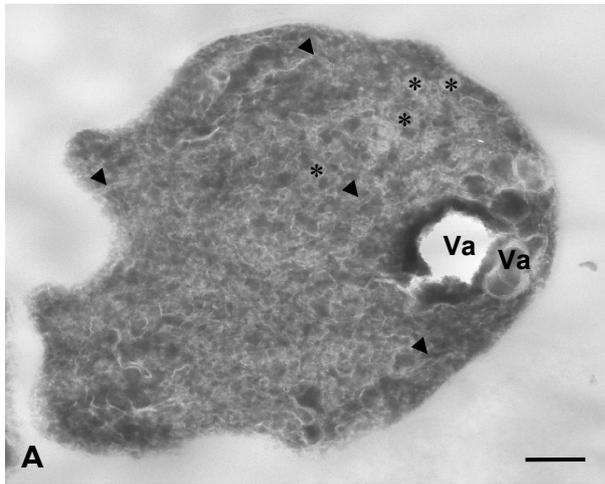
#### **La vacuole parasitophore**

En **Fig 1A**, est montrée une coupe d'une jeune vacuole parasitophore. Les mérontes (en blanc) sont étroitement accolés à la membrane de la vacuole (en rose) alors que les sporontes (en rouge) sont en partie détachés de cette membrane. Des sporoblastes (en jaune), plus ou moins avancés dans la sporogénèse, sont libres dans la zone centrale.

La reconstruction 3D rend bien compte de la position relative de ces stades parasitaires dans l'espace vacuolaire (**Fig 1B**). A proximité de la vacuole, ont été représentées des mitochondries (en bleu) et une région de la membrane plasmique (en vert) de la cellule-hôte. Les mérontes sont de taille plus importante et l'un d'eux est en phase de division (noyau en bleu clair). La transition méronte-sporonte est ici seulement marquée par la réduction de la zone de jonction avec la membrane vacuolaire. Les sporoblastes ont un contour plus régulier et une taille réduite.



**Figure 2. Stades mérontes.** Illustration 3D de la relation étroite entre les mérontes (blanc), la membrane de la vacuole parasitophore (rose), et les mitochondries de la cellule-hôte (bleu). La membrane de la cellule-hôte est représentée par des lignes vertes.



**Figure 3. Stade sporoblaste 1.** (A) et (B) Clichés issus de la série de 31 coupes sériées en MET. Les vésicules dites golgiennes sont indiquées par des astérisques, les microtubules par des pointes de flèches et le réticulum endoplasmique (RE) par des flèches. Va, vacuole; N, noyau; S, grain de sécrétion (C) Représentation 3D de cette même série. Le sporoblaste présente plusieurs éléments: une vacuole (rose), un noyau (bleu), du RE (vert), des microtubules (orange), des vésicules golgiennes (blanc) et un grain de sécrétion (gris). Echelle = 200 nm.

## **Le méronte, un contact privilégié avec la cellule-hôte**

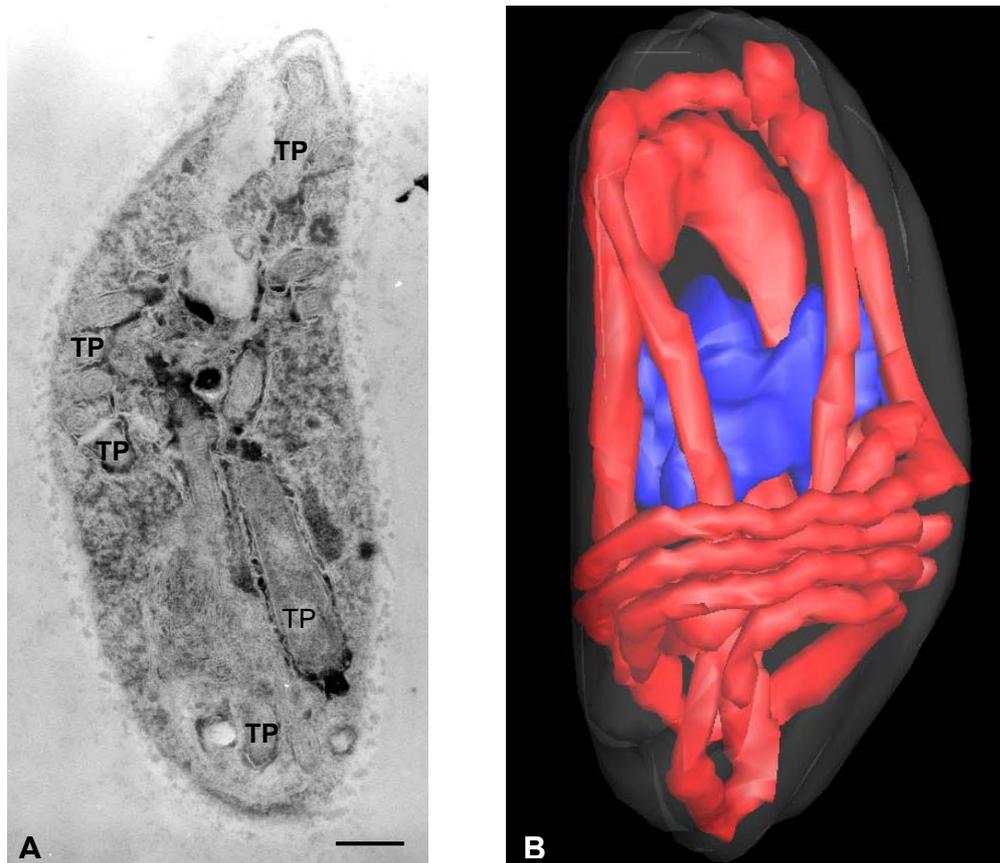
Les mérontes ont un diamètre moyen de 1,3  $\mu\text{m}$  et peuvent être très allongés (jusqu'à 3, 5  $\mu\text{m}$ ) quand ils entrent en division. Le noyau de grande taille est la structure interne la plus aisément reconnaissable. De nombreux ribosomes et quelques saccules du réticulum endoplasmique (RE), sont répartis dans le cytoplasme. Exclusivement représentée par le plasmalemme, la surface du méronte est très irrégulière. En **Fig. 2**, une représentation 3D illustre le contact intime de quatre mérontes (en blanc) avec la membrane de la vacuole parasitophore (en rose). Deux de ces cellules sont représentées entièrement dans la pile d'images réalisées. L'élimination virtuelle d'un méronte donné dans le modèle 3D révèle que la membrane vacuolaire forme une gouttière épousant une large surface de ce méronte. Une telle jonction entre les deux membranes optimise vraisemblablement les transports de nutriments en direction du parasite. Les mitochondries de la cellule-hôte (en bleu) sont aussi extrêmement proches de la membrane vacuolaire, ce qui va dans le sens de l'hypothèse d'une rapide importation d'ATP d'origine hôte par le parasite.

## **Les sporoblastes, une morphogenèse complexe**

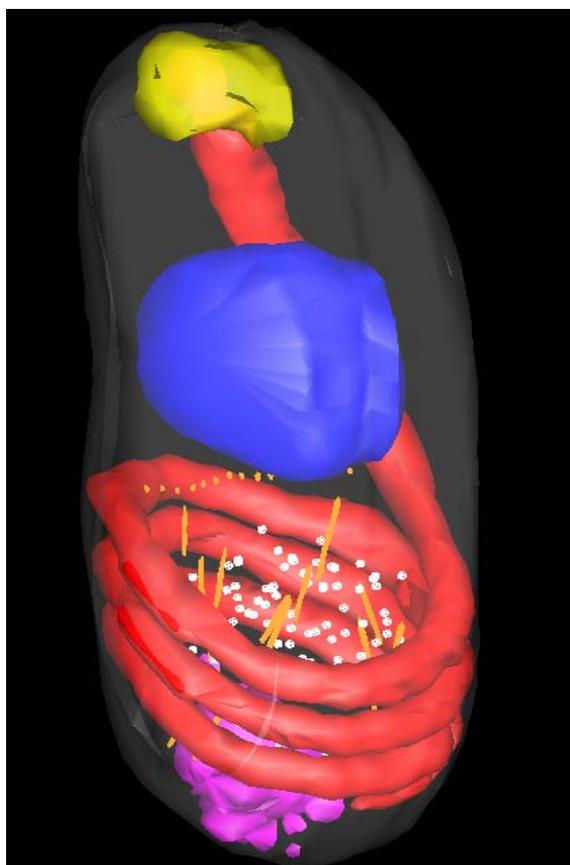
Au fur et à mesure de son développement, le sporoblaste subit une réduction de taille et prend une forme plus ovoïde. Pour plus de clarté, une numérotation arbitraire des stades de la sporogénèse, en fonction de leur degré de développement, a été choisie.

### **Sporoblaste 1**

Le stade représenté **Fig. 3**, entièrement détaché de la membrane vacuolaire, correspond à un très jeune sporoblaste issu de l'unique division du sporonte. Sa forme irrégulière se rapproche d'un ovale, avec une taille de 1,8  $\mu\text{m}$  x 2,6  $\mu\text{m}$ . Elle est suggestive d'un sporoblaste dont le revêtement de surface opaque aux électrons est en cours d'élaboration mais n'est pas identifiable avec la technique ZIO. Le noyau (en bleu) est relativement volumineux (0,9  $\mu\text{m}$  de diamètre) et déporté vers une extrémité de la cellule. Différentes structures cytoplasmiques peuvent être distinguées. Les citernes de RE (en vert) sont très développées, nombre d'entre elles s'étendant de façon concentrique par rapport au noyau. Plus surprenant est l'existence d'un compartiment vacuolaire (en rose) à l'aspect boursoufflé et marquant l'extrémité cellulaire la plus éloignée du noyau. Cette polarisation est accentuée par la localisation de microtubules (en orange) qui semblent émerger d'une zone proche de la vacuole pour



**Figure 4. Stade sporoblaste 2, mise en place du tube polaire.** (A) Photo d'une coupe montrant de façon significative l'ébauche du tube polaire. TP, tube polaire. Echelle = 200 nm. (B) Représentation 3D restreinte au tube polaire en rouge et au noyau en bleu.



**Figure 5. Sporoblaste 3.** Ce stade montre un tube polaire quasiment terminé (rouge), une vacuole située dans la partie postérieure de la cellule (rose), un noyau (bleu) et un disque d'ancrage déjà présent (jaune). A l'intérieur des spires du tube polaire sont présentes des vésicules golgiennes (blanc) et des microtubules (orange).

s'étendre jusque dans la région médiane du sporoblaste. De nombreuses petites vésicules (en blanc), sans doute d'origine golgienne, sont présentes au voisinage des microtubules et une structure vésiculaire de grande taille (0,15 x 0,4  $\mu\text{m}$  ; en gris) évoque un début d'activité sécrétoire pour la formation du tube polaire.

### **Sporoblaste 2**

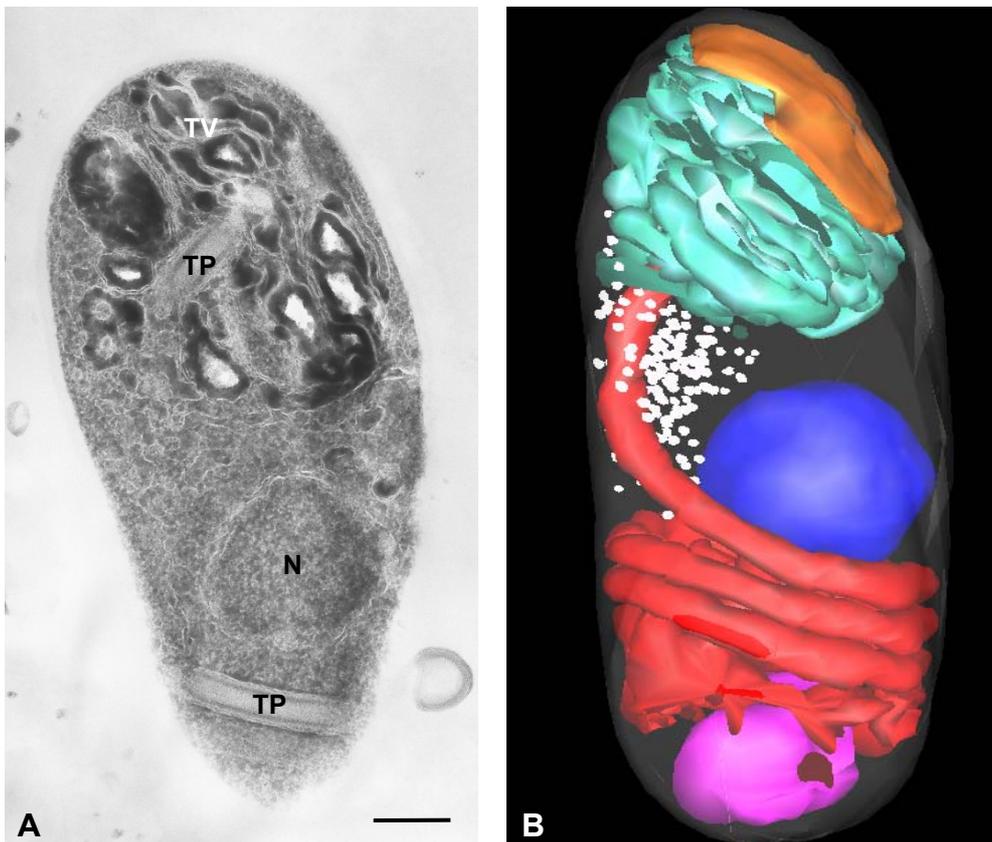
Ce stade est caractérisé par un contour beaucoup plus régulier, un noyau en position centrale et un important développement de l'ébauche du tube polaire (**Fig. 4A**). La taille de la cellule est de 1,7  $\mu\text{m}$  x 2,5  $\mu\text{m}$ . Pour une meilleure visualisation, seul le tube polaire (en rouge) et le noyau (en bleu) sont représentés sur le modèle 3D (**Fig. 4B**). Il a été difficile de suivre parfaitement toutes les circonvolutions du tube. Son enroulement dans la région postérieure est toutefois bien visible et une partie rectiligne antérieure devrait être à l'origine du futur manubrium.

### **Sporoblaste 3**

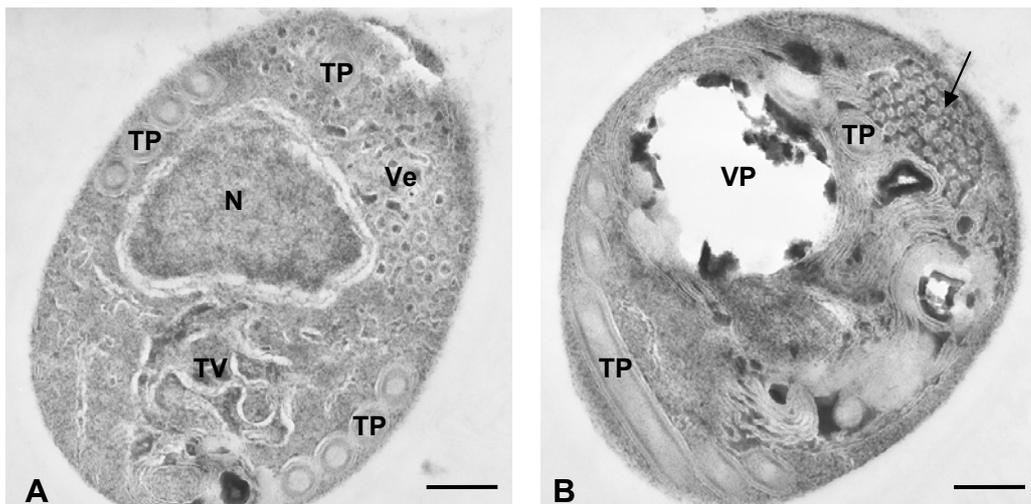
La reconstitution **Fig. 5** montre un sporoblaste de taille 1,6  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$ , possédant un noyau lisse et rond dont le diamètre est réduit à 0,6  $\mu\text{m}$ . Le tube polaire (en rouge) présente 3 tours de spire nettement repoussés vers le pôle cellulaire qui correspondra au pôle postérieur de la future spore. Sa partie rectiligne rejoint une structure marquant le pôle antérieur et correspondant au disque d'ancrage (en jaune). Des vésicules (en blanc) semblables à celles observées précédemment, sont localisées dans la région cytoplasmique encerclée par la partie enroulée du tube polaire. A ce niveau, sont encore visibles quelques microtubules (orange). Une petite vacuole irrégulière (en rose) est encore présente. De par sa localisation dans un stade encore plus nettement polarisé, elle apparaît comme le précurseur de la vacuole postérieure de la spore. Dans ces stades où de nombreuses structures se mettent en place, le réticulum endoplasmique est difficilement visible.

### **Sporoblaste 4**

Le modèle 3D **Fig. 6** représente un stade sporoblastique plus avancé, caractérisé par la différenciation d'une structure apicale assimilable au sac polaire (en orange) et surmontant un important réseau de grandes vésicules plus ou moins allongées (en vert) et à contenu opaque aux électrons. Ce réseau « tubulo-vésiculaire » encercle la partie rectiligne antérieure du tube polaire, semblablement au polaroplaste dans une spore mature. Les petites vésicules golgiennes (en blanc) sont observées dans la région sous-jacente. L'assemblage du tube



**Figure 6. Sporoblaste 4** (A) Coupe en MET représentative du réseau tubulo-vésiculaire (TV) visible lors de la formation du sac polaire au pôle antérieur de la cellule. N, noyau; TP, tube polaire. (B) Visualisation tridimensionnelle réalisée grâce à l'empilement de 23 coupes sériées. Sont présents : la vacuole postérieure (rose), le noyau (bleu) et le tube polaire encore en cours de synthèse (rouge). Les vésicules golgiennes (blanc) sont visibles près du manubrium et un réseau tubulo-vésiculaire (vert) ainsi qu'une structure similaire au sac polaire (orange) s'étendent dans la partie antérieure du parasite. Echelle = 200 nm.



**Figure 7. Coupes en MET issues d'une même série représentant un stade en cours de sporogénèse.** Ce stade sporoblaste est très complexe, de nombreuses vésicules d'aspect différent sont visibles. (A) Les vésicules dites golgiennes (Ve) et un réseau tubulo-vésiculaire (TV) sont évidents sur cette coupe. (B) Une structure vésiculaire très ordonnée (flèche) est observée. N, noyau; TP, tube polaire, VP, vacuole postérieure. Echelle = 200 nm.

polaire (en rouge) n'est pas achevé dans le secteur enroulé le plus postérieur, à proximité de la vacuole (en rose).

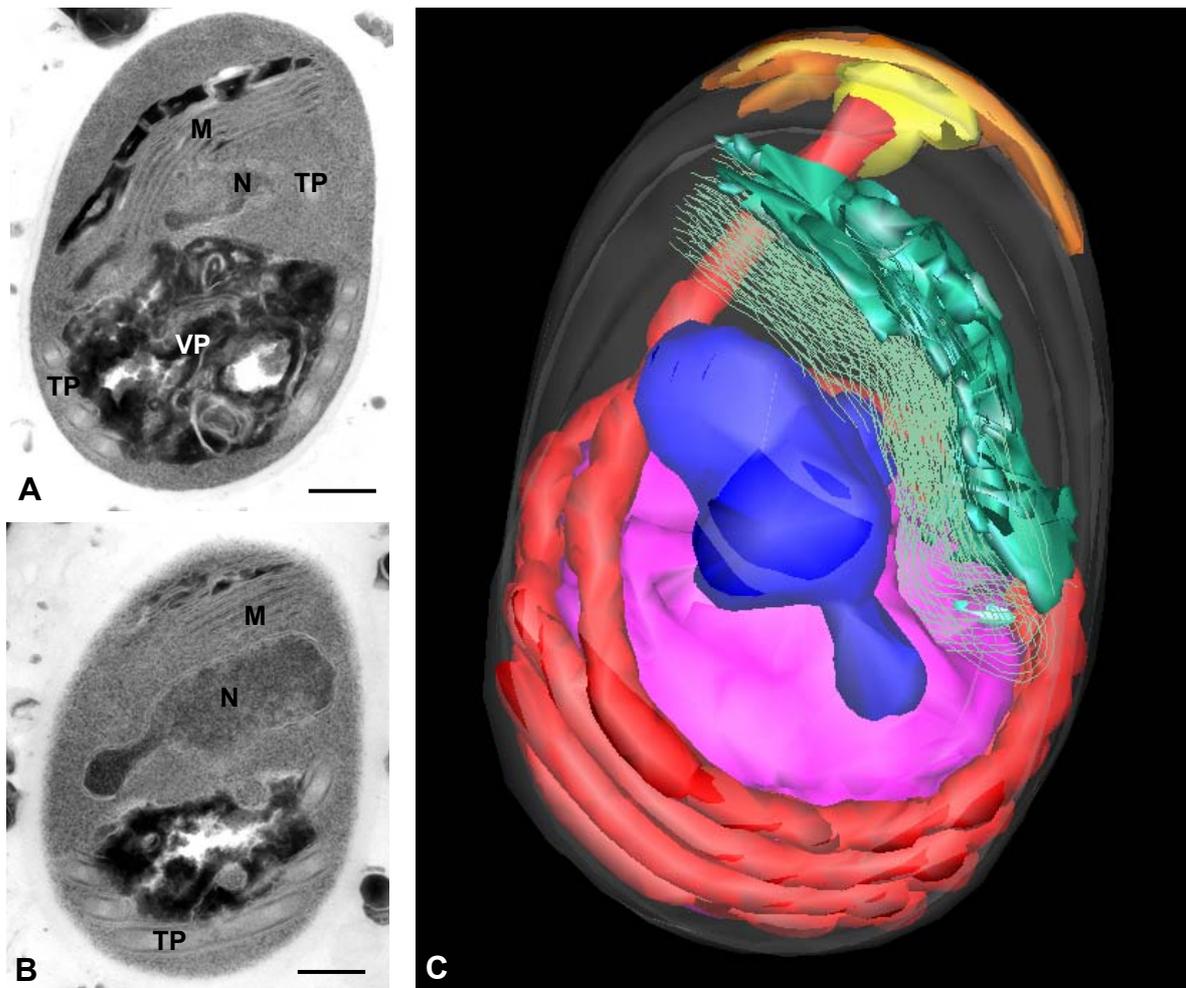
Par la suite, le cytoplasme du sporoblaste est de plus en plus encombré par des vésicules aux formes très variées (**Fig. 7**). La complexité et la compacité du réseau sont devenues telles que sa représentation 3D au moyen d'une seule couleur avait peu d'intérêt. Au vu de l'aspect et de la taille finale de la vacuole postérieure dans la spore, certaines vésicules de ce réseau hétérogène devraient contribuer à la biogenèse de cette vacuole. On notera qu'au pôle antérieur cohabitent des vésicules golgiennes dispersées et d'autres petites vésicules agencées en rangées plus ou moins régulières. L'examen sur les plans de coupe successifs indique, en fait, une concentration locale d'éléments tubulaires parallèles d'une taille semblable aux futures lamelles du polaroplaste de la spore (25 nm de diamètre chacun).

### **Sporoblaste 5**

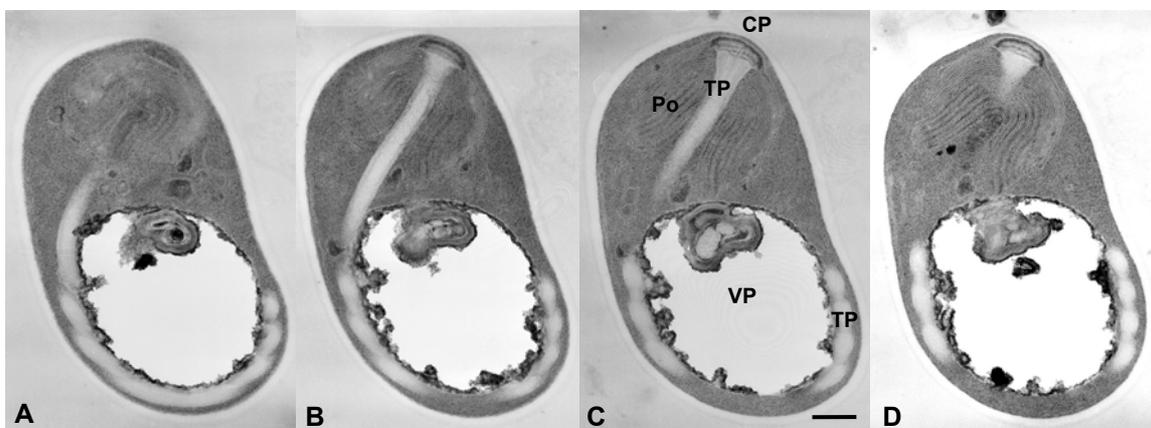
Un stade sporoblastique tardif méritant la désignation « spore immature » ou « présore » est montré **Fig. 8**. La structure représentée en rose sur le modèle a été définie par les contours d'une zone renfermant toutes les structures vésiculaires qui semblent fusionner entre elles pour l'agrandissement de la vacuole (**Fig. 8A et C**). Le noyau (en bleu) présente des expansions (**Fig. 8B**) et apparaît sous forme plurilobée dans l'espace (**Fig. 8C**). La région antérieure contient encore une partie du réseau tubulo-vésiculaire opaque mais celui-ci fait place à un empilement de membranes parallèles dans la zone supranucléaire, qui doit signifier la formation du polaroplaste. Le tube polaire est achevé et apparaît invariablement composé de 4 tours de spire.

### **La spore mature**

La spore mature (**Figs. 9, 10**) est ovoïde et de taille réduite (1,6  $\mu\text{m}$  x 1,5  $\mu\text{m}$ ). Son noyau (en bleu) est « compressé » entre la grande vacuole postérieure (en rose), le manubrium et le polaroplaste lamellaire (en vert). D'un diamètre de 0,8  $\mu\text{m}$ , la vacuole postérieure contient un matériel opaque périphérique et un amas multivésiculaire antérieur (**Fig. 9**). L'appareil invasif est complet. Le capuchon polaire est constitué du disque d'ancrage et du sac polaire qui couvre la totalité du polaroplaste lamellaire. Pour plus de clarté, un seul plan de coupe du polaroplaste est représenté sur le modèle (**Fig. 10**).



**Figure 8. Stade sporoblaste "avancé" (5).** (A, B) Coupes en MET et (C) représentation 3D de la même série. (A) Un réseau membranaire (M) est visible au pôle antérieur de la spore et la vacuole postérieure (VP) présente un contenu hétérogène dense aux électrons. (B) Le noyau semble former des expansions et (C) apparaît plurilobé en 3D (bleu). La vacuole postérieure a augmenté de volume (rose), trois éléments de l'appareil invasif sont terminés, le tube polaire (rouge), le disque d'ancrage (jaune) et le sac polaire (orange). Sous le réseau tubulo-vésiculaire (vert) est représenté un empilement de matériel membranaire (traits verts). M, réseau membranaire; N, noyau; TP, tube polaire; VP, vacuole postérieure. Echelle = 200 nm.



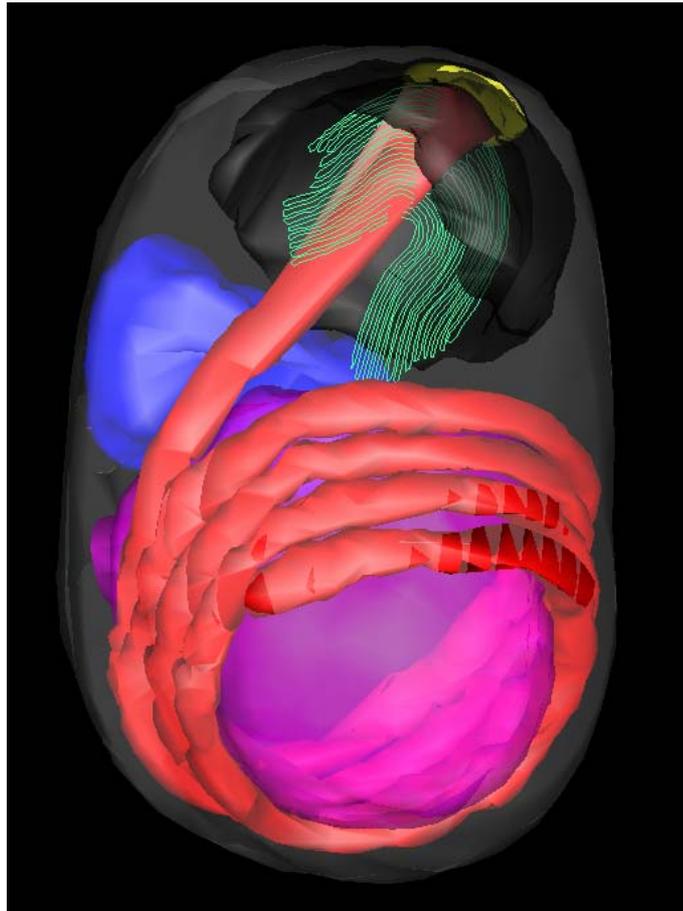
**Figure 9. Spore.** (A-D) Clichés Photos de quatre coupes sériées à la suite représentatives de la structure du capuchon polaire (CP) et du polaroplaste lamellaire (Po). TP, tube polaire; VP, vacuole postérieure. Echelle = 200 nm.

## La spore germée, le stade infectieux

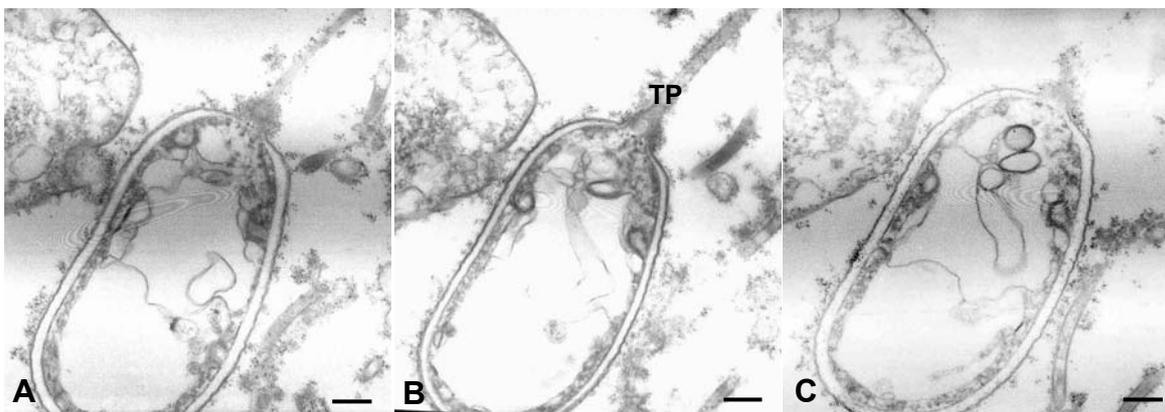
La série de photos **Fig. 11** illustre une spore mature après extrusion du tube polaire et libération de son matériel infectieux (sporoplasme) composé du noyau, du RE et des ribosomes. Le tube polaire reste attaché au pôle antérieur de la spore et du matériel vésiculaire persiste contre la membrane plasmique. La majeure partie de la cellule est cependant dépourvue de tout élément structuré.

## Discussion

Dans leur étude ultrastructurale des stades d'*E. cuniculi*, Pakes *et al.* (1975) ont évalué la durée du cycle de développement à 48 h environ, en se basant sur l'apparition de spores mures dans de grandes vacuoles parasitophores 2 jours après infestation. Des sporoplasmes entourés par des mitochondries de la cellule-hôte étaient observés à la 3<sup>ème</sup> heure et de jeunes vacuoles étaient visibles à la fin du premier jour. L'évolution des différentes vacuoles est cependant loin d'être synchronisée. De plus, au sein d'une vacuole donnée, le développement du parasite implique très vite le déroulement simultané des phases mérogonique et sporogonique, la multiplication de mérontes se poursuivant dans la région périphérique en parallèle avec les étapes sporogoniques concernant les cellules plus âgées et conduisant à l'accumulation de spores dans la région centrale. Notre modèle 3D d'une jeune vacuole illustre bien cet asynchronisme puisque cette vacuole héberge déjà quelques sporoblastes. La durée d'un cycle cellulaire pour les mérontes est indéterminée mais il est clair qu'elle doit être très inférieure au délai de 24 h mentionné pour l'apparition des premières vacuoles. Il est concevable qu'une longue période de latence précède la première division au niveau du sporoplasme, en relation avec la genèse de la membrane vacuolaire et d'autres événements nécessaires au maintien du parasite dans la cellule-hôte. Un suivi de l'évolution des vacuoles parasitophores, en immunofluorescence après infestation de cellules HFF, a montré de jeunes vacuoles semblables à celles représentées Fig. 1, entre 36 et 40 h après infection (données personnelles). Lors de la sporogonie, la transformation méronte-sporonte suivie de la fission binaire du sporonte doit être de très courte durée par rapport à la différenciation sporoblaste-spore. Le revêtement de surface qui caractérise le sporonte est en effet rapidement mis en place au niveau de protubérances lamellaires de la surface du méronte, justifiant la dissociation de la jonction avec la membrane de la vacuole parasitophore (voir **Fig. 2A**, p 78). La division du sporonte s'effectue vraisemblablement très tôt après cette dissociation. Ainsi,



**Figure 10. Représentation 3D d'une spore mature.** Toutes les structures caractéristiques sont présentes: une vacuole postérieure (rose), un noyau compacté (bleu), un tube polaire présentant 4 tours de spires (rouge), un capuchon polaire (jaune). Le sac polaire (noir) couvre le polaroplaste lamellaire (vert).



**Figure 11. Une spore germée.** (A, B, C) Trois plans de coupe successifs en MET représentant une spore mature ayant relargué son sporoplasme. Le tube polaire (TP) est encore visible au pôle antérieur.

la sporontogenèse serait assimilable à une brève période de commutation permettant à deux cellules filles de s'engager irréversiblement dans la longue voie de la sporogenèse.

L'accolement des mérontes à la membrane de la vacuole parasitophore a été antérieurement décrit chez les différentes espèces du genre *Encephalitozoon* (Sprague et Vernick, 1971). La « gouttière » représentative de chaque zone d'accolement dans le modèle 3D n'est certainement pas un système figé. Sa capacité d'expansion pendant la croissance du méronte est évidente. Toutefois, la question se pose encore de savoir si la jonction épouse toujours le même côté du parasite ou si elle porte sur toute la surface cellulaire par rotation du parasite sur lui-même. La relation de proximité entre la vacuole et les mitochondries a aussi été antérieurement signalée (Scanlon *et al.*, 2004). Chez les microsporidies en contact direct avec le cytoplasme-hôte pendant tout le cycle ou seulement pendant la mérogonie, un recrutement de mitochondries plus ou moins lâche est constaté mais les éléments les plus caractéristiques de l'environnement immédiat du méronte sont des saccules de RE dont le côté « lisse » (sans ribosomes liés) est le plus proche du parasite (Cali et Takvorian, 1999). Ceci nous amène à suggérer que : (1) la membrane de la vacuole parasitophore chez *Encephalitozoon* dérive du RE de la cellule hôte, selon un processus peut-être similaire à celui observé pour les vacuoles autophagiques (Huang et Klionsky, 2002), (2) l'encerclement de la vacuole parasitophore par des mitochondries positionnées à courte distance pourrait signifier, en partie, une contribution des mitochondries à la genèse de la membrane d'une vacuole de plus en plus grande, grâce une rapide importation de certaines molécules (phospholipides ?). Les seules données sur la composition moléculaire de cette membrane sont malheureusement de nature négative, à savoir l'absence de quatre marqueurs protéiques : la calnexine (RE), l'autoantigène endosomal 1 et le récepteur de transferrine (endosomes), ainsi que la protéine membranaire 1 (lysosomes) (Fasshauer *et al.*, 2005).

Malgré l'absence de visualisation des structures pariétales due à l'utilisation du contraste par ZIO, les reconstitutions 3D rendent assez bien compte de l'évolution de la forme de la cellule parasitaire, partant d'une longue forme cylindrique à surface très accidentée chez le méronte et aboutissant une courte forme ovoïde à surface régulière chez la spore mature. La diminution de volume cellulaire correspondante est presque de moitié. La compaction du cytoplasme et les déformations du noyau entre des éléments de l'appareil invasif, accompagne cette réduction de taille. La plasticité du **noyau** n'est aucunement surprenante puisque celui-ci peut être sujet à un étirement considérable pendant son transit dans le tube polaire extrudé,



tout comme l'est, par exemple, un noyau gamétique franchissant un très petit pore entre deux individus en cours de conjugaison chez les Ciliés. Les expansions nucléaires semblent largement imposées par des contraintes spatiales liées à la dynamique du développement du long tube polaire puis de la grande vacuole postérieure. Contrairement à ce qui est montré dans certains schémas de la spore microsporidienne vue en perspective (Franzen et Muller, 1999; et **Fig. 2A**, Etude bibliographique), le noyau sporal est loin d'être parfaitement arrondi et n'est jamais localisé dans l'espace interne délimité par l'enroulement du tube polaire. La forme de ce noyau est plutôt celle d'un croissant avec des lobes plus ou moins longs. Sa localisation par rapport au tube polaire est juste au-dessus du premier tour de spire, l'espace sous-jacent étant occupé par la vacuole postérieure.

L'étude de l'accroissement de complexité cellulaire pendant la morphogenèse sporale nécessite de nombreuses observations sur différents stades sporoblastiques. Les stades que nous avons ici présentés en 3D, constituent une première séquence d'intérêt, en raison non seulement de l'imagerie des modifications morphologiques dans l'espace, mais aussi de la mise en évidence de certains éléments ayant jusqu'alors passés inaperçus dans les stades considérés (cas des microtubules non mitotiques et de la vacuole initiale) ou s'étant révélés difficiles à mettre en relation avec une structure connue de l'appareil invasif (cas d'une ébauche de polaroplaste). Une difficulté majeure réside cependant dans la visualisation de l'appareil de Golgi dont les compartiments cis, médian et trans ne peuvent pas être différenciés cytologiquement sous forme de saccules empilés. De plus, devenant difficilement discernable parmi les divers éléments vésiculaires des stades tardifs, le RE a progressivement échappé à nos tentatives de segmentation. Les relations structurales entre RE et Golgi, tout comme la contribution précise de chacun de ces systèmes membranaires à la genèse de l'appareil invasif, restent donc obscures.

Les vésicules golgiennes plus ou au moins dispersées en mérogonie et début de sporogonie ont été considérées à l'origine d'un réseau tubulo-vésiculaire de grande taille impliqué dans la formation du tube polaire, du polaroplaste et de la vacuole postérieure (Bigliardi et Sacchi, 2001). Le développement d'un tel réseau a été effectivement visualisé au cours de cette étude. La répartition des éléments du RE et de petites vésicules assignées au Golgi a pu être montrée chez le jeune sporoblaste. Une structure vésiculaire ayant un diamètre et une apparence similaire à celle du tube polaire en coupe transversale était présente, comme déjà mentionné par (Pakes *et al.*, 1975). En fait, cette structure pourrait



correspondre à un centre de nucléation requis pour une élongation orientée du tube par coalescence avec d'autres vésicules. Il n'est pas exclu qu'il s'agisse du précurseur du **disque d'ancrage**. L'apparition précoce du disque d'ancrage et du manubrium a été clairement détectée pendant le développement synchrone des entités cytoplasmiques entourant les noyaux du plasmode chez *Enterocytozoon bieneusi* (Desportes-Livage *et al.*, 1996). Le sporoblaste 2 (**Fig. 4**) contient une ébauche de **tube polaire** particulièrement encombrante qui peut avoir gêné l'identification du disque d'ancrage. Les difficultés rencontrées dans la construction d'un modèle 3D pour un stade intermédiaire sont probablement liées à un gradient d'âge des cellules dans les vacuoles parasitophores examinées. En effet, celui-ci est en faveur d'une plus grande fréquence des stades tardifs, en raison du phénomène d'accumulation des cellules complètement différenciées. La longueur totale de l'ébauche, évaluée entre 0,35 et 0,40  $\mu\text{m}$ , dépasse significativement celle du tube polaire dans la spore mature et se rapproche donc de celle du tube extrudé. L'élasticité du tube polaire a été maintes fois soulignée à l'occasion des études sur la germination sporale. Un raccourcissement secondaire du tube polaire en formation doit être envisagé. Il est établi que le tube extrudé et ses protéines PTP1 et PTP2, riches en cystéine, sont solubilisés par traitement avec un agent réducteur de ponts disulfure (Delbac *et al.*, 1998a). Des interactions latérales entre molécules PTP via des ponts disulfure, dépendantes de l'activité d'une protéine-disulfure isomérase et d'un potentiel redox adéquat, pourraient être une cause de compaction du tube.

Les **microtubules** (MT) formant le fuseau mitotique entre les deux plaques polaires ont été décrits chez diverses espèces microsporidiennes (Vavra et Larson, 1999), alors qu'aucune description du complexe microtubulaire interphasique n'a été réalisée. Nous avons identifié quelques MT dans le cytoplasme des jeunes sporoblastes et la représentation 3D a révélé leur localisation préférentielle dans la région cellulaire la plus riche en vésicules golgiennes. Un rôle des MT dans le transport des vésicules est prévisible. Outre 3 gènes codant les tubulines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , le génome de *E. cuniculi* contient 6 gènes codant des protéines-moteurs de type kinésine. L'une de ces kinésines potentielles (ECU05\_0060) est apparentée à KIF<sub>4</sub> qui est impliquée chez *Mus musculus* dans le transport cytoplasmique d'organites membranaires (Sekine *et al.*, 1994). La persistance de MT en bordure interne de la zone enroulée du tube polaire néo-formé fait supposer une participation au maintien de l'arrangement spatial de ce tube, qui serait complémentaire de celle des filaments d'actine liant la bordure externe de la même zone à la membrane de la cellule (Bigliardi *et al.*, 1999).



Une ségrégation de saccules plus ou moins aplatis dans la région antérieure des sporoblastes conduit à la formation du **sac polaire**, puis plus progressivement à celle du **polaroplaste lamellaire** sous-jacent (le polaroplaste dit vésiculaire n'est pas observé chez *E. cuniculi*). L'hypothèse de Vavra (1976) selon laquelle le polaroplaste lamellaire serait issu du repliement de membranes d'origine nucléaire n'est pas appuyée. Par contre, un élément sous forme de petits tubules membranaires compacté de façon périodique dans une matrice plus dense, est un bon candidat pour démarrer l'extension des couches membranaires successives du polaroplaste autour du manubrium.

Les données bibliographiques indiquent que la **vacuole postérieure**, issue de vésicules golgiennes, apparaît en fin de sporogonie lorsque le tube polaire est mis en place (Canning et Lom, 1986). Cela reste vrai dans le cadre de nos observations, hormis le fait qu'un compartiment vacuolaire préexiste à une extrémité du jeune sporoblaste. Cette vacuole est irrégulière et bordée par des vésicules mais son agrandissement conduisant à la vacuole postérieure quasi-sphérique de la spore s'effectue tardivement, après achèvement de la mise en place du tube polaire. Vinckier (1975) a décrit chez *Nosema sp.* une ébauche vacuolaire en position postérieure sous la forme d'un réseau de vésicules et de tubules golgiens. La vacuole est donc un organite permanent et probablement très dynamique, dont la fonction en début de sporogonie n'est pas nécessairement celle qu'aura la vacuole postérieure du stade sporal. Chez les levures, la vacuole a un rôle essentiel dans l'autophagie, en dégradant divers composés d'origine endogène par l'intermédiaire d'un jeu d'enzymes hydrolytiques (Huang et Klionsky, 2002). Pour un fonctionnement correct de ces enzymes, le maintien d'un pH acide est accompli par une H<sup>+</sup>-ATPase de type V. Plusieurs gènes codent les homologues de différentes sous-unités de cette ATPase chez *E. cuniculi* mais les informations sont manquantes pour sa localisation intracellulaire. La membrane de la vacuole représente toutefois le meilleur candidat. De façon surprenante, chez la microsporidie de poisson *Spraguea lophii*, la vacuole postérieure de la spore est le siège d'une activité catalasique assurant la dégradation du peroxyde d'hydrogène (Weidner et Findley, 2003) et un homologue de catalase bactérienne a été identifié chez la microsporidie d'insecte *Antonospora locustae* (Fast *et al.*, 2003). Un rôle dans la résistance des spores aux stress environnementaux a alors été postulé. Chez *E. cuniculi*, aucun homologue de catalase n'a été mis en évidence. Le contenu vacuolaire est très opaque aux électrons, évoquant une réaction au plomb de sites riches en phosphate inorganique. La vacuole des levures contient des polyphosphates inorganiques, composés à potentiel énergétique élevé, dont la masse totale représente 10-20%



de la masse sèche de la cellule (Kornberg, 1999). La capacité d'hydrolyse de tels composés dans la vacuole postérieure d'*E. cuniculi* mériterait d'être étudiée pour envisager un rôle potentiellement plus significatif que celui de l'hydrolyse du tréhalose dans l'accroissement de pression osmotique requis pour la germination.

Il reste intéressant de suivre en 3D la progression du cycle de développement chez *E. cuniculi* pour comparer, par exemple, les images de division du méronte et du sporonte ou pour tenter de lever des incertitudes à propos notamment du début de la biogenèse du tube polaire et de sa relation avec la mise en place du capuchon polaire. La rapidité des événements associés à la germination sporale a fait proposer des hypothèses plus ou moins contradictoires sur le mécanisme de cette germination. Des études sur les structures les plus ténues et la succession de phénomènes rapides sont souhaitables mais ne sont envisageables qu'au moyen de la technique de tomographie cellulaire.



## 2. EXPRESSION DE DEUX PROTEINES PARIETALES AU COURS DU DEVELOPPEMENT INTRACELLULAIRE D'*E. CUNICULI*: UNE ANALYSE EN IMMUNOCYTOCHIMIE ET EN HYBRIDATION *IN* *SITU* SUR (RYOCOUPES ULTRAFINES

---

Le cycle de développement de la microsporidie *E. cuniculi* est asynchrone. De ce fait, l'étude de l'expression différentielle de gènes par des méthodes classiques appliquées à des échantillons de population prélevés à différents temps de post-infection est source d'erreurs d'interprétation. Une approche par hybridation *in situ* (HIS) en microscopie électronique à transmission sur coupes ultrafines de cellules parasitées, sans inclusion préalable en résine, a donc été privilégiée. Cette méthode est particulièrement réputée en immunocytochimie pour la combinaison d'une excellente préservation antigénique avec une haute sensibilité et une accessibilité directe des anticorps aux antigènes cellulaires.

La technique de coupes à congélation a tout d'abord été adaptée au modèle microsporidien. Cela a impliqué l'optimisation de plusieurs paramètres : mode de cryoprotection, congélation dans l'azote pâteux, vitesse et température de réalisation des coupes... Les sondes utilisées pour l'hybridation étaient des oligonucléotides de synthèse biotinylés et les hybrides ont été détectés par une méthode immunologique. La mise au point de cette technique a été effectuée avec des sondes pour les ARN ribosomiques. Par la suite, notre intérêt s'est porté sur les ARN messagers codant deux protéines de la paroi sporale: SWP1, spécifique de l'exospore, et EnP1, spécifique de l'endospore. Parallèlement, les protéines correspondantes ont été localisées par immunomarquage.

Le dépôt de la protéine SWP1 s'effectue au niveau de protubérances lamellaires caractéristiques de la transition méronite-sporonte. La protéine EnP1 apparaît plus précocement au niveau de la membrane plasmique du méronite avant d'être ciblée à l'endospore s'épaississant chez le sporoblaste. L'ARN messager de *swp1* est synthétisé durant la sporogonie alors que l'ARNm de *enp1* est transcrit durant la mérogonie et la sporogonie, concordant avec la présence de la protéine. La quantité de ces deux messagers est



considérablement réduite dans la spore mature. Cette étude révèle de façon inattendue que, tant au niveau de la transcription du messenger qu'au niveau du transport de la protéine à la surface du parasite, EnP1 est exprimée avant SWP1, contredisant en partie une séquence de biogenèse de paroi (formation de l'exospore puis de l'endospore) proposée sur des bases purement cytologiques.



**Expression of two cell wall proteins during the intracellular development of  
*Encephalitozoon cuniculi* : an immunocytochemical and *in situ*  
hybridization study with ultrathin frozen sections**

Vanessa Taupin, Guy Méténier, Frédéric Delbac, Christian P. Vivarès and Gérard Prensier

Publié dans Parasitology



# Expression of two cell wall proteins during the intracellular development of *Encephalitozoon cuniculi*: an immunocytochemical and *in situ* hybridization study with ultrathin frozen sections

V. TAUPIN, G. MÉTÉNIER, F. DELBAC, C. P. VIVARÈS and G. PRENSIER\*

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

(Received 7 October 2005; revised 16 November 2005; accepted 22 November 2005; first published online 10 February 2006)

## SUMMARY

The microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* is an obligate intracellular parasite that develops asynchronously inside parasitophorous vacuoles. Spore differentiation involves the construction of a cell wall commonly divided into an outer layer (exospore) and a thicker, chitin-rich inner layer (endospore). The developmental patterns of protein deposition and mRNA expression for 2 different spore wall proteins were studied using immunocytochemical and *in situ* hybridization procedures with ultrathin frozen sections. The onset of deposition of an exospore-destined protein (SWP1) correlated with the formation of lamellar protuberances during meront-to-sporont conversion. No evidence for a release of SWP1 towards the parasitophorous vacuole lumen was obtained. An endospore-destined protein (EnP1) was detected early on the plasma membrane of meronts prior to extensive accumulation within the chitin-rich layer of sporoblasts. *swp1* mRNA was preferentially synthesized in early sporogony while *enp1* mRNA was transcribed during merogony and a large part of sporogony. The level of both mRNAs was reduced in mature spores. Considering the availability of the *E. cuniculi* genome sequence, the application of nucleic and/or protein probes to cryosections should facilitate the screening of various genes for stage-specific expression during microsporidian development.

Key words: microsporidia, *Encephalitozoon cuniculi*, spore wall proteins, cryo-ultramicrotomy, immunolocalization, *in situ* RNA hybridization.

## INTRODUCTION

Microsporidia are a group of unicellular eukaryotes, all living as obligate intracellular parasites and forming small spores able to persist in the environment (Wittner and Weiss, 1999). These organisms infect many animals and several species are responsible for opportunistic diseases in immunocompromised humans (Didier, 2005). The initiation of microsporidian invasion requires the extrusion at the spore apex of a very long and coiled structure, the polar tube, through which the sporoplasm is pushed to enter into a potential host cell (Franzen, 2004). After sporoplasm internalization, the development of the parasite comprises a proliferative phase or merogony (multiplication of meronts) and a differentiation phase or sporogony that starts with the conversion of meronts into sporonts, marked by the formation of an electron-dense cell coat. Sporonts then divide to give sporoblasts that undergo spore differentiation, involving the biogenesis of a thick bipartite wall (outer part: exospore; inner

part: endospore) and of a characteristic set of cytoplasmic structures (polar tube, anchoring disk, polaroplast, posterior vacuole) commonly named the invasion apparatus. In *Encephalitozoon* species, all steps of the intracellular cycle occur inside a specialized vacuole of the host cell (parasitophorous vacuole). Spores are released in close environment after host cell lysis.

The programme of differential gene expression related to microsporidian spore differentiation is still poorly known. The best characterized proteins of *Encephalitozoon* spores are PTP1, PTP2 and PTP3 located to the polar tube (Delbac *et al.* 1998b, 2001; Keohane *et al.* 1998; Peuvél *et al.* 2000, 2002) and SWP1 assigned to the exospore (Böhne *et al.* 2000; Hayman *et al.* 2001). A long-duration IgG antibody response to SWP1 has been observed in an immunocompetent individual that was infected with *Encephalitozoon cuniculi* (van Gool *et al.* 2004). A transcriptional control of the synthesis of such proteins has been inferred from reverse-transcription PCR (RT-PCR) assays with RNA from infected mammalian cell cultures (Böhne *et al.* 2000; Hayman *et al.* 2001; Peuvél *et al.* 2002). However, it should be stressed that the timing of mRNA content variations after contact of spores with tissue cultures cannot

\* Corresponding author. Tel: +33 4 73 40 53 22. Fax: +33 4 73 40 76 70. E-mail: gerard.prensier@univ-bpclermont.fr



be strictly applied to the succession of cell stages characterizing the progression of *Encephalitozoon* development. One major reason is that merogonic and sporogonic stages co-exist in parasitophorous vacuoles, their enlargement involving both multiplication of meronts close to the vacuole membrane and multi-step formation of spores inside the remaining vacuolar space (Sprague and Vernick, 1971; Shadduck, Bendele and Robinson, 1978). Moreover, there is no precise information about the duration of individual developmental steps.

A recent study in our laboratory has led to the molecular characterization of 2 novel *E. cuniculi* wall proteins (EnP1 and EnP2) that were targeted to the endospore (Peuvel-Fanget *et al.* 2006). A very high representation of *enp1* mRNA in a cDNA library was suggestive of a highly abundant mRNA in *E. cuniculi* cells. This encouraged us to test a protocol of *in situ* hybridization (ISH) on ultrathin frozen sections, as an attempt to better correlate mRNA fluctuations with transmission electron microscopy (TEM)-identified microsporidian stages. In this study, the use of immunocytochemical and ISH techniques coupled with cryo-ultramicrotomy allowed a comparison of exospore SWP1 and endospore EnP1 in terms of protein deposition and mRNA level changes during parasite development.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Cell cultures

*Encephalitozoon cuniculi* was propagated in culture with Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) or Human Foreskin Fibroblast (HFF) cells in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 5% fetal calf serum and 2 mM glutamine, at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

##### Electron microscopy

Infected MDCK or HFF cells were fixed for 1 h in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, scrapped off, concentrated by centrifugation at 1700 g for 15 min and finally rinsed in the same buffer for 30 min. In the cryosectioning method (Tokuyasu, 1973), cells were infiltrated with 2.3 M sucrose for 16 h, then frozen in slush nitrogen at 10<sup>-6</sup> Torr and stored in liquid nitrogen. Ultrathin frozen sections (85–100 nm in thickness) were obtained using a dry sectioning device at -110 °C with an UltracutS Leica ultramicrotome fitted with the low-temperature sectioning system FC4. Sections were mounted on collodion-coated nickel grids, stored in 2.3 M sucrose at 4 °C, and then used for either protein immunolocalization or RNA hybridization. For comparison, infected cells were also embedded in a hydrophilic resin. After dehydration, cells were infiltrated in 50% ethanol-50% Unicryl<sup>TM</sup> resin (British Bio-Cell

International) overnight at 4 °C. The polymerization was performed for 3 days in pure Unicryl<sup>TM</sup> over UV light at -20 °C. The sections were cut at 85 nm thickness. All sections were viewed at 80 keV under a 1200EX Jeol transmission electron microscope.

##### Protein immunocytochemistry

The monoclonal antibody Mab 11A1 reacting specifically with SWP1, was kindly provided by Dr W. Böhne (Department of Bacteriology, University of Göttingen, Germany). Mouse polyclonal antibodies were previously raised against EnP1 (anti-01\_0820 antisera) in our laboratory by Drs I. Peuvel-Fanget and F. Delbac. Specificity was checked by Western blotting. After 30 min of PBS washing, ultrathin frozen sections were blocked for 30 min with 1% ovalbumin-PBS, incubated for 2 h with primary mouse antibodies, diluted at 1:100 in PBS, washed and incubated for 1 h with a 1:100 dilution of a goat anti-mouse IgG conjugated with 5 nm colloidal gold particles (Sigma). Grids were washed then stained in 0.8% uranyl acetate-1.6% methylcellulose before TEM observation. Controls were carried out either with pre-immune sera or without primary antibody.

##### Oligonucleotide probes

From the complete genome sequence of *E. cuniculi* (Katinka *et al.* 2001), oligonucleotide sequences (22–25 bases) were designed for the targeted mRNAs, using bioinformatic tools associated with an ACeDB database in our laboratory. The primers used for ISH were 5'-CCGGCTCGATGCACA CTTCGGAGC-3' and 5'-CATGGTCGTTCCA GTAGAGCACG-3' for *enp1* (coding sequence ECU01\_0820, GenBank Accession number CAD 24952), 5'-GCCTGATCCGCTTCCGCTTGATC C-3' and 5'-CCGCTTCCATCTGATCCGCTT CC-3' for *swp1* (coding sequence ECU10\_1660, GenBank Accession number CAD25887). Five oligonucleotides specific for 5.8S and 23S rRNA sequences were also determined. No potential hybridization with other *E. cuniculi* RNAs was predicted, even when authorizing 5 mismatches. Biotinylated oligonucleotide probes were synthesized by solid-phase phosphoramidite chemistry and labelled by tailing 3' ends with biotin (Eurogentec).

##### RNA in situ hybridization

An RNA hybridization technique for cryosections was developed on the basis of the various protocols described by Morel and Cavalier (2000). Sections from either Unicryl<sup>TM</sup>-embedded or frozen material were washed in 2× SSC (Standard Sodium Citrate) buffer and incubated for 1 h at room temperature in the hybridization buffer without the probe.



Hybridization was performed for 3 h at 37 °C in a buffer containing 30% deionized formamide, 4× SSC, 2× Denhardt's solution (0.04% BSA, 0.04% Ficoll 400, 0.04% polyvinylpyrrolidone 360) and 0.1–1 μM of each oligonucleotide. Grids were washed for 10 min in 4X SSC and 3 times for 10 min each in 2× SSC, then fixed for 5 min in 4% paraformaldehyde-2× SSC. After washing in 2× SSC for 30 min, grids were incubated with 2% ovalbumin in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 30 min. Hybridized biotin probes were reacted for 1 h with a goat anti-biotin antibody (Sigma) diluted to 1:50 with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, 300 mM NaCl, and rinsed for 30 min in the same buffer. Grids were subsequently treated for 1 h with a 1:50 dilution of rabbit anti-goat IgG 5 nm gold conjugate (Sigma) in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, 300 mM NaCl, washed twice for 10 min each in the same buffer then in 2× SSC. After a final rinse for 10 min in distilled water, cryosections were contrasted with 0.8% uranyl acetate-1.6% methylcellulose. Resin sections were stained with 2% uranyl acetate-50% ethanol. Different controls were performed: (a) hybridization with oligonucleotides specific to *E. cuniculi* (5.8S and 23S) rRNA as a positive control, (b) omission of the probes, (c) hybridization with a labelled sense probe, (d) omission of the different antibodies. Host cell regions that were negative for parasite mRNA expression served as internal control. The largest cross-sections of parasite cells (more than 1.4 μm<sup>2</sup>) were selected for counting gold particles (8–12 cells per stage sample). Areas were determined after cutting cell profiles on electron micrograph hard copies and weighting.

## RESULTS

### *Structural preservation of cryo-sectioned Encephalitozoon cuniculi cells*

Hydrophilic resin-embedding methods have previously been used for investigating the localization of microsporidian antigenic proteins such as *Encephalitozoon* PTPs (Keohane *et al.* 1998; Delbac *et al.* 2001) and SWPs (Böhne *et al.* 2000; Hayman *et al.* 2001). The ultrastructural preservation of membrane systems was generally poor, compared with that observed in standard conditions of epoxy resin embedding. Cryo-ultramicrotomy is known to avoid most preparation artifacts even if some local distortions may persist. In addition, frozen sections offer a high sensitivity for hybridization experiments. A cryosectioning method was therefore applied to samples of *E. cuniculi*-infected cell cultures, using saccharose as cryoprotectant, slush nitrogen for freezing, very low temperatures for cutting and methylcellulose as a final embedding agent.

A section of an *E. cuniculi* mature spore after usual epoxy resin embedding is shown in Fig. 1A. Some

parts of the invasion apparatus could be identified and the 2 major layers of the spore wall were easily distinguished on the basis of both thickness and staining intensity. Numerous ribosomes accounted for the electron-dense character of the cytoplasm. The images from ultrathin frozen sections (Figs 1B–4C) were of particular interest for a better discrimination of meronts, sporonts and early sporoblasts when referring to some changes in cell shape and complexity of cell surface. Cisternae of the endoplasmic reticulum were clearly visible, which was rarely the case on Unicryl™ sections. Vesicles of various sizes could be mainly related to the non-dictyosomal Golgi apparatus and steps of biogenesis of the polar tube and polaroplast in sporoblasts. The close junction between the meront plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane was also preserved (Figs 3B, C and 4A). This junction at the host-parasite interface is possibly permeable to allow an extensive transport of molecules required for meront growth.

### *Immunolocalization of SWP1 and EnP1 proteins*

The precursors of *E. cuniculi* SWP1 and EnP1 proteins, with a cleavable signal peptide, were encoded by single-copy genes on 2 different chromosomes (ECU10\_1660 on chromosome X for SWP1; ECU01\_0820 on chromosome I for EnP1). No homologue was found in non-microsporidian organisms. The apparent molecular sizes of mature proteins deduced from SDS-PAGE and Western blot analysis were 51 kDa for SWP1 (Böhne *et al.* 2000) and 40 kDa for EnP1 (Peuvel-Fanget *et al.* 2006), close to the predicted sizes. The localization of EnP1 in the inner layer (endospore) of the *E. cuniculi* spore wall has been demonstrated by TEM immunocytochemistry on Unicryl™ sections (Peuvel-Fanget *et al.* 2006). In this study, to obtain images of antigen localization that could be more easily correlated with those of mRNA localization in similar *E. cuniculi* cell stages, cryosections were treated with anti-SWP1 and anti-EnP1 antibodies. Negative controls are illustrated in Fig. 1B and C.

No significant gold labelling with anti-SWP1 antibody was detected in typical meronts (not shown). The first sign of SWP1 localization was represented by restricted areas of the corrugated cell surface ('lamellar patches') characteristic of the meront-sporont transitional stage (Fig. 2A). As expected, gold particles were distributed over the whole coat of sporonts to become specifically associated with the outer wall layer of late sporoblasts and spores (Fig. 2B). In sections treated with anti-EnP1 antibody, meronts exhibited regularly a slight labelling of the cytoplasm and plasma membrane (Fig. 2C), suggesting that EnP1 begins to be synthesized very early in merogony. All sporogonic stages were strongly reactive. Gold particles were



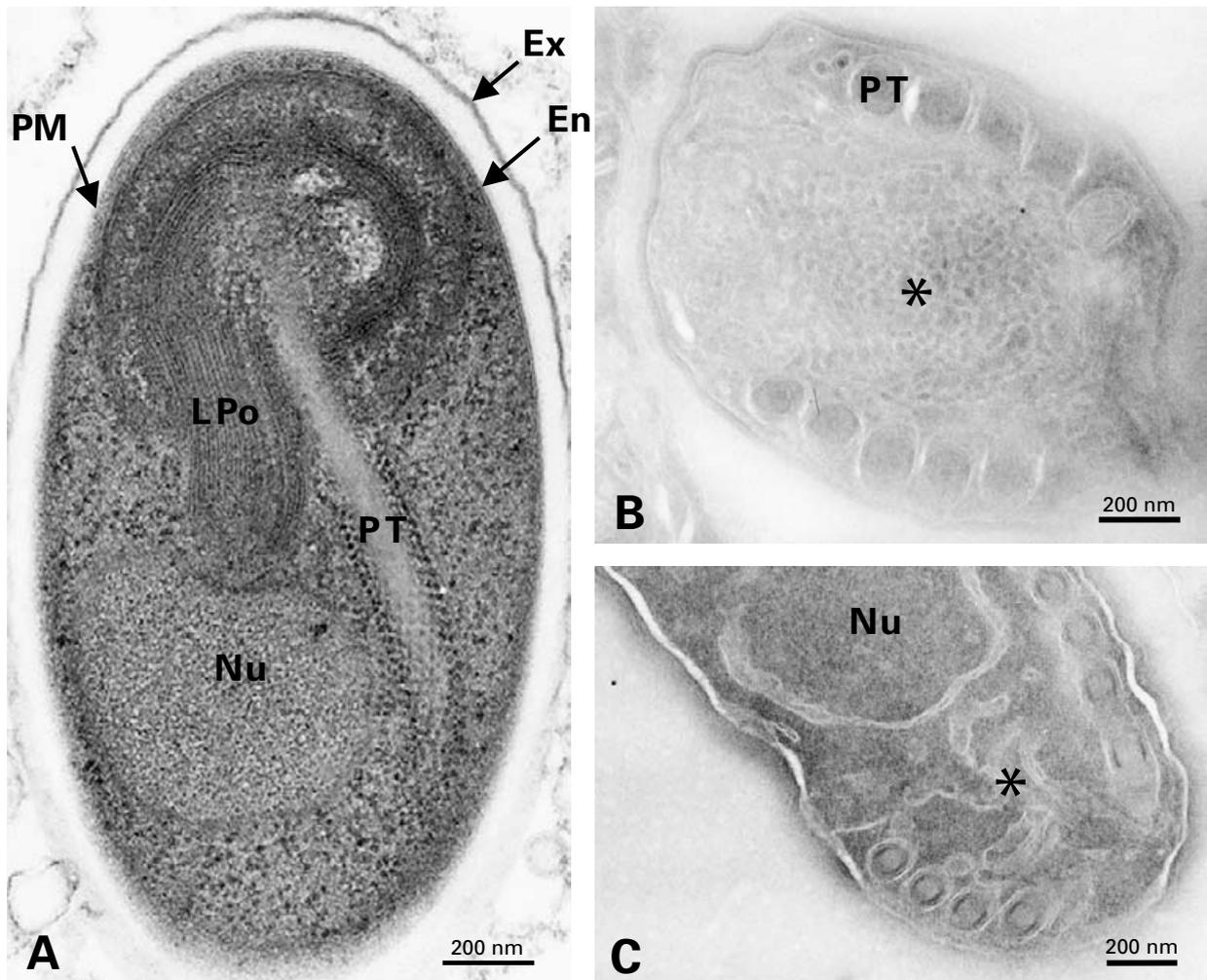


Fig. 1. (A) Longitudinal section of an *Encephalitozoon cuniculi* spore after standard epoxy resin embedding. Two spore wall layers are distinguished: the thin electron-dense exospore (Ex) and the thick electron-translucent endospore (En) closer to the plasma membrane (PM). The nucleus (Nu), the lamellar part of the polaroplast (LPo) and the straight anterior part of the polar tube (PT) surrounded by numerous ribosomes are visible. (B-C) Ultrathin frozen sections of *E. cuniculi* sporoblasts (control experiment without primary antibody for protein immunolocalization). The formation of polar tube (PT) coils involves the fusion of numerous tubulovesicular elements and a close association with the cortical region.

preferentially located throughout the wall layer that strongly increases in thickness during spore differentiation and will give the endospore (Fig. 2D, E). Considering this thickening, a nearly continuous deposition of EnP1 likely occurs in sporoblasts. This is also supported by the persistence of a slight cytoplasmic labelling that may reflect the continuation of synthesis and transport processes. The number of gold particles associated with endoplasmic reticulum and Golgi vesicles was generally low, suggesting a high rate of intracellular transport of these wall proteins.

#### *Detection of swp1 and enp1 mRNAs by in situ hybridization (ISH)*

In preliminary experiments, the TEM ISH technique was used for detecting *swp1* mRNA in sections

of Unicryl<sup>TM</sup>-embedded *E. cuniculi* cells, in spite of a rather mediocre ultrastructural preservation. Hybridization signals were very rare, casting doubt on their specificity. Additional tests were done with probes for 2 other mRNAs (*enp2* for another endospore protein, *ptp1* for a polar tube protein) or with another hydrophilic resin (LR White, London Resin Company, Berkshire, UK). No convincing data were obtained. Further ISH experiments were carried out on ultrathin frozen sections and initially applied to the detection of abundant ribosomal RNAs (5.8S and 23S rRNAs). Hybridization signals were observed in all *E. cuniculi* developmental stages, as shown in Fig. 3A for a meront and in Fig. 3B for a sporont. The best results were obtained with a 0.1  $\mu$ M probe concentration, using different rRNA probes incubated for 3 h in the hybridization buffer and paraformaldehyde for hybrid stabilization.



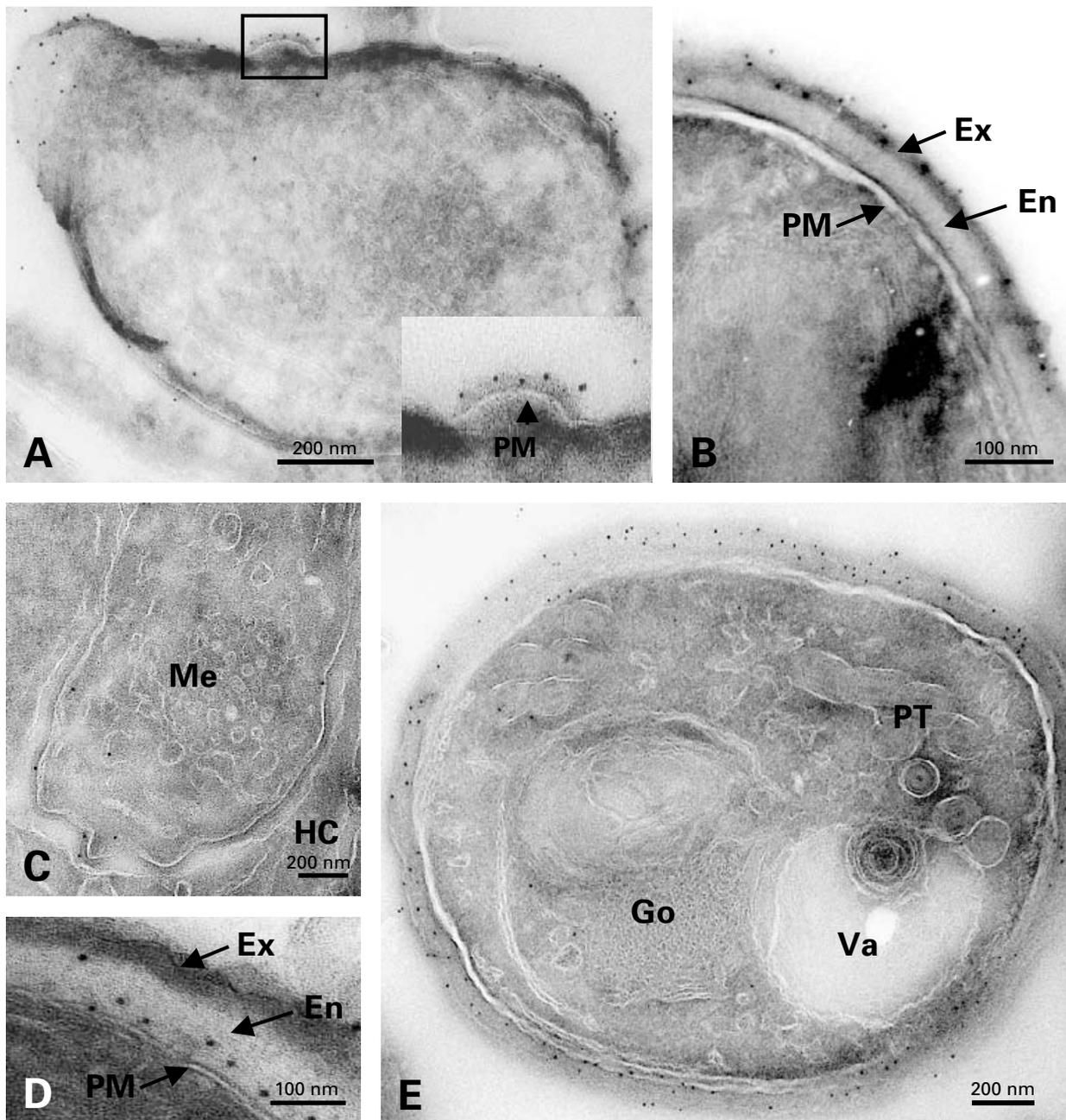


Fig. 2. (A–B) Immunolocalization of SWP1 on cryosections of *Encephalitozoon cuniculi* cells. Gold labelling can be seen on lamellar patches apposed to the plasma membrane in a developing sporont and on the outer wall layer in a late sporoblast. (C–E) Immunolocalization of EnP1 on cryosections of *E. cuniculi* cells. (C) Slight reactivity to anti-EnP1 of the cell surface of a meront (Me) lying at the periphery of the parasitophorous vacuole. HC, host cell. (D) Labelling of the thickened cell coat in a spore. (E) In a late sporoblast containing typical polar tube (PT) elements, gold particles are distributed throughout the endospore. Go, Golgi vesicles. Va, vacuole.

There was no cross-reactivity with host cell rRNAs.

Cryosections were found to be also favourable to the detection of *swp1* and *enp1* mRNAs. The specificity of the reaction was confirmed by the absence of signal in controls without either probe or primary antibody, as well as in those with a complementary or antisense probe. With regard to *swp1* mRNA, only a few gold particles were associated with meront cytoplasm (Fig. 3C). Gold labelling clearly increased in the cytoplasm of sporonts (Fig. 3D) and early

sporoblasts. A low level in mature spores (Fig. 3E, F) was suggestive of a decrease during late sporogony. Contrastingly, hybridization signals for *enp1* mRNA were abundantly detected in meronts (Fig. 4A). This mRNA was also represented in sporoblasts, including stages that were deeply engaged in the assembly of the polar tube and polaroplast (Fig. 4B). A slight labelling of mature spores (Fig. 4C) may be significant because the background was low and the gold particles were located on electron-dense cytoplasmic zones known to be rich in ribosomes. In an attempt to



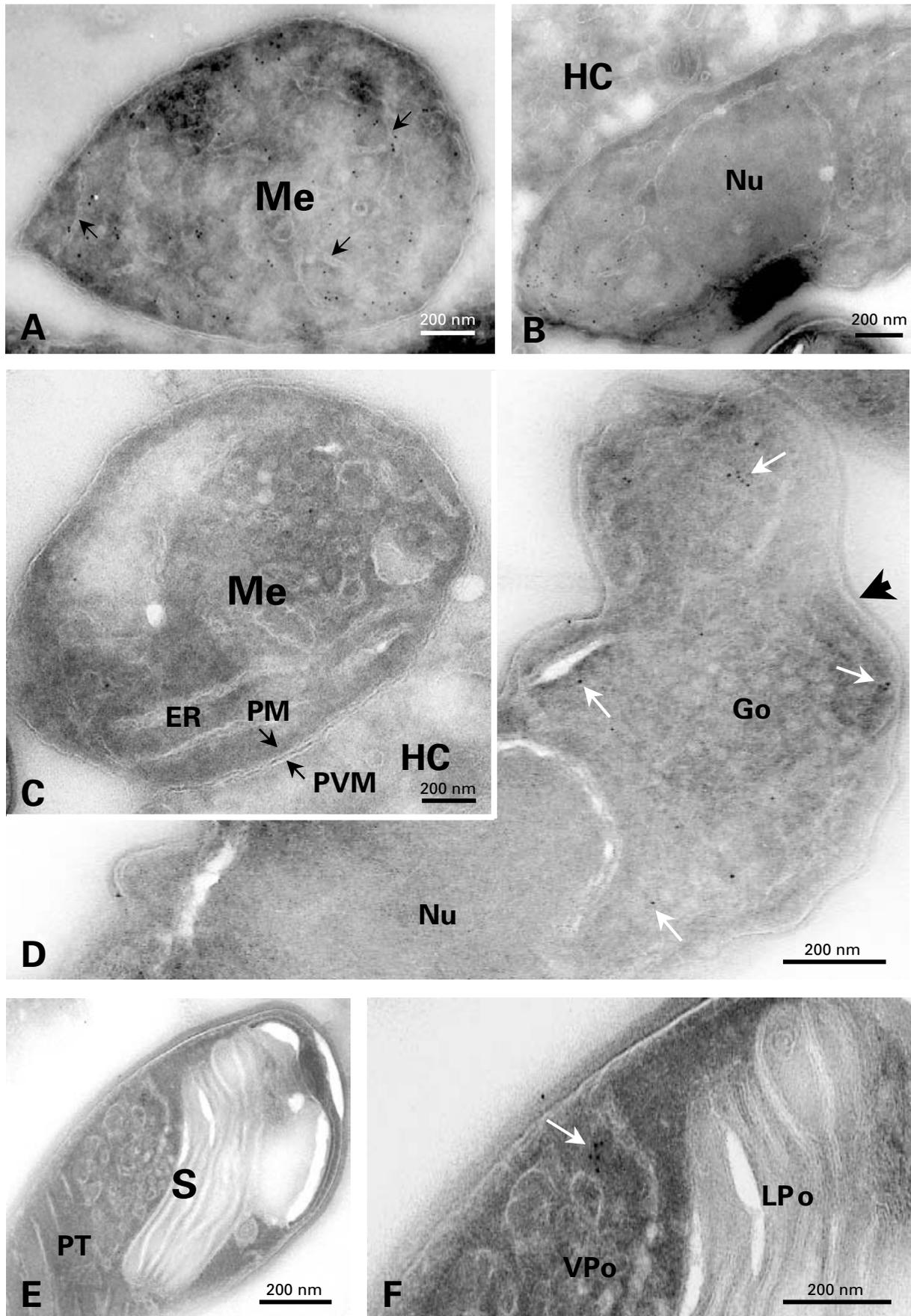


Fig. 3. *In situ* hybridizations on cryosections of *Encephalitozoon cuniculi* cells. (A–B) Hybridization with rRNA probes. Cytoplasmic labelling in meront (A) and sporont (B) stages. Arrows indicate some elements of endoplasmic reticulum. No gold labelling is observed on the host cell (HC). (C–F) *swp1* mRNA hybridization. (C) Meront (Me) with a very



quantify the mRNA level changes during *E. cuculii* development, the number of gold particles was counted on large cross-sections of parasite cells then calculated for a same area unit. Significant differences between the considered cell stages were found for each mRNA (Fig. 5). Meronts display the lowest value for *swp1* mRNA and the highest one for *enp1* mRNA. The sporont-sporoblast class is marked by a 5-fold increase of *swp1* mRNA level and a decrease (~60%) of *enp1* mRNA level. A subsequent reduction occurs in spores for both mRNAs. As the different probes may not have identical hybridization efficiencies, the comparison of the values obtained for *swp1* and *enp1* in a same cell stage may be not valid. However, it seems reasonable to think that *enp1* mRNA is globally more abundant or more stable than *swp1* mRNA because of a very significant expression during a larger part of the parasite cycle as of a higher frequency in cDNA library and a higher relative amount deduced from RT-PCR experiments at different post-infection times (Peuvel-Fanget *et al.* 2006).

#### DISCUSSION

Cryo-ultramicrotomy has been used successfully to localize 2 antigenic proteins and corresponding mRNAs in cell stages of the microsporidian *Encephalitozoon cuculii*. From a technical point of view, cryosectioning offered a good compromise between cytological preservation and labelling specificity and intensity. In particular, the internal membranes of meronts and early differentiating stages were better preserved than after embedding in hydrophilic resins. Ultrathin frozen sections of 3 microsporidian species belonging to different genera (*Antonosporea locustae*, *Brachiola algerae* and *Nosema bombycis*) also gave us high quality images (data not shown), which is encouraging for further comparative studies. As far as we know, only one ultra-cytochemical study using cryosections has been reported previously for microsporidia. A mitochondrial HSP70 homologue was shown to be localized inside small double-membrane bounded vesicles of the meronts and sporonts of *Trachipleistophora hominis*, providing first experimental evidence of relict mitochondrion-derived organelles (mitosomes) in microsporidia (Williams *et al.* 2002). Likewise, mitosomes were identified in the diplomonad *Giardia intestinalis* after treatment of frozen sections with antibodies raised against 2 mitochondrial

markers (Tovar *et al.* 2003). Cryosectioning has therefore proven to be useful in the visualization of cryptic organelles in unicellular parasites.

The SWP1 and EnP1 proteins here considered were good molecular markers for the two major layers of the *Encephalitozoon* spore. The exospore shares an electron-dense appearance with the coat of sporonts, suggesting that its biogenesis is initiated during early sporogony. Two exospore glycoproteins (SWP1 and SWP2) have been identified in *E. intestinalis* and immunolocalization experiments have shown that SWP1 is initially deposited on the surface of early sporonts while SWP2 is first detected on fully formed sporonts (Hayman *et al.* 2001). In the case of the unique SWP1 protein in *E. cuculii*, the first stages to have a SWP1-positive cell surface were also shown to be developing sporonts (Böhne *et al.* 2000). This has been verified in our study with frozen sections. The patchy labelling pattern fits with the scalloped appearance of transitional stages from meront to sporont. We assume that SWP1 deposition contributes to the relaxation of the attachment of meronts to the parasitophorous vacuole (PV) membrane. Curiously, some 'tubular' appendages reacting with anti-SWP1 were claimed to extend from spores to the PV lumen in *E. cuculii*, leading to the hypothesis of a release of SWP1 from mature spores (Böhne *et al.* 2000). It is known that *E. intestinalis*, not *E. cuculii*, induces the formation of a septated PV characterized by a network of fibrous septa enclosing individual spores (Cali, Kotler and Orenstein, 1993). The contribution of exospore proteins to septa formation in *E. intestinalis* is supported by the strong reactivity of these septa with an antibody recognizing a 125 kDa exospore protein that remains to be analysed at the sequence level (Prigneau *et al.* 2000). In contrast, a study on the localization of both SWP1 and SWP2 in *E. intestinalis* did not provide evidence for reactive septa and 'tubular' projections (Hayman *et al.* 2001). We also failed to identify SWP1-containing elements within the *E. cuculii* PV lumen. Additional investigations are therefore required to determine whether SWP1 is really released in the PV, or not.

The endospore is electron lucent under standard staining conditions and extends between the plasma membrane and the exospore. Chitin is the major endospore component and has been visualized as a complex network of thick fibrils in deep-etched preparations (Bigliardi *et al.* 1996). During microsporidian development, the intercalation of poorly

---

faint cytoplasmic labelling. Note the close junction between the parasite plasma membrane (PM) and the parasitophorous vacuole membrane (PVM). ER, endoplasmic reticulum. HC, host cell. (D) Expression of *swp1* mRNA in a sporont. White arrows indicate some individual or clustered gold particles. Black arrow shows the typical SWP1-containing electron-dense coat. Go, Golgi vesicles. Nu, nucleus. (E) Reduced labelling in a mature spore (S). Polar tube (PT) coils are seen in the posterior region of the spore. (F) Enlarged part of (E), centered on a small cluster of gold particles (arrow). LPo, lamellar polaroplast. VPo, vesicular polaroplast.



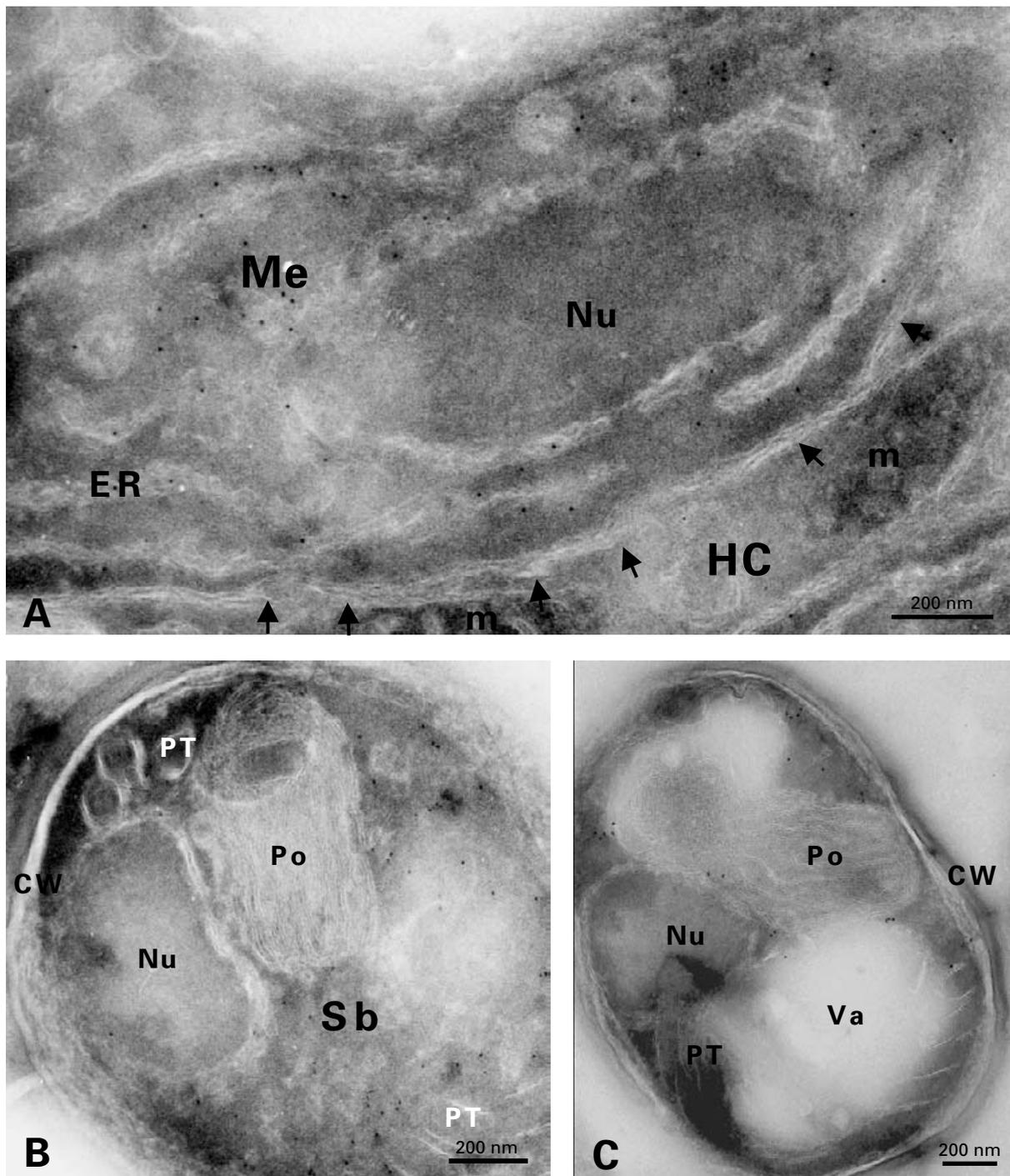


Fig. 4. *In situ* hybridizations on cryosections of *Encephalitozoon cuniculi* cells for the detection of *enp1* mRNA. (A) High abundance of *enp1* mRNA in a meront (Me). Most gold particles are seen close to endoplasmic reticulum (ER) cisternae. Arrowheads show the parasitophorous vacuole membrane adjacent to the meront plasma membrane. Mitochondria (m) of the host cell (HC) are frequently found near the junction with the parasite cell. Nu, nucleus. (B) In a sporoblast (Sb), hybridization signals are associated with ribosome-rich cytoplasmic areas extending between precursor structures of the polar tube (PT) and polaroplast (Po). CW, cell wall. Nu, nucleus. (C) In the spore stage, hybridization signals are rare (arrows) but specifically restricted to ribosome-containing regions. Note that polar tube (PT) coils are positioned around a large vacuole (Va) in the posterior region of the spore. CW, cell wall. Nu, nucleus. Po, polaroplast.

contrasted material is initiated in newly formed sporoblasts then the corresponding layer increases in thickness until the spore is completely mature. On the basis of morphological criteria, endospore

formation would therefore span all the period required for the differentiation of sporoblasts into spores. The presence of specific proteins in the endospore has been first documented by TEM



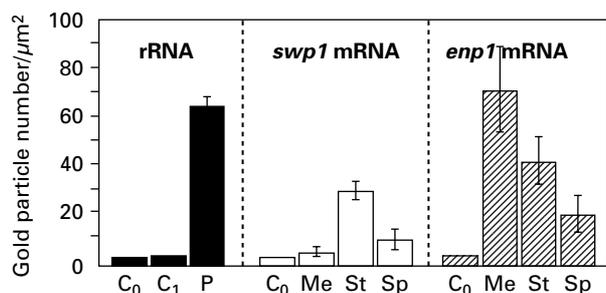


Fig. 5. Levels of mRNAs encoding SWP1 and EnP1 in *Encephalitozoon cuniculi*, as estimated by the labelling intensities after hybridization on cryosections of different cell stages (Me, meronts. St, sporonts-sporoblasts. Sp, spores). The level of rRNA (5.8S + 23S) calculated for all parasite stages is also shown (P). C<sub>0</sub> and C<sub>1</sub> represent controls without oligonucleotide and with a sense probe, respectively. Labelling intensity is expressed as the mean number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of cell area. Vertical bars represent standard deviations.

immunocytochemistry in 2 *Encephalitozoon* species (Delbac *et al.* 1998a; Prigneau *et al.* 2000). This study has revealed a very early deposition of EnP1 on *E. cuniculi* meront stages without cytological sign of meront-sporont transition. It is somewhat surprising that the onset of the migration of EnP1 to the parasite surface precedes that of SWP1, given that the EnP1-containing layer will occupy an inner position in the spore wall. For the same species, it has been demonstrated that a chitin deacetylase-like protein is initially deposited onto developing sporonts with the same patchy pattern as SWP1 but remains distributed at a very close proximity of the plasma membrane in later sporogonic stages including mature spores (Brosson *et al.* 2005). Chitin deacetylase catalyses the conversion of chitin into chitosan, a more resistant polymer that may account for the rigidity of the microsporidian spore wall. Whether chitin deposition begins in very early sporogony and whether the placement of EnP1 throughout the inner wall layer depends on specific interactions with chitin microfibrils are open questions. Various chitin-binding proteins share a common structural motif including a conserved core of 4 intramolecular disulfide bonds, known as the chitin-binding domain type-1 (Wright, Sandrasegaram and Wright, 1991). Such a domain is not predicted in the EnP1 sequence. However, EnP1 is rich in cysteine residues (23 residues; 6.4%) and several disulfide bonds are predicted with a very high score using the web server DiANNA (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA>). A future search for EnP1 homologues in other microsporidia should enable determination of whether a conserved region retains cysteine residues involved in the potential disulfide linkages.

RT-PCR assays have previously been used to study the expression of *swp1* and *swp2* mRNAs during *Encephalitozoon* development (Böhne *et al.*

2000; Hayman *et al.* 2001). The experimental approach consisted of the 'synchronization' of the infection by incubation of host cell cultures with parasite spores for a short period, and the harvesting of infected host cells at different times to perform successively total RNA isolation, reverse transcription and PCR amplification. Compared with beta-tubulin mRNA, the levels of *swp* mRNAs increased strongly between 24 and 72 h, supporting an up-regulation at the transcriptional level. This increase correlates with the accumulation of parasite cells inside numerous PVs but the relation with peculiar developmental stages remains unclear. All of these stages are indeed present in large PVs. Therefore, a TEM ISH approach was of interest to investigate mRNA expression in microsporidia for which no protocol of isolation of merogonic stages exists. One example of successful application of TEM ISH to the analysis of the cycle of an intracellular parasite is provided by the report of a stage-specific expression of the ATP/ADP translocator mRNA in *Plasmodium falciparum* (Jambou, Hatin and Jaureguierry, 1995). Here, we have shown that *enp1* and *swp1* transcripts are especially abundant in meront and sporont-sporoblast stages, respectively. This fits with the immunocytochemical detection of EnP1 on meronts and SWP1 on developing sporonts. ISH evidence for *enp1* mRNA in meronts also correlates with the significant level of this mRNA that was detected by RT-PCR in samples of cultures taken at early post-infection times (Peuvel-Fanget *et al.* 2006). The *enp1* mRNA level was still relatively high in sporoblasts, indicating that the accumulation of EnP1 within the future endospore requires the continuation of the transcriptional activity during at least early sporogenesis. Whatever the studied transcript, the intensity of hybridization signals was weak in fully mature spores, which is consistent with the view that these non-dividing cells would be poorly active in transcription. Obviously, the regulation of the expression of spore wall proteins may not depend exclusively on mRNA synthesis.

Much remains to be studied to understand the molecular complexity of the microsporidian spore wall and the dynamics of the secretion of its protein and carbohydrate components. The glycosylated status of SWPs is supported by lectin binding data (Böhne *et al.* 2000; Hayman *et al.* 2001), but the hypothesis of an N-linked oligosaccharide needs in-depth investigations. Indeed, genes homologous to those specifically required for protein N-glycosylation are not found in the genome of *E. cuniculi* and only O-mannosylation has been predicted (Katinka *et al.* 2001; Vivarès and Méténier, 2004). A major polar tube protein (PTP1) in *E. hellem* would be modified by O-linked mannosylation (Xu *et al.* 2004). Experiments are in progress to better characterize carbohydrate chains and glycoproteins in *E. cuniculi*. Finally, the availability



of the *E. cuniculi* genome sequence authorizes the application of ISH on ultrathin frozen sections to numerous gene products. Recent proteomic approaches have revealed that various proteins of unknown function are expressed in the *E. cuniculi* sporadic stage (Texier *et al.* 2005). Further use of corresponding sequences for ISH may be expected to provide significant advances in the knowledge of developmental expression of mRNAs related to that of novel microsporidia-specific proteins.

The authors are gratefully indebted to Dr W. Böhne for the gift of anti-SWP1 monoclonal antibodies. We also thank Dr I. Peuvél-Fanget for providing anti-EnP1 polyclonal antibodies and a copy of the manuscript reporting the identification of two endospore proteins.

## REFERENCES

- Bigliardi, E., Selmi, M. G., Lupetti, P., Corona, S., Gatti, S., Scaglia, M. and Sacchi, L.** (1996). Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **43**, 181–186.
- Böhne, W., Ferguson, D. J., Kohler, K. and Gross, U.** (2000). Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infection and Immunity* **68**, 2268–2275.
- Brosson, D., Kuhn, L., Prensier, G., Vivarès, C. P. and Texier, C.** (2005). The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: a surface protein implicated in microsporidian spore wall formation. *FEMS Microbiology Letters* **247**, 81–90.
- Cali, A., Kotler, D. P. and Orenstein, J. M.** (1993). *Septata intestinalis* N. G., N. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **40**, 101–111.
- Delbac, F., Duffieux, F., David, D., Méténier, G. and Vivarès, C. P.** (1998*a*). Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **45**, 224–231.
- Delbac, F., Peyret, P., Méténier, G., David, D., Danchin, A. and Vivarès, C. P.** (1998*b*). On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Molecular Microbiology* **29**, 825–834.
- Delbac, F., Peuvél, I., Méténier, G., Peyretailade, E. and 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. *Infection and Immunity* **69**, 1016–1024.
- Didier, E. S.** (2005). Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica* **94**, 61–76.
- Franzen, C.** (2004). Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends in Parasitology* **20**, 275–279.
- Hayman, J. R., Hayes, S. F., Amon, J. and Nash, T. E.** (2001). Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infection and Immunity* **69**, 7057–7066.
- Jambou, R., Hatin, I. and Jaureguiberry, G.** (1995). Evidence by *in situ* hybridization for stage-specific expression of the ATP/ADP translocator mRNA in *Plasmodium falciparum*. *Experimental Parasitology* **80**, 568–571.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, 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. and Vivarès, C. P.** (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature, London* **414**, 450–453.
- Keohane, E. M., Orr, G. A., Zhang, H. S., Takvorian, P. M., Cali, A., Tanowitz, H. B., Wittner, M. and Weiss, L. M.** (1998). The molecular characterization of the major polar tube protein gene from *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite of humans. *Molecular and Biochemical Parasitology* **9**, 227–236.
- Morel, G. and Cavalier, A.** (2000). *Hybridation in situ en Microscopie Électronique*. Editions Médicales Internationales, TEC & DOC, Londres, Paris, New-York.
- Peuvél, I., Delbac, F., Méténier, G., Peyret, P. and Vivarès, C. P.** (2000). Polymorphism of the gene encoding a major polar tube protein PTP1 in two microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Parasitology* **121**, 581–587.
- Peuvél, I., Peyret, P., Méténier, G., Vivarès, C. P. and Delbac, F.** (2002). The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **122**, 69–80.
- Peuvél-Fanget, I., Polonais, V., Brosson, D., Texier, C., Kuhn, L., Peyret, P., Vivarès, C. P. and Delbac, F.** (2006). EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. *International Journal for Parasitology* (in the Press).
- Prigneau, O., Achbarou, A., Bouladoux, N., Mazier, D. and Desportes-Livage, I.** (2000). Identification of proteins in *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidian pathogen of immunocompromised humans: an immunoblotting and immunocytochemical study. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **47**, 48–56.
- Shadduck, J. A., Bendele, R. and Robinson, G. T.** (1978). Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Veterinary Pathology* **15**, 449–460.
- Sprague, V. and Vernick, S. H.** (1971). The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia, Nosematidae) and its taxonomic significance. *Journal of Protozoology* **18**, 560–569.
- Texier, C., Brosson, D., El Alaoui, H., Méténier, G. and Vivarès, C. P.** (2005). Post-genomics of microsporidia, with emphasis on a model of minimal eucaryotic proteome: a review. *Folia Parasitologica* **52**, 15–22.
- Tokuyasu, K. T.** (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *Journal of Cell Biology* **57**, 551–565.
- Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., Van Der Giezen, M., Hernandez, M., Müller, M. and Lucocq, J. M.** (2003). Mitochondrial



- remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature, London* **426**, 172–176.
- Van Gool, T., Biderre, C., Delbac, F., Wentink-Bonnema, E., Peek, R. and Vivarès, C. P.** (2004). Serodiagnostic studies in an immunocompetent individual infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Infectious Diseases* **189**, 243–249.
- Vivarès, C. P. and Méténier, G.** (2004). The microsporidia genome: living with minimal genes as an intracellular eukaryote. In *Opportunistic infections: Toxoplasma, Sarcocystis and Microsporidia. World Class Parasites* (ed. Lindsay, D. S. and Weiss, L. M.), pp. 215–242. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Williams, B. A., Hirt, R. P., Lucocq, J. M. and Embley, T. M.** (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature, London* **418**, 865–869.
- Wittner, M. and Weiss, L. M.** (1999). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Wright, H. T., Sandrasegaram, G. and Wright, C. S.** (1991). Evolution of a family of N-acetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin. *Journal of Molecular Evolution* **33**, 283–294.
- Xu, Y., Takvorian, P. M., Cali, A., Orr, G. and Weiss, L. M.** (2004). Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infection and Immunity* **72**, 6341–6350.



### 3. LA GLYCOSYLATION CHEZ LES MICROSPORIDIÉS

---

La quasi-inexistence des données de glycosylation chez les microsporidies nous a fait envisager une caractérisation exhaustive des sucres présents, travail effectué de façon majoritaire à l'aide d'outils simples comme les lectines. Les seules informations disponibles concernaient la présence de N-acétylglucosamine (GlcNAc) pour la polymérisation sous forme de chitine, constituant majeur de l'endospore, et celle de glucose (Glc) pour la dimérisation en tréhalose, glucide de réserve. De plus, d'après la reconstitution du métabolisme potentiel à partir du génome de *E. cuniculi*, les microsporidies semblent capables d'effectuer uniquement la O-glycosylation. Cependant, aucune preuve expérimentale décisive n'a été apportée.

Sont présentés dans ce chapitre, une publication démontrant la mise en œuvre d'une forme de O-mannosylation des protéines et des résultats complémentaires révélant la présence de protéines fucosylées dans la paroi microsporidienne.

#### **3.1. Les O-glycanes majeurs des spores de deux espèces microsporidiennes sont représentés par des oligosaccharides à mannose non ramifiés et présentant des liaisons $\alpha$ -1,2.**

La recherche de motifs glucidiques sur les protéines glycosylées ou "glycoprotéome" est un sujet très riche. C'est dans un contexte de post-protéomique microsporidienne qu'un travail a été initié en collaboration avec le Dr. Y. Guérardel de l'équipe Biodiversité des glycanes et pathologies associées (Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR 8576 à Lille dirigé par le Pr. J-C Michalski). Une composition en monosaccharides à partir d'un extrait de spores a permis de confirmer la présence en très fortes quantités de GlcNAc, Glc et mannose (Man). Ces résultats nous ont incité à réaliser une première analyse structurale de glycanes chez les microsporidies.

La structure des glycanes et leur localisation ont été étudiées chez les spores de deux microsporidies-modèles phylogénétiquement distantes : *Encephalitozoon cuniculi* et *Antonospora locustae*. Montrant une réaction PATAg-positive, le capuchon polaire, élément le plus apical de l'appareil invasif, semble être le site majeur des glycoconjugués intrasporaux.



Une réaction de type PAS appliquée aux protéines séparées par électrophorèse 2D indique une très faible diversité de glycoprotéines. Les lectines à mannose se lient de façon majoritaire au capuchon polaire et reconnaissent quelques bandes (de 20 à 60 kDa) sur des profils électrophorétiques de protéines de *E. cuniculi*.

Des analyses physicochimiques ont permis l'élucidation des structures glycaniques majeures. Les échantillons glycoprotéiques ont été obtenus par extraction drastique d'une quantité importante de spores de *E. cuniculi* et *A. locustae*, soigneusement purifiées afin d'éviter toute contamination par les cellules-hôtes. Des fractions correspondant aux N- et O-glycanes ont été séquentiellement isolées puis soumises à des analyses par chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire. Aucun N-glycane n'a pu être détecté. La fraction O-glycanique est particulièrement homogène par sa composition en oses puisque limitée au mannose. Il s'agit de courtes chaînes linéaires renfermant un maximum de 8 résidus Man liés en  $\alpha$ 1,2, similaires à celles de certains champignons comme *Candida albicans*. Les résultats sont donc en accord avec la prédiction génomique minimale d'une voie de O-mannosylation des protéines.



**Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing  $\alpha$ -1,2 linkages**

Vanessa Taupin, Estelle Garenaux, Muriel Mazet, Emmanuel Maes, Hubert Denise, Gérard Prensier, Christian P. Vivarès, Yann Guérardel and Guy Méténier

Glycobiology, en révision



**Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing  $\alpha$ -1,2 linkages**

**Vanessa Taupin<sup>2</sup>, Estelle Garenaux<sup>3</sup>, Muriel Mazet<sup>2</sup>, Emmanuel Maes<sup>3</sup>, Hubert Denise<sup>2</sup>, Gérard Prensier<sup>2</sup>, Christian P. Vivarès<sup>1,2</sup>, Yann Guérardel<sup>3</sup> and Guy Méténier<sup>2</sup>.**

<sup>2</sup>Equipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, LBP, CNRS UMR6023, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France. <sup>3</sup>Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

<sup>1</sup>For correspondence: E-Mail: [christian.vivares@univ-bpclermont.fr](mailto:christian.vivares@univ-bpclermont.fr); Tel. (+33) 4 73 40 74 57; Fax (+33) 4 73 40 76 70.

*Running title:* Microsporidian O-mannosyl glycans.

*Key words:* glycan analysis/ microsporidia/ O-mannosylation/ polar cap/ ultracytochemistry

**ABSTRACT**

Protein glycosylation in microsporidia, a fungi-related group comprising exclusively obligate intracellular parasitic species, is still poorly documented. Here, we have studied glycoconjugate localization and glycan structures in spores of *Encephalitozoon cuniculi* and *Antonospora locustae*, two distantly related microsporidians invading mammalian and insect hosts, respectively. The polar sac-anchoring disc complex or polar cap, an apical element of the sporal invasion apparatus, was strongly PATAg-positive. Mannose-binding lectins reacted with the polar cap and recognized several bands (from 20 to 160 kDa) on blots of *E. cuniculi* protein extracts. Physicochemical analyses provided the first determination of major glycostructures in microsporidia. O-linked glycans were demonstrated to be linear manno-oligosaccharides containing up to eight  $\alpha$ 1,2-linked mannose residues, thus resembling those reported in some fungi such as *Candida albicans*. No N-linked glycans were detected. The data are in accordance with gene-based prediction of a minimal O-mannosylation pathway. Further identification of individual mannoproteins should help in the understanding of spore germination mechanism and host-microsporidia interactions.

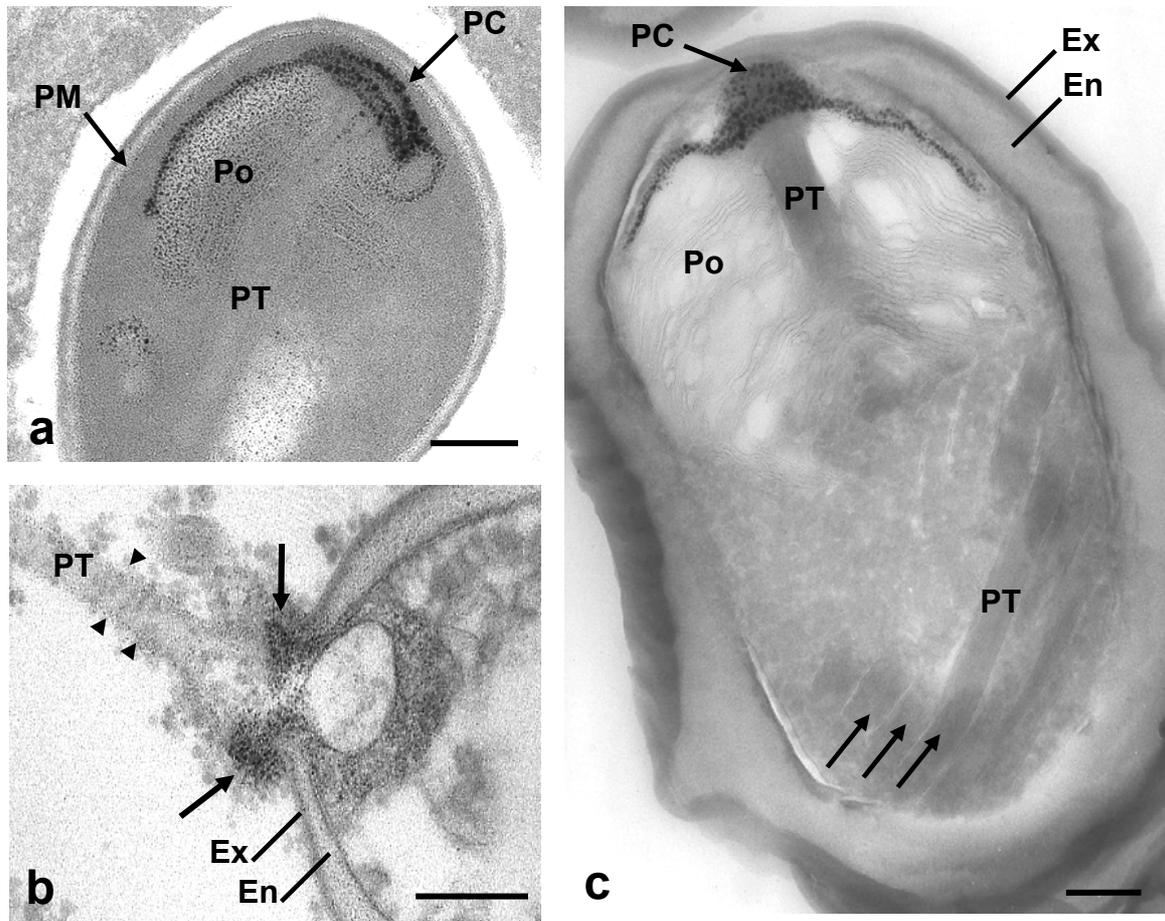


## Introduction

The identification of glycans and glycoconjugates in eukaryotic parasites is of interest for the knowledge of host-parasite interactions and pathogenic determinants (Guha-Niyogi *et al.*, 2001). It is worth noting that the capacity of classical O-linked and N-linked glycosylations can be highly reduced in some species exhibiting an obligate intracellular lifestyle. This is the case of the apicomplexan parasite *Plasmodium falciparum* (malaria agent) in which there is no convincing experimental evidence for O-glycosylation and the frequency of N-glycosylation was estimated to be only one glycan chain per 20-40 protein molecules, the most abundant glycoconjugate structures being GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchors (Gowda *et al.*, 1997b). Accordingly, bioinformatic analysis of the *P. falciparum* genome sequence revealed a sufficient gene complement for GPI anchor biosynthesis but only four potential enzymes of the N-glycosylation pathway and no enzyme characteristic of the synthesis of complex O-linked glycans (Aravind *et al.*, 2003).

Relatively little is known about carbohydrate diversity and glycosylation processes in Microsporidia, an assemblage of over 1200 unicellular eukaryotic species that are all obligate intracellular parasites. These organisms are viewed as highly derived fungi having undergone rapid reductive evolution (Keeling, 2003; Thomarat *et al.*, 2004). Several species are human pathogens and may cause severe diseases in immune-deficient patients (Weiss, 2001). Their development inside host cells comprises a proliferation phase (merogony) followed by a differentiation phase (sporogony) producing small spores that can be released in the environment. Surrounded by a resistant cell wall, the microsporidian spore contains a very long coiled organelle (polar tube) that plays an essential role in the onset of cell invasion. Indeed, the polar tube can be quickly extruded at the apical pole of the spore in order to inject the sporoplasm into a new host cell (Xu et Weiss, 2005). Chitin appears as the major component of the thick inner layer of the spore wall, named the endospore (Bigliardi *et al.*, 1996; Vavra et Larson, 1999). Cytochemical studies failed to detect storage polysaccharides such as glycogen (Vavra, 1972; Vivarès *et al.*, 1976). Analyses of water-extracted intrasporal sugars showed a preponderance of trehalose, a non-reducing disaccharide that may serve as an energy reserve (Dolgikh et Semenov, 2003; Undeen et Vander Meer, 1999). Glycoconjugates should be abundant in a PAS (periodic acid-Schiff)-positive apical region of the spore, called the “polar sac-anchoring disk complex” or “polar cap”, that comprises a dome-shaped vesicular structure closely associated with a discoid element capping the anterior end of the polar tube (Vavra et Larson, 1999). Importantly, immunocompetent humans can develop an immune IgG response against carbohydrate moieties of some proteins located to polar tube and anchoring regions (Peek *et al.*, 2005).

Current biochemical information about microsporidial glycoproteins mainly derives from lectin binding experiments with either whole cell lysates or a purified protein. Blotting of *Glugea plecoglossi* spore extracts with eight different lectins showed that only ConA (concanavalin A) and WGA (wheat germ agglutinin) react with some protein bands (Kim *et al.*, 1999). In *Encephalitozoon intestinalis*, two proteins of the outer spore wall layer (exospore) were assumed to be N-glycosylated on the only



**Fig. 1.** Electron microscopy localization of glycoconjugates with PATAg reaction in microsporidian spores. **a, b.** Epoxy resin sections of *E. cuniculi* spores. **(a)** Strong reactivity of the polar cap (PC) overlying the lamellar polaroplast (Po) and anterior straight part of the polar tube (PT). Polaroplast and plasma membrane (PM) are moderately labeled. **(b)** Section across a germinated spore focusing on the apical aperture surrounded by PATAg positive material (arrows) originating from the polar cap. Note also the reactivity of the surface of the extruded polar tube (arrowheads). **(c)** Cryosection of *A. locustae* spore. Polar cap (PC) labeling is evident. Arrows indicate several coils of the polar tube. Ex, exospore; En, endospore. Bar, 200 nm.

basis of their detection with specific antibodies in the fractions of infected cell lysates that were immobilized on either ConA or WGA-coated agarose beads (Hayman *et al.*, 2001). In contrast, purified *E. hellem* PTP1 (polar tube protein 1) should be O-mannosylated because of its lack of reactivity with an antibody to O-GlcNAc, its binding to only ConA among 10 different lectins and elimination of this binding by NaOH treatment (Xu *et al.*, 2004). The occurrence of O-mannosylation is more in agreement with annotation data for the genome sequence of the closely related species *E. cuniculi*. Indeed, no gene specifically involved in N-glycosylation process was predicted whilst both protein O-mannosyltransferase and  $\alpha$ 1,2 mannosyltransferase homologues were identified (Katinka *et al.*, 2001; Vivarès et Méténier, 2004).

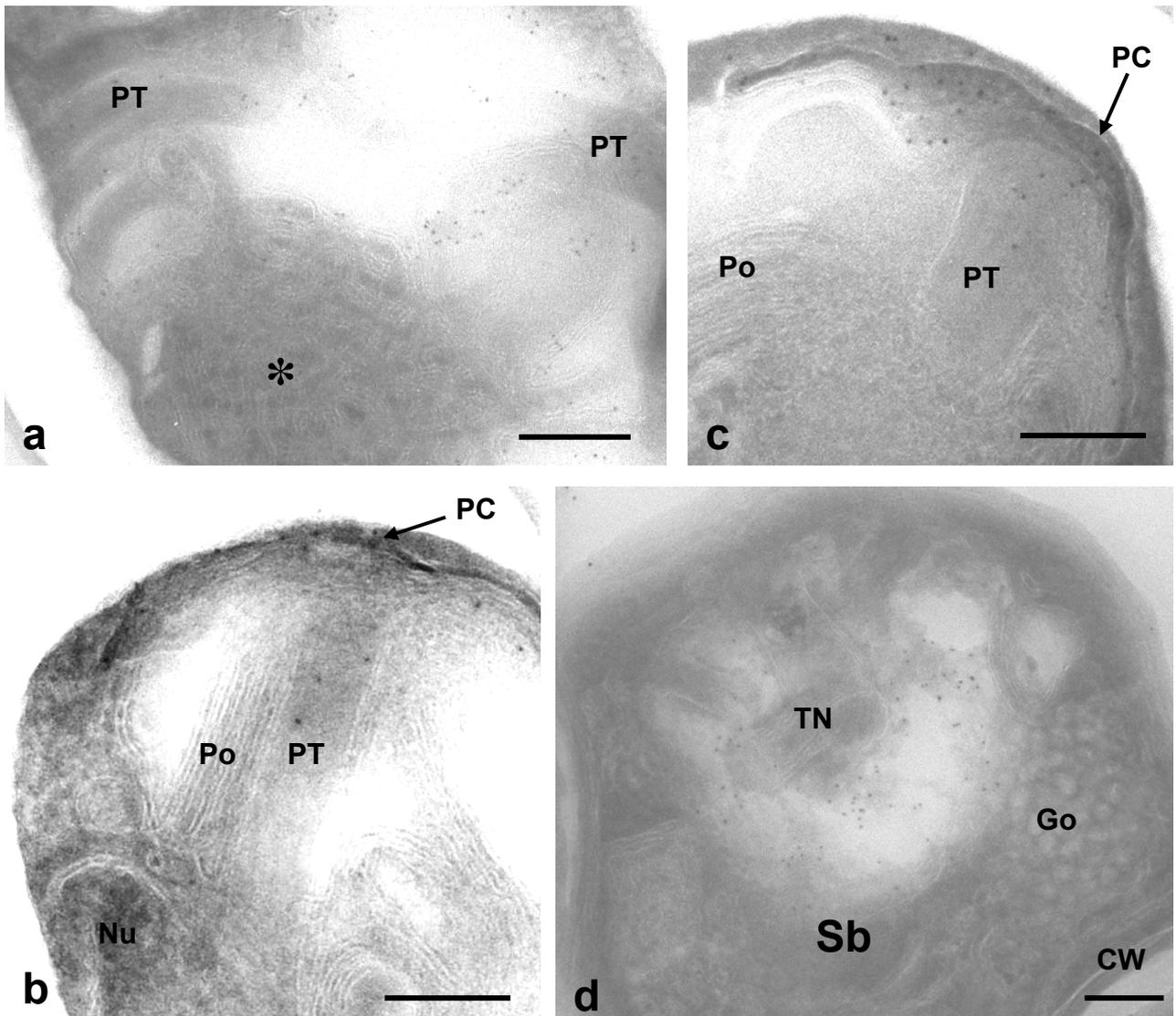
In this article, we report on the localization and structure of mannoconjugates in spores of the microsporidians *E. cuniculi* and *Antonospora locustae*. Labeling with mannose-specific lectins at the EM (electron microscope) level suggested that the polar cap is a major site for mannose-rich glycoproteins. Analyses of glycan fractions with MS and NMR techniques led to the first determination of oligosaccharide structures linked to microsporidial proteins. We unambiguously demonstrated that O-linked glycans exist as linear chains exclusively composed of mannose residues.

## Results

Our primary choice of *E. cuniculi*, a monokaryotic (mononucleate) microsporidian that infects a wide range of mammals, including humans, was justified by the extreme reduction of its genome (2.9 Mbp) that was fully sequenced (Katinka *et al.*, 2001) and viewed as a model of “minimal genome” in eukaryotic cells (Méténier et Vivarès, 2004). For comparison, analyses were also performed in the diplokaryotic (binucleate) species *A. locustae* that invades grasshoppers and locusts, and has a 5.3-Mbp genome for which a sequencing project is in progress (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>; *Antonospora locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272).

### *Reactivity of spore structures to PATAg and mannose-binding lectins*

An adaptation of the PAS reaction to the EM localization of polysaccharides and glycoconjugates, known as the PATAg reaction (Thiéry, 1967), was applied to ultrathin sections of epoxy resin-embedded *E. cuniculi* spores. As shown in Figure 1a, a strongly labeled structure was a cup-shaped organelle, named the polar cap, close to the spore apex and abutting the anterior end of the polar tube. Another PATAg-positive region was the lamellar polaroplast, a tightly folded membrane system that represents the precursor of the new plasma membrane surrounding the sporoplasm when transferred into a host cell. The reactivity of the spore envelope and polar tube was rather low. Interestingly, a section through a germinated spore (with extruded polar tube) revealed that the reactive material of the



**Fig. 2** Electron microscopy localization of ConA- and GNA-binding sites in cryosectioned *E. cuniculi* cells. **a, b.** ConA binding. **(a)** Gold particles are located on polar tube (PT) coils, as seen in an immature spore. A membranous body likely involved in the formation of the posterior vacuole is unlabeled (\*). **(b)** Anterior spore region showing labeled polar cap (PC) **c,d.** GNA binding. **(c)** GNA also binds to polar cap. **(d)** Labeling of some vesicular elements in a sporoblast stage (Sb). These elements are located between densely packed Golgi vesicles (Go) and a tubular network (TN) representative of polar tube precursors. CW, cell wall; Nu, nucleus; Po, polaroplast. Bar, 200 nm.

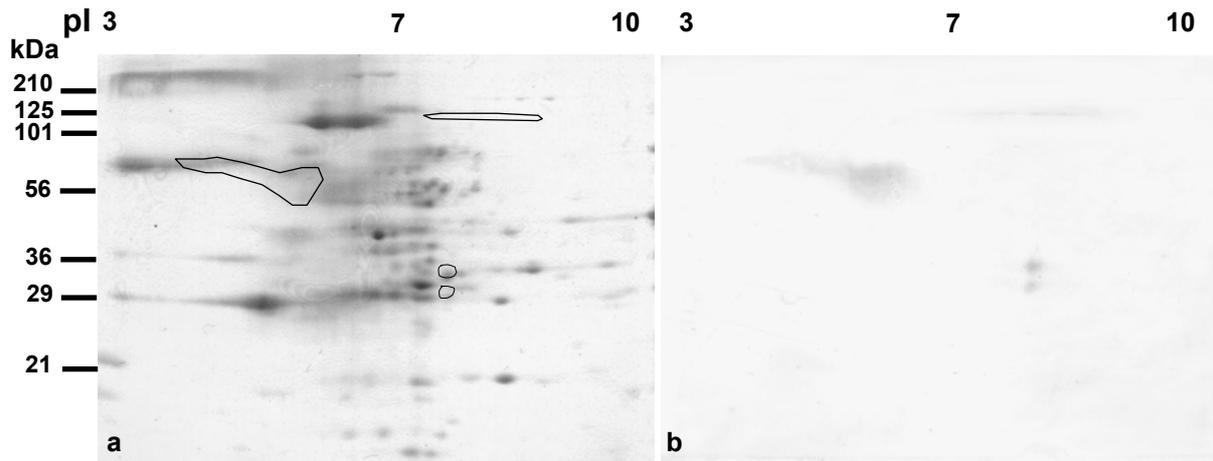
polar cap forms a collar-like structure around the aperture required for the passage of the polar tube (Figure 1b). Moreover, a significant labeling was associated with the surface of the extruded polar tube. The carbohydrate richness of the polar cap was also evident when applying the PATAg test to ultrathin frozen sections of spores from both *A. locustae* (Figure 1c) and *E. cuniculi* (not shown).

The EM localisation of potential mannoconjugates in *E. cuniculi* cells was investigated by treatment of cryosections with two biotinylated mannose-binding lectins (ConA and GNA) followed by immunogold detection. ConA labeling was associated with polar tube coils located in the posterior region of the spore (Figure 2a). In the anterior region, both the polar tube straight part and polar cap were ConA-reactive (Figure 2b). The main GNA-labeled spore structure was the polar cap (Figure 2c), as previously found with PATAg reaction. A few images were obtained for sporoblasts, the precursor cells in which the biogenesis of the extrusion apparatus occurs. As illustrated in Figure 2d, gold particles were clustered in a more or less central cytoplasmic area consisting of small vesicles and extending close to a tubular network characteristic of polar tube formation. These vesicles possibly derive from the non-dictyosomal Golgi apparatus that remains difficult to identify only on the basis of morphological criteria. The same labeling pattern was observed in *A. locustae* cells (data not shown).

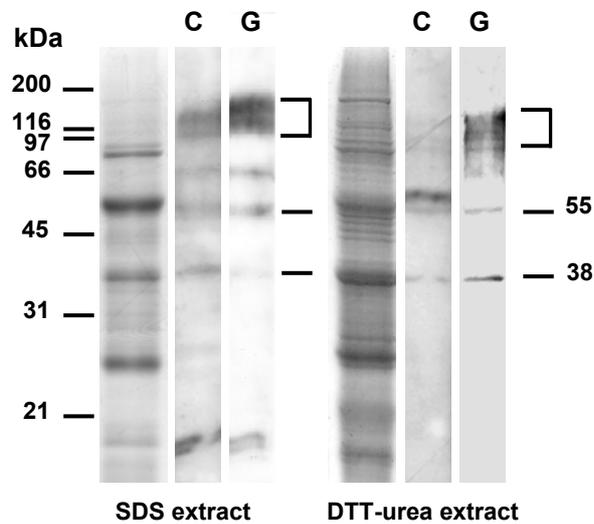
#### *Detection of E. cuniculi glycoproteins on electrophoretic profiles*

The spore proteome of *E. cuniculi* has been recently investigated using 2-D electrophoresis and MS techniques, leading to sequence characterization of 177 protein spots (Brosson *et al.*, 2006a). In a first attempt to detect glycoproteins in 2-D profiles, gels (pI range: 3-10) were either stained with Coomassie Blue (Figure 3a) or blotted for further staining with a PAS-derived procedure involving sugar biotinylation (Figure 3b). A low number of reactive spots were observed. A poorly resolved acidic region was centred on 55 kDa and correlated with a group of 10 different proteins. Two of these proteins are known to be specifically secreted during sporogony: polar tube protein PTP1 (Delbac *et al.*, 1998c) and exospore protein SWP1 (Bohne *et al.*, 2000). No sequence assignment was available for other glycoprotein spots, mainly seen between 30 and 35 kDa at neutral pI and in a 110-kDa basic region.

The presence of mannose-containing glycoproteins was tested by ConA and GNA blotting after SDS-PAGE of spore protein extracts. Because of their highly resistant cell wall, *E. cuniculi* spores were subjected to two different extraction procedures, one based on the combined action of urea and a disulfide-reducing agent (DTT) and the other involving hot SDS treatment. Although protein patterns of the two kinds of extracts were significantly different, ConA and GNA were more or less reactive with some shared bands, especially 38-kDa and 55-kDa bands with at least two bands producing a smear between 100 and 160 kDa (Figure 4). In SDS extracts, a 65-kDa band and a doublet close to 20 kDa were also recognized by both lectins. Ovalbumin preincubation prevented lectin binding for all bands (not shown). Thus, in accordance with our previous ultracytochemical data, some



**Fig. 3** Two-dimensional gel electrophoresis of *E. cuniculi* spore proteins. (a) Coomassie blue-stained gel. (b) Corresponding blot stained with a PAS-derived procedure. On the left, a reactive acidic region includes at least PTP1 and SWP1, two known glycoproteins assigned to the polar tube and exospore, respectively. Other reactive spots (30, 35 and 110 kDa) represent still unidentified proteins.



**Fig. 4** ConA and GNA lectin overlay. SDS-PAGE and lectin blotting (C, ConA; G, GNA) of *E. cuniculi* proteins extracted with either usual SDS-containing lysis buffer or DTT-urea solution. First lanes show Coomassie blue-stained profiles. Common lectin-binding bands are marked.

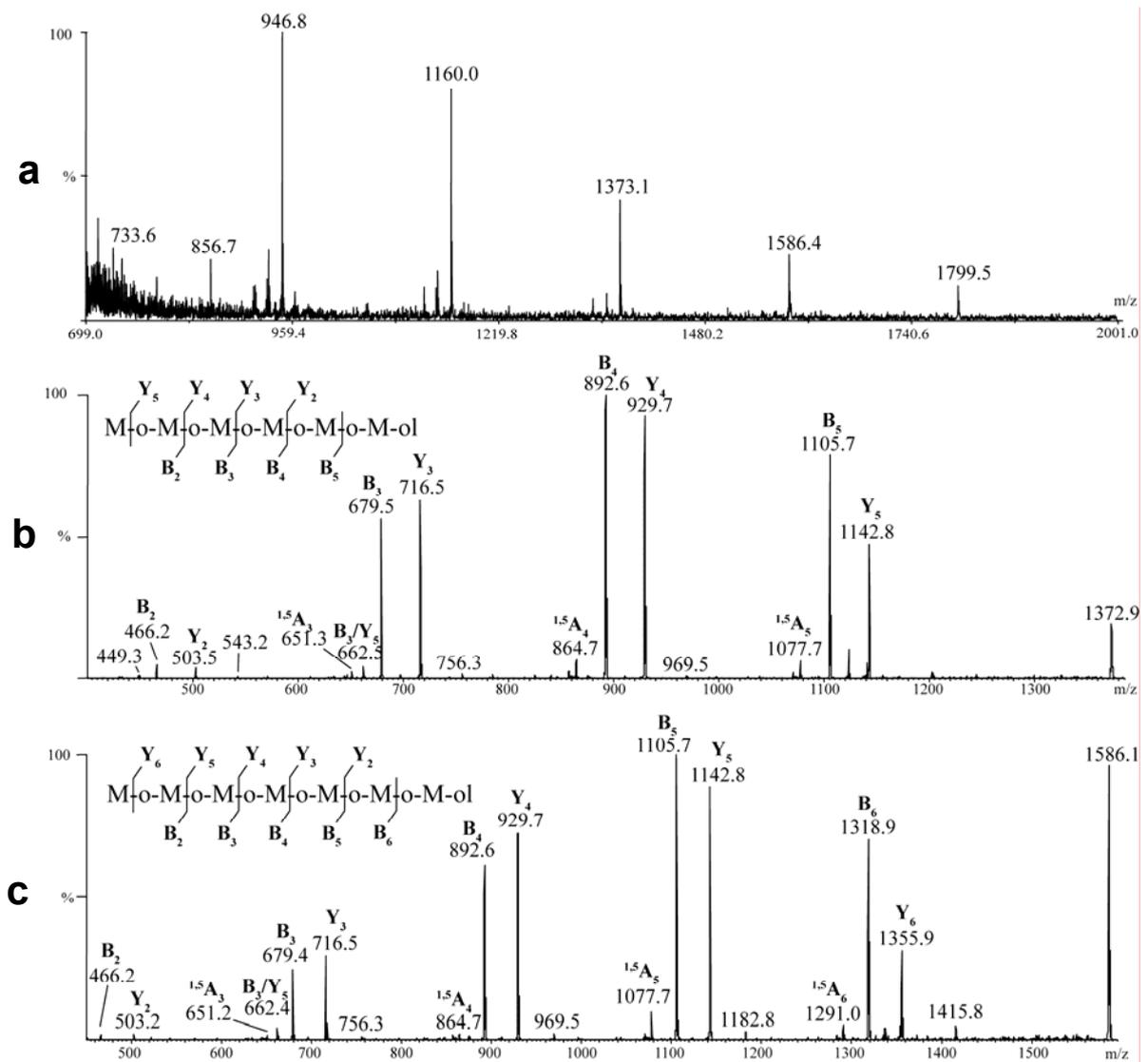
microsporidial spore proteins should be mannosylated. Subsequent physicochemical studies were oriented toward the characterization of glycan structures.

*N-glycans are virtually absent in PNGase-digested fractions*

Potential N- and O-linked glycans were purified from total delipidated extracts by sequential enzymatic digestions with PNGase F and A, followed by reductive  $\beta$ -elimination. Separation of released glycans from remaining glycopeptides was achieved between each step by passage through C-18 columns: that was shown to permit collection of N- and O-linked glycans from a single sample (Dell *et al.*, 1994). Both PNGase F and A, with different substrate specificities depending on the presence of fucose residue on chitobiose core, were used to release both possible types of N-glycans. Each of the three glycan fractions was tested for its monosaccharide composition in GC/MS and MS-analysed as permethylated derivatives. This strategy repetitively failed to conclusively demonstrate the presence of N-linked glycans in several batches of spores from both *E. cuniculi* and *A. locustae*. Composition analysis of PNGase-digested products did not show the presence of GlcNAc and Man residues in significant amounts to be attributed to N-linked glycans. Accordingly, MS analyses of these fractions in native forms, or after permethylation, did not show any signal due to potential N-glycans. We conclude that either endogenous N-glycans were absent or, if present, the quantities were too low to be detected by physico-chemical means. As expected, N-glycans were found in mammalian MDCK cells used for our *E. cuniculi* cultures, after application of the same purification protocol and MALDI-TOF MS.

*O-glycans are linear mannosylated oligosaccharides*

Composition analyses established that O-linked glycan fractions always contained significant amounts of mannose. In order to facilitate further analysis, O-glycan fractions were separated into two sub-fractions (flow through sub-fraction and included sub-fraction) by gel filtration on a Biogel P2 column. These sub-fractions were then permethylated and subjected to MALDI-TOF and ES-ion trap MS analyses. In all experiments involving permethylated products, CD<sub>3</sub>I was used as primary permethylation reagent to detect natural monosaccharides modified by methyl groups, as found in various organisms (Kocharova *et al.*, 2000; Guerardel *et al.*, 2001). As shown in Figure 5a, the MALDI-TOF/MS spectrum of permethylated flow through O-glycan fraction from *E. cuniculi* revealed a set of ions ranging from m/z 947 to m/z 1799. Their calculated compositions correspond to sodium adducts of permethylated reduced tetra-hexosides (Hex<sub>4</sub>-ol) to octa-hexosides (Hex<sub>8</sub>-ol). The absence of [M-3+Na]<sup>+</sup> or [M-6+Na]<sup>+</sup> clearly demonstrated the absence of natural mono or dimethylated hexose residues within the detected oligosaccharides. MS analysis of the gel filtration



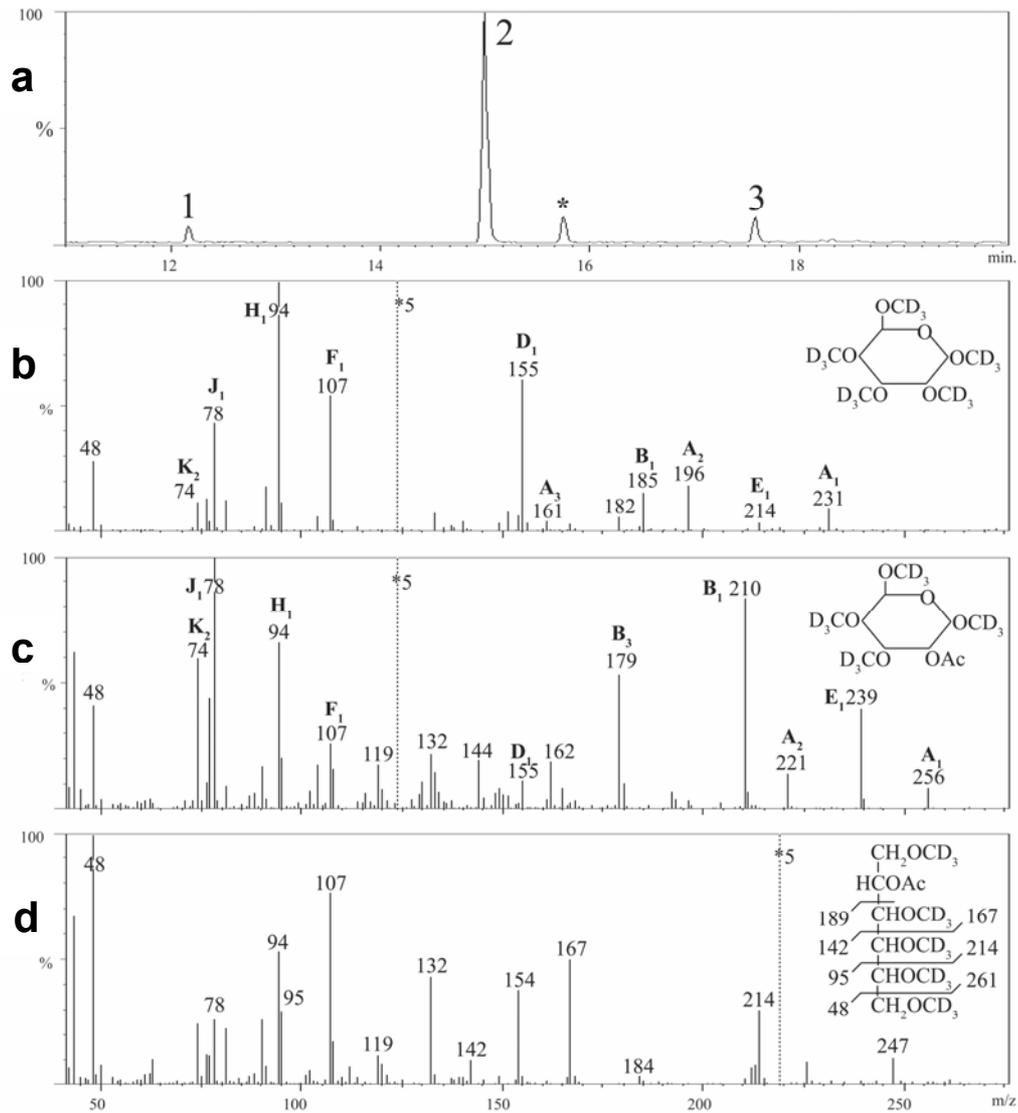
**Fig. 5** Mass spectrometry analysis of glycans released by reductive  $\beta$ -elimination. **(a)** MALDI-MS screening of per-deuteromethylated O-glycans from *E. cuniculi*; CID-MS/MS sequencing of **(b)**, reduced hexasaccharide at m/z 1373 and **(c)**, reduced heptasaccharide at m/z 1586, labeled according to (Domon and Costello, 1988). M stands for mannose residue.

included fraction of O-glycans showed only two  $[M+Na]^+$  ions at  $m/z$  520 and 733 attributed to smaller reduced di- and tri-hexosides (data not shown).

The nature of all oligosaccharides was confirmed by CID-MS/MS (collision-induced decay tandem mass spectrometry) analysis of all  $[M+Na]^+$  ions detected by MALDI-TOF-MS. As exemplified in Figures 5b,c for ions at  $m/z$  1373 and  $m/z$  1586, fragmentation patterns of all compounds were consistent with the presence of linear reduced oligomers of hexoses. All fragmentation spectra were dominated by series of Y-type ( $m/z$  at 503; 716; 929; 1143; 1356) and B-type ( $m/z$  at 466; 679; 892; 1105; 1319) ions resulting from the cleavage of glycosidic bonds from terminal non-reducing and reducing ends of oligomers, respectively. In addition, two sets of ions tentatively attributed to internal  $^{1,3}A$  or  $^{2,4}A$  fragment ions ( $m/z$  at 756; 969; 1182) and to internal  $^{1,5}A$  fragment ions ( $m/z$  at 651; 864; 1077; 1291) were observed as minor fragments. The nature of the  $^{1,5}A$  fragment ions was confirmed by MS<sup>3</sup> analysis. As expected, MS<sup>3</sup> fragmentation spectra were all characterized by the presence of a set of B-type  $[M-185-(213)_n+Na]^+$  ions indicating the release of  $CH_2OCD_3-CH_2-(CHOCD_3)_2-CH_2O$  fragment and a set of Y-type ions resulting from the release of non reducing hexose residues (data not shown). It is noteworthy that no hydroxyl group containing secondary fragment ion, indicative of the presence of branched structures, was observed in any of the CID-MS/MS spectra. Taken together, these data strongly suggested the presence of a family of mannosylated linear oligosaccharides with a DP (degree of polymerization) ranging from two to at least eight.

#### *O-mannosyl glycans consist of $\alpha$ -1,2 linked mannose residues*

In order to identify the linkage position of Man residues within the detected oligomers, permethylated O-glycan fractions from *E. cuniculi* were submitted to methanolysis and acetylation prior to analysis by GC/MS. TIC (total ion chromatogram) showed three major peaks labeled **1** to **3** (Figure 6a). By comparison of their retention times with standard molecules, peaks **1** and **2** were identified as 2,3,4,6-Me<sub>4</sub> Man(Me) (terminal non reducing mannose) and 3,4,6-Me<sub>3</sub>-2-Ac Man(Me) (internal 2-linked mannose), respectively. The positions of methyl groups were confirmed by EI (electronic impact)-MS, as shown in Figures 6b, c. Similarly, peak **3** was first identified as 1,3,4,5,6-Me<sub>5</sub>-2-Ac Hex-ol residue according to its fragmentation pattern (Figure 6d). Subsequent comparison of its retention time with standards produced from acetolysis and reduction of commercial *Saccharomyces cerevisiae* mannan definitely typified it as a 2-linked Man-ol residue. This residue results from the reduction of the reducing mannose following release of O-glycans by reductive  $\beta$ -elimination. In accordance with ES-MS/MS analysis, no di-substituted mannose residue indicative of branched structures was observed in GC/MS analysis. Differential integration of peak areas established that t-Man, 2-Man and 2-Man-ol were present in a ratio of 0.8/2.9/1, establishing an average DP of 5 for the high molecular mass fraction. Similar results were obtained from low molecular mass O-glycan fraction, which differs from high molecular mass fraction only by a lower average DP of 2.5 (data not shown). It is therefore clear that these O-mannosyl glycans are made of linear stretches of 2-linked Man residues.



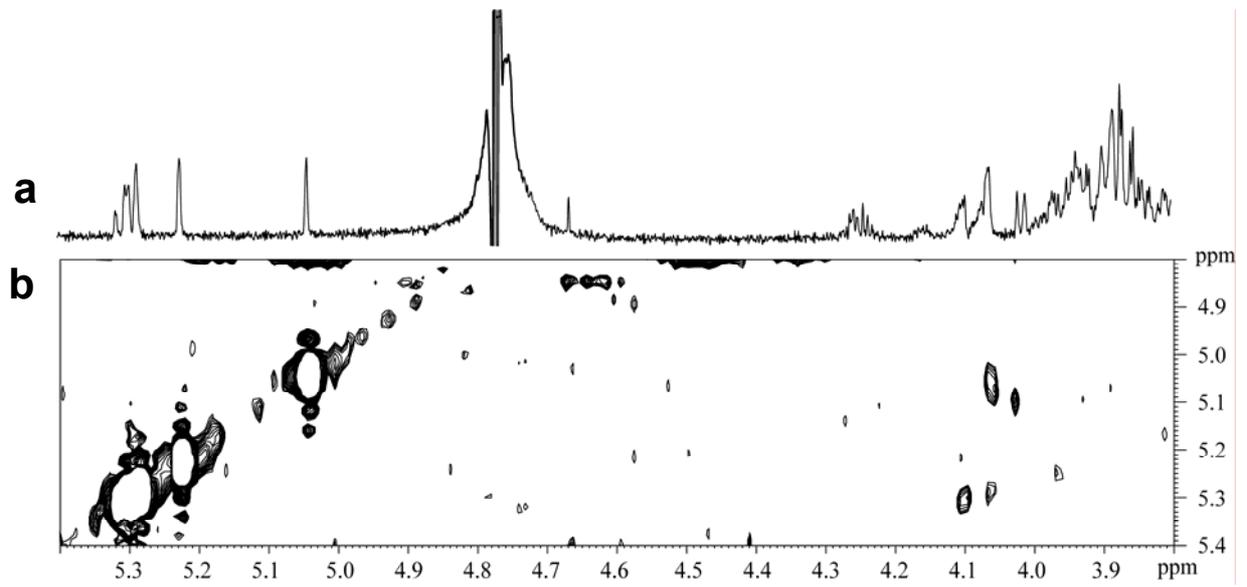
**Fig. 6** Linkage analysis of *E. cuniculi* O-linked glycans by GC/MS. **(a)** TIC chromatogram of partially deuteromethylated and acetylated methyl-glycosides; **(b)**, **(c)** and **(d)**, EI-MS spectra of compounds 1 (terminal mannose), 2 (2-linked internal mannose) and 3 (2-linked mannitol), respectively. Each compound was identified according to its retention time and fragmentation pattern.

Anomery of mannose residues was determined by 800 MHz  $^1\text{H}$ -NMR analyses. As shown in Figure 7, 1-D  $^1\text{H}$  (A) and 2-D COSY 90 (B) NMR spectra revealed two individual anomeric protons at  $\delta$  5.224 and 5.045 ppm that correlated with their respective H-2 protons at  $\delta$  3.98 and 4.07 ppm. It also revealed a group of at least four H-1 protons (5.286 to 5.312 ppm) correlating with H-2 protons between 4.08 and 4.10 ppm. Chemical shifts of anomeric protons superior to 5.04 ppm as well as  $J_{1,2}$  coupling constant of  $\sim 1.8$  Hz clearly established that all residues were  $\alpha$  anomers (Cohen et Ballou, 1980; Faille *et al.*, 1992). According to published  $^1\text{H}$ -NMR parameters, signals at  $\delta$  5.045 and 5.286-5.312 ppm were attributed to terminal non reducing  $\alpha$ -Man residue and internal  $\alpha$ 1,2-linked Man residues, whereas signal at  $\delta$  5.224 was attributed to the single  $\alpha$ -Man residue substituting Man-ol in C-2 position (Hayette *et al.*, 1992; Trimble *et al.*, 2004). The multiplicity of signals associated with internal ( $\alpha$ 1-2)Man residues results from the polydispersity of the oligomannosides, as revealed by MS analysis, that influences individual NMR parameters (Kobayashi *et al.*, 1994).

Altogether, the data collected from composition, linkage, MS, MS/MS and NMR analyses established the presence in *E. cuniculi* of a family of O-linked glycans exclusively composed of  $\alpha$ 1,2-linked mannose residues, with a size range from two to at least eight residues. Identical strategy conducted in *A. locustae* showed very similar results. As the two species belong to two different genera that have been shown to be distantly related in rRNA phylogenetic analyses (Slamovits *et al.*, 2004), such glycan structures might be a general feature in the microsporidian phylum.

## Discussion

As first observed in *Stempellia* spores (Vavra, 1972), the application of the PATAg procedure to ultrathin sections of *E. cuniculi* and *A. locustae* spores indicated glycoconjugate richness of the polar cap. This organelle was also labeled with biotinylated ConA and GNA, which supports the presence of mannose-containing glycoconjugates. After extrusion, the polar tube must be firmly attached to the spore apex in order to maintain the integrity of the sporoplasm flowing toward a host cell. A critical role of the polar cap in this attachment is conceivable because of its positioning between apical plasma membrane and polar tube domains and its conversion into a collar-like structure during polar tube extrusion (Lom, 1972). Some PATAg-positive material seen at the junction between extruded polar tube and spore body (see Figure 1b) likely reflects controlled exocytosis of polar cap contents. An abundance of hydrophilic sugars associated with polar cap proteins may facilitate polar tube exit then sliding through the apical aperture. The IgG response of immunocompetent humans against *Encephalitozoon* spp. was found to be directed against carbohydrate moieties of PTP1 and of some proteins migrated as a smear in SDS-PAGE between 100 and 250 kDa (Peek *et al.*, 2005). Immunofluorescence data supported a localization of the last antigenic glycoproteins in the anchoring region and a role in the adherence of the spore to the host cell surface has been hypothesized by the authors. The adherence of *E. intestinalis* spores to host cells *in vitro* involved sulfated



**Fig. 7** 800 Mhz <sup>1</sup>H-NMR analysis of *E. cuniculi* O-linked glycans. (a) one-dimension and (b) two-dimensions COSY-90 <sup>1</sup>H-NMR spectra of glycans

glycosaminoglycans of the host cell surface and inhibition of spore adherence by chondroitin sulfate A caused a significant decrease in the percentage of infected host cells (Hayman *et al.*, 2005). Exospore glycoproteins are the best candidates for interacting with host glycosaminoglycans. A putative contribution of polar cap glycoproteins to host cell-microsporidia interactions should occur only after polar tube extrusion.

The mannose-binding lectins ConA and GNA recognized several bands in SDS-PAGE patterns of *E. cuniculi* spore proteins and only mannose was clearly identified after GC/MS analysis of *E. cuniculi* and *A. locustae* oligosaccharide fractions subjected to methanolysis. ConA binding was reported for protein bands within a size range of 45-57 kDa in a fish-infecting microsporidian, the most labeled band being at 55 kDa (Kim *et al.*, 1999), as for exospore proteins SWP1 and SWP2 in *E. intestinalis* (Hayman *et al.*, 2001) and polar tube protein PTP1 in *E. hellem* (Xu *et al.*, 2004), *A. locustae* and *Paranosema grylli* (Polonais *et al.*, 2005). SWP1 and PTP1 anomalously migrate in SDS-PAGE between 50 and 55 kDa and exist in different species whereas SWP2 has a larger size (150 kDa) and is apparently restricted to *E. intestinalis*. In *E. cuniculi*, the ConA- and GNA-binding band at 55 kDa may be partially correlated with a large PAS-reactive area that was also close to 55 kDa in 2-D gels and known to include both SWP1 and PTP1. Evidence for binding of PTP1 to GNA was previously obtained by lectin blotting in two insect-infecting microsporidia (Polonais *et al.*, 2005). Whether at least one high-molecular-weight smeared band may contain a polar cap protein should deserve further investigations. The reactivity with GNA, a lectin that preferentially recognizes terminal  $\alpha$ 1,3-linked Man residues (Shibuya *et al.*, 1988), is somewhat puzzling because only  $\alpha$ 1,2-linked Man residues were detected here and no microsporidial gene encoding  $\alpha$ 1,3-mannosyltransferase was identified. However, although less efficient than oligosaccharides with terminal Man( $\alpha$ 1,3)Man unit, manno-oligosaccharides with an  $\alpha$ 1,2-linked linkage were able to slightly inhibit mannan-GNA precipitation, and retardation of glycopeptides on GNA column was strongly dependent on the number and heterogeneity of disaccharide units (Shibuya *et al.*, 1988).

Neither GlcNAc and Man residues nor mass specific N-glycan signal were identified in PNGase-treated glycan fractions of the studied microsporidia. Although this cannot formally exclude the possibility of a very low frequency of N-glycosylation, it should be stressed that a real loss of N-glycosylation is consistent with bioinformatic analyses of gene repertoires in *E. cuniculi* (Katinka *et al.*, 2001) and *A. locustae* (*Antonospira locustae* Genome Project; <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospira01>). Strikingly, no genes were found to encode subunits of the oligosaccharyltransferase complex needed for flipping of dolichol (Dol)-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> across ER (endoplasmic reticulum) membrane then linkage of the high-mannose oligosaccharide to asparagine residues on nascent peptides. The lack of key enzymes for protein N-glycosylation in *E. cuniculi* has been also verified through a recent inventory of Alg glycosyltransferases in several eukaryotic organisms, their comparison leading the authors to postulate that various secondary losses of enzymes from a common eukaryotic ancestor may have occurred (Samuelson *et al.*, 2005). The potential *E. cuniculi* proteome also lacks critical factors for correct folding of N-glycosylated proteins



in the ER, such as processing glycosidases and calnexin/calreticulin chaperone system (Katinka *et al.*, 2001). In fungal organisms, the major fraction of N-linked glycans is incorporated within cell wall phosphomannoprotein complexes and the importance of these glycans in host-fungal interactions is especially well illustrated by their involvement in the adherence of *Candida albicans* cells to host macrophages (Cutler, 2001). It is noteworthy that, unlike typical fungi, microsporidia have no permanent cell wall. Proliferating intracellular stages (meronts) are indeed delimited only by plasma membrane, with cell wall formation occurring during sporogony. The low diversity of glycoprotein spots revealed after 2-D gel electrophoresis might be related to lacking N-glycosylated proteins.

Detailed analyses of microsporidial O-glycans have revealed linear oligosaccharides consisting of  $\alpha$ 1,2-linked Man residues. These structures are comparable to those identified in several fungi and share a common  $\alpha$ 1,2-linked mannotriose with  $\alpha$ -linkage of the reducing terminal Man residue to an hydroxy amino acid (Gemmill et Trimble, 1999; Willer *et al.*, 2003). Further processing varies according to the species under consideration. In *S. cerevisiae*, the mannotriose is capped with one or two  $\alpha$ 1,3-linked Man residues while in *Schizosaccharomyces pombe*, up to two galactose residues can be attached via  $\alpha$ 1,2- and  $\alpha$ 1,3-linkages. *Pichia pastoris* and *C. albicans* have oligosaccharides with only  $\alpha$ 1,2-linked Man residues. Thus, *E. cuniculi* and *A. locustae* share with the two last yeasts very similar linear O-mannosyl glycans, except that maximum glycan length is higher in microsporidia (up to 8 Man residues). The immobilization of *E. intestinalis* exospore proteins SWP1 and SWP2 on ConA-agarose columns (Hayman *et al.*, 2001) might be re-interpreted as due to the presence of O-mannosylated chains. However, why the same proteins were found to be also immobilized on WGA-agarose columns is still unclear. The *E. cuniculi* coding sequence ECU08\_1340 was initially annotated as having similarity with the 110-kDa subunit of OGT (O-GlcNAc transferase) (Katinka *et al.*, 2001). In fact, it is improbable that ECU08\_1340 encodes such an enzyme, the partial homology concerning only tetratricopeptide repeats, not the catalytic C-terminal domain of OGT. As the microsporidian spore wall contains chitin but no  $\beta$  glucan, we tentatively suggest that binding of WGA to SWPs may be due the presence of a GPI structure linked to chitin oligomers.

The finding of O-mannosyl glycans fits with biochemical evidence for O-mannosylation of *E. hellem* PTP1 (Xu *et al.*, 2004) and metabolic potentials inferred from *E. cuniculi* genome sequence (Vivarès et Méténier, 2004). Starting from Dol-P-Man in the ER rather than from a nucleotide sugar in the Golgi apparatus, the O-mannosylation pathway in fungal organisms (Ernst et Prill, 2001) should be minimally represented in microsporidia. Only one gene encodes  $\alpha$ 1,2 mannosyltransferase (KTR family) in *E. cuniculi* (locus ECU04\_1130; UniProtKB entry: Q8SS28\_ENCCU) and probably also in *A. locustae* (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>). This excludes the presence of partially redundant enzymes involved in the addition of the second and third  $\alpha$ 1,2-linked Man residues, as demonstrated in both *S. cerevisiae* (Romero *et al.*, 1999) and *C. albicans* (Munro *et al.*, 2005). The conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases is divided into PMT1, PMT2 and PMT4 subfamilies and contains up to seven members in *S. cerevisiae*. The unique member of the PTP4 subfamily forms homomeric complexes whereas members of the PMT1 subfamily interact



heterophilically with those of the PMT2 sub-family, the PMT1/PMT2 and PMT4 members differing in protein substrate specificity (Girrbach et Strahl, 2003; Willer *et al.*, 2003). In *E. cuniculi*, only two potential PMTs are present. The protein sequence ECU02\_1300 (Q825D9) is clearly representative of the PMT2 subfamily (50-52% similarity with *C. albicans* and *Aspergillus fumigatus* PMT2s). The highly divergent character of the other PMT candidate (ECU06\_0950; Q8SVA5) does not allow assignation to a known PMT subfamily. A clear homologue of ECU02\_1300 has been found in *A. locustae* (ORF 1659; <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>). The formation of a PMT1/PMT2-like complex in microsporidia remains debatable.

Further isolation and characterization of individual O-mannosylated proteins should be useful for a better knowledge of the molecular organization of the microsporidian invasion apparatus, including the polar cap, and of possible ligands involved in host-microsporidia cell interactions. Moreover, as microsporidian gene potentialities exist for glypiation (Vivarès et Méténier, 2004) and some recently studied endospore proteins are likely GPI-anchored (Brosson *et al.*, 2005; Peuvel-Fanget *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006), physicochemical analyses are still needed to elucidate the precise structure of these GPI anchors.

## Materials and methods

### *Isolation of microsporidian spores*

*Encephalitozoon cuniculi* GB-M1, a mouse isolate that was used for genome sequencing (Katinka *et al.*, 2001), was produced on MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells as previously described (Delbac *et al.*, 1998a). After collection of culture supernatants, host-cells debris were removed by 10 successive centrifugations (20 000 g, 3 min) in PBS pH 7.4. The final pellet was represented by late sporogonial stages including a majority of mature spores (more than 70 %). *Antonospora locustae* spores, arising from infected grasshoppers, were commercially available from M & R Durango Insectary (Bayfield, Colorado, USA). The spores were washed in PBS before extraction.

### *Electron microscope cytochemistry*

*E. cuniculi* and *A. locustae* spores were either epoxy resin-embedded or frozen. For resin embedding, spores were fixed for 1 h in 2% glutaraldehyde, 0.05% ruthenium red and 0.07 M cacodylate buffer, pH 7.4. After washing for 30 min in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, they were post-fixed for 1 h in 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated through a graded series of ethanol, infiltrated in propylene oxide and embedded in Epikote 812 resin (Agar Scientific). Ultrathin sections were obtained with a Leica Ultracut S ultramicrotome then classically stained with uranyl acetate and lead citrate. For ultracryotomy, spores were fixed for 1 h 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 rapidly frozen in slush nitrogen. Cryosections (90 nm) were obtained using a dry sectioning device at -110°C and Ultracut S ultramicrotome fitted with the low-temperature sectioning system



FC4. Sectioned material was mounted on collodion-coated nickel grids (150 meshes) and stored at 4°C in PBS prior to cytochemical protocols.

The localization of glycoconjugates and polysaccharides was investigated using the PATAg (periodic acid-thiocarbohydrazide-Ag proteinate) procedure (Thiéry, 1967). Unstained sections of resin-embedded or frozen cells were submitted to oxidation with 1% periodic acid for 30 min, washed in distilled water and incubated in 0.2% thiocarbohydrazide for 4 h. After washing with 10% acetic acid then distilled water, grids were treated with 1% silver proteinate for 30 min.

For the localization of lectin-binding sites, cryosections were saturated for 1 h with PBS-1% ovalbumin then incubated for 1 h with a 1:50 dilution of biotinylated ConA or GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin) lectins (EY Laboratories, San Mateo, Ca, USA). Grids were subsequently reacted for 1 h with goat anti-biotin antibody (Sigma) at 1:100, then for 1 h with 5-nm gold conjugated anti-goat IgG (Sigma) at 1:100. Cryosections were finally contrasted and protected with a 0.8% uranyl acetate-1.6% methylcellulose mixture. All specimens were examined under a JEOL 1200EX transmission electron microscope.

### **Protein extractions**

For 2-D (two-dimensional) electrophoresis, *E. cuniculi* spore proteins were extracted through repeated cycles of freezing-thawing in liquid nitrogen and sonication (15 × 1 min on ice) in the presence of 7 M urea, 2 M thiourea, 100 mM DTT (dithiothreitol), 4% CHAPS and 0.2% SDS. For SDS-PAGE followed by lectin blotting, proteins were solubilized in either Laemmli buffer (“SDS extract”) or a solution containing 4 M urea and 100 mM DTT (“DTT-urea extract”).

For MS and NMR analyses, *E. cuniculi* or *A. locustae* spores (total cell number: 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup>) were disrupted in a lysis buffer containing 1% (v/v) Triton X-100 and 100 mM DTT, by repeated cycles of freezing-thawing and sonication, then incubated in the extraction solution (7 M urea, 2 M thiourea, 100 mM DTT, 1% Triton X-100) under agitation for three days. The entire sample was finally dialysed (6000-8000 cut-off) for further three days.

### **2-D gel electrophoresis and glycoprotein detection**

IEF (isoelectrofocalisation) of *E. cuniculi* protein samples (50µg) was performed along linear immobilized pH gradient strips of 7 cm, pH 3-10 (Amersham) in rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2 mM tributyl phosphine and 0.5% ampholytes), with the IPGPhor apparatus (Pharmacia). The program of voltage increase was 30 V for 12 h, 400 V for 30 min, 500 V for 30 min, 800 V for 30 min, 1000 V for 1 h, 4000 V for 1 h and 8000 V for 2 h. After equilibration with 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 100 mM DTT and then 135 mM iodoacetamide, strips were deposited on 12% polyacrylamide slab gels. After SDS-PAGE for 1 h at 25 mA, proteins were either stained with Coomassie Brilliant Blue or electrophoretically transferred onto PVDF membranes (Millipore). Glycoprotein detection on these membranes was carried out with the BioRad Immun-Blot<sup>®</sup> kit, involving successively periodate oxidation of carbohydrate groups, biotinylation,



incubation with streptavidin-alkaline phosphatase conjugate and colour development with BCIP and NBT.

### ***Lectin overlay***

SDS and DTT-urea extracts of *E. cuniculi* were analyzed by SDS-PAGE (12% polyacrylamide) and separated proteins were transferred onto PVDF membranes. Blots were saturated in TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl)-5% skimmed milk, washed in TBS and then in lectin reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>). They were subsequently incubated for 1 h with one of the two following biotin-labeled lectins (EY Laboratories, San Mateo, Ca, USA): ConA diluted at 1:1500 and GNA at 1:1000. After washing in TBS, 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 visualized with a chemoluminescent system (ECL+ Western blot detection kit, Amersham). Specificity was tested by preincubation of lectin conjugates with an ovalbumin blot at 4°C overnight.

### ***Isolation of glycan fractions***

*E. cuniculi* and *A. locustae* extracts were delipidated by chloroform/methanol (2:1). The separated pellet was reduced with 6 M guanidine chloride, 25 mM DTT in 0.6 M Tris for 8 h at 50°C, alkylated with 50 mM iodoacetamide overnight and dialysed. The product (3 ml) was then digested with 1 mg of trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.4 at 37°C for one day and with additional 0.2 mg chymotrypsin at 37°C under agitation for a night. A C18 Sep-Pak (Waters) was used to purify the resulting supernatant. Putative N-linked glycans were released by digestion with PNGase F (peptide N-glycosidase F) and PNGase A (peptide N-glycosidase A). Oligosaccharides were separated from peptides and glycopeptides using a C18 Sep-Pak. Putative O-linked glycans were released by alkaline reductive degradation in 1 M NaBH<sub>4</sub>, 0.1 M NaOH at 37°C for 72h. The reaction was stopped by the addition of Dowex 50×8, 25–50 mesh, H<sup>+</sup> form (Bio-Rad) at 4°C until pH reaches 6.5, and after evaporation to dryness, borate salts were removed by repeated evaporation with methanol. Total material was subjected to cationic exchange chromatography on Dowex 50×2, 200–400 mesh, H<sup>+</sup> form (Bio-Rad) to remove residual peptides. The oligosaccharide fraction was then purified on a Bio-Gel P2 column (Bio-rad) and C18 Sep Pak.

### ***Monosaccharide composition***

Monosaccharides were analysed by GC/MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry) as per-heptafluorobutyryl derivatives (Zanetta *et al.*, 1999). Shortly, N- and O-oligosaccharides were subjected to methanolysis in 500 µl of 0.5 M HCl in anhydrous methanol at 80°C for 20 h and incubated in 200 µl of anhydrous ACN (acetonitrile) and HFB (heptafluorobutyric acid) at 180°C for



10 min. The reagents were evaporated, and the sample was dissolved in ACN prior to GC/MS analysis.

#### ***Per-methylation and linkage analysis***

Per-methylation was performed according to the procedure of (Ciucanu et Kerek, 1984). Briefly, compounds were incubated overnight in a suspension of 200 mg/ml NaOH in dry dimethylsulfoxide (300  $\mu$ l) and iodomethane (200  $\mu$ l). The methylated products were extracted in chloroform and washed with water. After methanolysis, they were dried then per-acetylated in 200  $\mu$ l of acetic anhydride and 50  $\mu$ l of pyridine overnight at room temperature. The reagents were evaporated, and the sample was dissolved in chloroform before analysis in GC/MS.

#### ***MALDI-TOF and ES-MS<sup>n</sup>***

The molecular masses of N- and O-oligosaccharides were measured by MALDI-TOF (matrix assisted-laser desorption/ ionisation time of flight) on a Voyager Elite reflectron mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA), equipped with a 337 nm UV laser. Native and permethylated samples were prepared by mixing directly on the target 1  $\mu$ l of water (native) or ACN (permethylated) diluted oligosaccharide solution and 1  $\mu$ l of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/ml dissolved in ACN/H<sub>2</sub>O). For ES MS<sup>n</sup> (electro-spray ionisation multi-stage mass spectrometry), permethylated samples were reconstituted in methanol and analysed by mass spectrometry on a LCQ DK XP+ ion trap (Thermo Finnigan) instrument. After mixing with an equal volume of methanol-0.1 M aqueous formic acid, samples were directly infused at 50 nl/min, using the nanoflow probe option for MS and MS<sup>n</sup> analyses.

#### ***<sup>1</sup>H-NMR spectroscopy***

1-D (one-dimensional) and 2-D <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 800 spectrometer (Université des Sciences et Technologies de Lille) equipped with a TXI probe-head. Prior to <sup>1</sup>H-NMR analyses, oligosaccharides were twice exchanged with 99.97 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O and finally solubilized in 250  $\mu$ l of <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O in 5-mm Shigemi tube matched for <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. The spectrometer operated at 300K without solvent presaturation. The chemical shifts were expressed relative to residual acetate salts ( $\delta$  1.909 ppm). Spectral width was 8012 Hz with 16k points for a spectral resolution of 0.49 Hz/pt. The 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (correlation spectroscopy) spectrum was acquired with z-gradient pulse from cosygp pulse program available in Bruker software. Spectral width was 8012 Hz for both dimension with 4016 pts for F2 and 256 pts for F1 giving spectral resolution of 1.96 Hz/pt and 31.3 Hz/pt respectively.



## Acknowledgements

We thank Yves Leroy (CNRS UMR 8576) and Philippe Timmerman (CNRS UMR 8576) for technical assistance on carbohydrate composition. We are grateful to Dr. Catherine Texier for her help in the interpretation of two-dimensional protein profiles.

## Abbreviations

ACN, acetonitrile; CID-MS/MS, collision-induced decay tandem mass spectrometry; ConA, concanavalin A; COSY, correlation spectroscopy; Dol, dolichol; DP, degree of polymerization; DTT, dithiothreitol; EI, electronic impact; EM, electron microscopy; ER, endoplasmic reticulum; ES, electro-spray; GC/MS, gas chromatography coupled to mass spectrometry; GNA, *Galanthus nivalis* agglutinin; GPI glycosylphosphatidylinositol; HFB, heptafluorobutyric acid; IEF, isoelectrofocalisation; MALDI-TOF, matrix assisted- laser desorption/ ionisation time of flight; MDCK, Madin-Darby canine kidney; OGT, O-GlcNAc transferase; PAS, periodic acid-Schiff; PATAg, periodic acid-thiocarbohydrazide-Ag proteinate; PNGase A, peptide N-glycosidase A; PNGase F, peptide N-glycosidase F; PTP, polar tube protein; SWP, spore wall protein; TBS, Tris buffer saline; TIC, total ion chromatogram; WGA, wheat germ agglutinin; 1-D, one-dimensional; 2-D, two-dimensional.

## References

- Aravind, L., Iyer, L.M., Wellems, T.E., and Miller, L.H. (2003) *Plasmodium* biology: genomic gleanings. *Cell*, **115**, 771-785.
- Bigliardi, E., Selmi, M.G., Lupetti, P., Corona, S., Gatti, S., Scaglia, M., and Sacchi, L. (1996) Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *J Eukaryot Microbiol*, **43**, 181-186.
- Bohne, W., Ferguson, D.J., Kohler, K., and Gross, U. (2000) Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun*, **68**, 2268-2275.
- Brosson, D., Kuhn, L., Delbac, F., Garin, J., Vivarès, C., and Texier, C. (2006) Proteomic analysis of the eucaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics*, **6**, 3625-35.
- Brosson, D., Kuhn, L., Prensier, G., Vivarès, C.P., and Texier, C. (2005) The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: a surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation. *FEMS Microbiol Lett*, **247**, 81-90.
- Ciucanu, I. and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res*, **131**, 209-217.



- Cohen, R.E. and Ballou, C.E. (1980) Linkage and sequence analysis of mannose-rich glycoprotein core oligosaccharides by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **19**, 4345-4358.
- Cutler, J.E. (2001) N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol*, **39 Suppl 1**, 75-86.
- Delbac, F., Duffieux, F., David, D., Méténier, G., and Vivarès, C.P. (1998a) Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *J Eukaryot Microbiol*, **45**, 224-231.
- Delbac, F., Peyret, P., Méténier, G., David, D., Danchin, A., and 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.
- Dell, A., Reason, A.J., Khoo, K.H., Panico, M., McDowell, R.A., and Morris, H.R. (1994) Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers. *Methods Enzymol*, **230**, 108-132.
- Dolgikh, V.V. and Semenov, P.B. (2003) Trehalose catabolism in microsporidia *Nosema grylli* spores. *Parazitologiya*, **37**, 333-342.
- Domon, B. and Costello, C.E. (1988) Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry*, **27**, 1534-1543.
- Ernst, J.F. and Prill, S.K. (2001) O-glycosylation. *Med Mycol*, **39 Suppl 1**, 67-74.
- Faille, C., Wieruszkeski, J.M., Michalski, J.C., Poulain, D., and Strecker, G. (1992) Complete <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-resonance assignments for D-mannooligosaccharides of the beta-D-(1-->2)-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW.32 (serotype A). *Carbohydr Res*, **236**, 17-27.
- Gemmill, T.R. and Trimble, R.B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta*, **1426**, 227-237.
- Girrbach, V. and Strahl, S. (2003) Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem*, **278**, 12554-12562.
- Gowda, D.C., Gupta, P., and Davidson, E.A. (1997) Glycosylphosphatidylinositol anchors represent the major carbohydrate modification in proteins of intraerythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, **272**, 6428-6439.
- Guerardel, Y., Balanzino, L., Maes, E., Leroy, Y., Coddeville, B., Oriol, R., and Strecker, G. (2001) The nematode *Caenorhabditis elegans* synthesizes unusual O-linked glycans: identification of glucose-substituted mucin-type O-glycans and short chondroitin-like oligosaccharides. *Biochem J*, **357**, 167-182.
- Guha-Niyogi, A., Sullivan, D.R., and Turco, S.J. (2001) Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology*, **11**, 45R-59R.
- Hayette, M.P., Strecker, G., Faille, C., Dive, D., Camus, D., Mackenzie, D.W., and Poulain, D. (1992) Presence of human antibodies reacting with *Candida albicans* O-linked oligomannosides revealed



- by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids. *J Clin Microbiol*, **30**, 411-417.
- Hayman, J.R., Hayes, S.F., Amon, J., and Nash, T.E. (2001) Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect Immun*, **69**, 7057-7066.
- Hayman, J.R., Southern, T.R., and Nash, T.E. (2005) Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infect Immun*, **73**, 841-848.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, 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., and Vivarès, C.P. (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, **414**, 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**, 298-309.
- Kim, J.H., Ogawa, K., and Wakabayashi, H. (1999) Lectin-reactive components of the microsporidian *Glugea plecoglossi* and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis Aquat Organ*, **39**, 59-63.
- Kobayashi, H., Komido, M., Watanabe, M., Matsuda, K., Suzuki, M., Ikeda, T., Oyamada, H., Shibata, N., and Suzuki, S. (1994) Structure of cell wall mannan of *Candida kefyr* IFO 0586. *Infect Immun*, **62**, 4425-4431.
- Kocharova, N.A., Knirel, Y.A., Widmalm, G., Jansson, P.E., and Moran, A.P. (2000) Structure of an atypical O-antigen polysaccharide of *Helicobacter pylori* containing a novel monosaccharide 3-C-methyl-D-mannose. *Biochemistry*, **39**, 4755-4760.
- Lom, J. (1972) On the structure of the extruded microsporidian polar filament. *Zeitung Parasitenkund*, **38**, 200-213.
- Méténier, G. and Vivarès, C.P. (2004) Genomics of microbial parasites: the microsporidian paradigm. In Hirt, R.P., and Horner, D.S. (eds), *Organelles, genomes and eukaryote phylogeny. An evolutionary synthesis in the age of genomics*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 207-236.
- Munro, C.A., Bates, S., Buurman, E.T., Hughes, H.B., MacCallum, D.M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M.A., Bain, J.M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L.M., Brown, A.J., Odds, F.C., and Gow, N.A. (2005) Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem*, **280**, 1051-1060.
- Peek, R., Delbac, F., Speijer, D., Polonais, V., Greve, S., Wentink-Bonnema, E., Ringrose, J., and van Gool, T. (2005) Carbohydrate moieties of microsporidian polar tube proteins are targeted by immunoglobulin G in immunocompetent individuals. *Infect Immun*, **73**, 7906-7913.
- Peuvel-Fanget, I., Polonais, V., Brosson, D., Texier, C., Kuhn, L., Peyret, P., Vivarès, C., and Delbac, F. (2005) 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**, 309-18.



- Polonais, V., Prensier, G., Méténier, G., Vivarès, C.P., and 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 Genet Biol*, **42**, 791-803.
- Romero, P.A., Lussier, M., Veronneau, S., Sdicu, A.M., Herscovics, A., and Bussey, H. (1999) Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha-1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology*, **9**, 1045-1051.
- Samuelson, J., Banerjee, S., Magnelli, P., Cui, J., Kelleher, D.J., Gilmore, R., and Robbins, P.W. (2005) The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1548-1553.
- Shibuya, N., Goldstein, I.J., Van Damme, E.J., and Peumans, W.J. (1988) Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J Biol Chem*, **263**, 728-734.
- Slamovits, C.H., Williams, B.A., and Keeling, P.J. (2004) Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonospora locustae* n. comb. based on molecular and ultrastructural data. *J Eukaryot Microbiol*, **51**, 207-213.
- Thiéry, J.P. (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microscopie*, **6**, 987-1018.
- Thomarat, F., Vivarès, C.P., and 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**, 780-791.
- Trimble, R.B., Lubowski, C., Hauer, C.R., III, Stack, R., McNaughton, L., Gemmill, T.R., and Kumar, S.A. (2004) Characterization of N- and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology*, **14**, 265-274.
- Undeen, A.H. and Vander Meer, R.K. (1999) Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *J Invertebr Pathol*, **73**, 294-302.
- Vavra, J. (1972) Detection of polysaccharides in microsporidian spores by means of the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate test. *J Microscopie*, **14**, 357-360.
- Vavra, J. and Larsson, J. (1999) Structure of the microsporidia. In Wittner, M., and Weiss, L.M. (eds), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC: ASM Press, pp. 7-84.
- Vivarès, C.P., Loubes, C., and Bouix, G. (1976) Recherches cytochimiques approfondies sur les microsporidies parasites du Crabe vert de la Méditerranée, *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884. *Ann Parasitol Hum Comp*, **51**, 1-14.
- Vivarès, C.P. and Méténier, G. (2004) The microsporidia genome: living with minimal genes as an intracellular eukaryote. In Lindsay, D.S., and Weiss, L.M. (eds), *Opportunistic infections: Toxoplasma, Sarcocystis and Microsporidia. World Class Parasites*. Kluwer Academic Pub., Boston, pp. 215-242.
- Weiss, L.M. (2001) Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop*, **78**, 89-102.



- Willer, T., Valero, M.C., Tanner, W., Cruces, J., and Strahl, S. (2003) O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 621-630.
- Xu, Y., Takvorian, P., Cali, A., Wang, F., Zhang, H., Orr, G., and Weiss, L.M. (2006) Identification of a New Spore Wall Protein from *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun*, **74**, 239-247.
- Xu, Y., Takvorian, P.M., Cali, A., Orr, G., and Weiss, L.M. (2004) Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infect Immun*, **72**, 6341-6350.
- Xu, Y. and Weiss, L.M. (2005) The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *Int J Parasitol*, **35**, 941-953.
- Zanetta, J.P., Timmerman, P., and Leroy, Y. (1999) Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology*, **9**, 255-266.



## **3.2. Données complémentaires à l'étude de la O-mannosylation**

Des résultats complémentaires à l'étude de la glycosylation chez *E. cuniculi* et *A. locustae* sont exposés ci-dessous : la confirmation de l'expression de deux protéines homologues de protéine-O-mannosyltransférases (PMT), prédites par l'annotation du génome de *E. cuniculi* (Katinka, 2001; Vivarès et Méténier, 2001), la recherche des enzymes impliquées dans la voie de la O-mannosylation chez *A. locustae* et l'effet de la lectine concanavoline A (ConA) sur la multiplication d'*E. cuniculi* sous des conditions de culture *in vitro* sur cellules de mammifères.

### **Matériels et méthodes**

#### **Extraction d'ARN et RT-PCR**

Les ARN totaux des cellules HFF (« Human Foreskin Fibroblast ») infestées par *E. cuniculi* sont extraits avec le Rneasy Mini Kit (Qiagen) puis mis en présence d'un mélange d'amorces spécifiques des CDS *ECU02\_1300* (5'-TTCCTTCTCTATAAAGTC-3'), *ECU06\_0950* (5'-TCTCATTGAGGAAGAGAG-3'), et du gène *enp1 R* (5'-GTGAGCAACGACAGGAAGAA-3') à une concentration de 1 µM et chauffés 10 min à 70°C. Après ajout de 15 U de transcriptase inverse AMV (Promega) et des dNTP (2 mM), le mélange réactionnel est incubé 1 h à 37°C. Les réactions PCR sont réalisées en utilisant 5 µl de l'ADNc obtenu (après dilution au 1/2), l'amorce sens spécifique du gène d'intérêt *ECU02\_1300* (5'-ATTAGGCAGAGGCGGAGG-3'), *ECU06\_0950*: (5'-TTCCTGCTTCCCATGGTG-3'), *enp1D* (5'-AACAGGGTATGGCTCAGCAG-3') et les amorces correspondant à la réaction de RT. Les étapes pour l'amplification sont une dénaturation à 94°C pendant 5 min, 35 cycles comportant chacun trois étapes (dénaturation 30 s à 94°C, hybridation 15 s à 68°C, élongation 15 s à 68°C) puis une élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits PCR sont analysés sur gel d'agarose. Aucun produit n'a été obtenu dans le témoin sans transcription inverse, indiquant l'absence de contamination par de l'ADN génomique.

#### **Analyse des séquences**

Le séquençage du génome d'*Antonospora locustae* est réalisé au laboratoire de Biologie Marine de Woods Hole (USA) et les contigs sont disponibles aux deux sites Web suivants :

Protéines homologues	Locus Chr Ec	Nbre d'AA	MM th	pI th	Peptide signal	Hel TM	Domaines	Contigs AI	Super- contigs AI
Dolichyl-P-β-D-mannosyl synthase (DPM1)	ECU04_1060	230	25,8	9,7	non	1	GT 2 3-168	Contig 157 40%	? (ORF16 59)
Transporteur Golgien de GDP-mannose (VGR4)	ECU03_0150	292	32,3	10,1	1-24	8-10	TPT 148-284	Contig 209 35%	?
Dolichyl-P-Man-protéine O-mannosyltransférase (PMT)	ECU02_1300	671	78,3	9,8	1-25	11	PMT 14-254	Contig 283 48%	3183: 14-1082
	ECU06_0950	601	68,2	9,7	1-29 1-32	6-11	PMT 16-238	Contig 264 23%	3394: 28 824 30 764
α 1,2 mannosyltransférase (KTR)	ECU04_1130	322	38	5,8	1-13 1-17	non	GT 15 1-285	Contig 260 57%	3183: 22 787- 23 776

**Tableau 1. Gènes potentiellement impliqués dans la voie de O-mannosylation des protéines.** D'après les données de l'analyse du génome d' *E. cuniculi* (Katinka *et al*, 2001) et les données partielles de séquençage d' *A. locustae*. Deux sites sont disponibles pour la recherche de protéines homologues chez *Antonospora locustae*. Un premier site (*Nosema locustae* genome project ; <http://jbpc.mbl.edu/Nosema/Nblastcontig.html>) présente les données de séquences sous forme de contigs. Un site plus récent (*Antonospora locustae* database <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>) affiche la localisation des gènes annotés au niveau de supercontigs et pour certains directement sous forme d'ORF. L'identité des contigs d'*A. locustae* avec les CDS d'*E. cuniculi* sont indiquées en %. Les numéros de super-contigs sont suivis de la position de la séquence. La position des domaines conservés est indiquée sous le nom générique du domaine. AA : acides aminés, GT: glycosyltransférase, Hel: hélices; MM : masse moléculaire, pI : point isoélectrique, PMT: protéine O-mannosyltransférase, th : théorique, TM : transmembranaire, TPT: triose phosphate transporteur.

<http://jbpc.mbl.edu/Nosema/index.html> et (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>). Les peptides signaux sont prédits avec SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) et PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp>) Les recherches d'homologies et les alignements multiples sont effectués respectivement avec les programmes BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) et ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Les domaines conservés sont recherchés à l'aide de Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>). La prédiction d'hélices transmembranaires et le calcul des masses moléculaires et points isoélectriques théoriques sont réalisés au moyen de TMPred, TMHMM, MW et pI, disponibles sur le serveur EXPASY (<http://www.expasy.org/tools/>).

### **Traitement des cellules par la lectine ConA et quantification des parasites**

Les cellules HFF sont cultivées en plaques 96 puits à 37°C jusqu'à confluence. Suite aux résultats d'une étude préliminaire avec diverses dilutions de la lectine (ConA), le choix final s'est porté sur les dilutions 1/50 et 1/100. Un total de 10<sup>4</sup> spores d' *E. cuniculi* est ajouté à chaque puit en combinaison avec l'addition de ConA. Les parasites sont laissés en contact avec les cellules HFF et la lectine pendant 1,5 h puis les spores non adhérentes sont éliminées par 3 lavages en PBS. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour de post-infection. Les cellules sont alors fixées 1 h au méthanol à -80°C, perméabilisées avec une solution d'éthanol 70%-Triton X-100 0,5% pendant 30 min et lavées en PBS. Une saturation de 1 h en PBS-BSA 1% à 37°C est suivie d'une incubation de 2 h à 37°C avec un antisérum dirigé contre les protéines totales d' *E. cuniculi*, produit chez le lapin et dilué au 1/1000. Après un lavage en PBS-Triton X-100 0,1%, un anticorps anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Promega) est ajouté à 37°C pendant 1 h. La réaction enzymatique en présence de p-nitrophénylphosphate dans un tampon diéthanolamine (30 min à 37°C et à l'obscurité) est stoppée par ajout de NaOH 3 M et les résultats sont lus à l'aide d'un lecteur microplaque à 405 nm. L'infection est quantifiée par rapport à l'absorbance. Chaque condition a été testée en quadruplicat et chaque expérience répétée 3 fois.

## **Résultats/ Discussion**

### **Les PMT d' *E. cuniculi***

Les enzymes nommées dolichol-P-Man-protéine O-mannosyltransférases appartiennent à la famille des PMT, caractérisée tout d'abord chez les levures (Gentzsch et Tanner, 1996). Elles

```

ECU02_1300 -----MMRKKYLEISTTLL 15
PMT2      MSSSSSTGYSKNNAAHLKQENTLQRQESSSSISVSEELSSADERDAEFDFSKEKPAQAQSSLLRLESVVMPEVI 70
PMT4      -----MSVPKRNHGKLPSTKDVDDPSLKYTKAAPKCEQVAEHWLQPLPEPESRYSFVWVTL 58
ECU06_0950 -----MSKTLQTKIGGSRSSQMVEVVL 22

ECU02_1300 IFMLSIVIKTKIENGDFVWDEAHFGKFKSEKYL SRKFYFDVHPPLGKILTSLGGYLFNQPLDEEFKSG- 84
PMT2      FTALALFTRMYKIGINNHWVWDEAHFGKFGSYLRRHEFYEDVHPPLGKMLVGLSGYLAGYNGSWDFPSSG- 139
PMT4      VTLLEAFAARFYKIWYPKEVVDDEVHFGKFAASYLERSYFFDVHPPFAKMMIAFIGWLGGYDGSEKFEIG 128
ECU06_0950 VVVLSELLFDRKVP----ITKDEAEAFARNLMSVGRKFCFHRHLLPLPGLICHGLCRLEAALN----- 80

ECU02_1300 -EKFP PGFDYSGMRRRHSIIASFTPVFG-VYMLKEMRYSYRRRLLSMVFLFENGFTSIGRILLLDSHELL 152
PMT2      -EIIYDYLDDYVKMRLFNASFSALCVPLA-YFTAKAIGFSLPFWLMTVLVLFENSYSYTLGRFILLDSMLL 207
PMT4      YSYETHPAPYLAIRSFNAILGTLTVPLM-FNITLKEINERATCAFASILLVAIDTAHVITRILLDLDAITL 197
ECU06_0950 -----IPLLSLAAENPRLVSETLFFVVTMLQISWLAQETYNRMVSRIVVAVHTIGLLINTQMLFLTNEM 143

ECU02_1300 TETAAVAYFMTRVYF-RSRK---TIHLPSVFLGLGLTGCVLSEKWLGFITMGLVGIFTVYQLWCNAISK- 217
PMT2      FFTVASFFSFVMFHN-QRSKPF SRKWNKWLITGILSGCTISVKMVGLFIITMVGIVTVIDLWTFADKRS 276
PMT4      ISIAAAMYCYVRFYKQLRQPFVWSWYIWLHATGLSLSEVISIKYVGVMTYSATGFAAVVNLQQLDTRK 267
ECU06_0950 FSICFLASAVQLKK-----RRNATSGALLGLSVASSWVSLSVLPLAVRHGISLFFTFIVDPS 201

ECU02_1300 -ESILVLVLEFMAKAFELIGIPASLYVLLFVVFETVNRSGSDDGHMSSLFOASLKGSSIGNN-RKYPLE 285
PMT2      -MSWKYINHWLARIIFGLIIVPEFCIEILLCFKTHFDLSSHSGTGDANMPSLFOARLVGSDVGGPRDIAG 345
PMT4      GLSLRQFMRHFSKRLNGLVLIPIFVYLFVFWVHFTVINTSGPGDAFMSAEFOETLKDSPLSDSKTVNYE 337
ECU06_0950 -NKVCKGALRAAKGVVAFVLPASVVALSELVHYSIQHOHTADARGESTEFQALKDS-TQESADKYLMD 269

ECU02_1300 GTKIITIKSAKGGYLSHSHNKYPD-----CGNNO-VTIYEHKDENNEWLEOK-----VTDDLLEDAE 341
PMT2      SSVVSIKNQALGGSLHSHIQTPD-----GSNOQQVTCYGYKDNNEWENRERGLPSWSENETHIE 408
PMT4      D-IITIKHODT-DAFLHSHLARYPORYEDGRISAGQQVTGYTHPDENNQWVGLP-----PHGSDVKGGO 400
ECU06_0950 RSIITITLNQKH-----NTYLN-----MRAGIPSCSEKTEDSMWVVIKIHPSDSNENVGQDR 322

ECU02_1300 FIESGDVVLHMETRKYLDIPGTHSLISRGLRAES-SGNHLSETN--LFKIEVVDDALE-KES-RIKTL 406
PMT2      YLKPGETSYRLVHKSTGRNLHTHPVAAPVSKTQWEVSGYCDNVVGDNRKNWVIEIMDQRGD-EDPEKLEHTL 477
PMT4      AVLLNQHIRLRHVATDTYLLADVASDFYFPINBEIITVTLLEGDGELYPETLEFAFQPLKKSDFGHVLRK 470
ECU06_0950 YLGHGDLVVKIVELGSSMCLRVG-SEDTEDKFRKVLGFVQEDNDANEDLWQILGSGPVVVS-----R 382

ECU02_1300 TTRFRLLNKHNCYLGPS-SRKYPSWCFEQEVICTT--KRDEATLWVNEENSDDKLSKERNEVYREIA 472
PMT2      TTSFRILKLEMGCYLAQT-GNSLPEWGFROQEVVCMKNPFKRDKRTWNNIETHENERLPPR--PEDFQYP 544
PMT4      TVSERLEFHVDTISVALWTHNDELPLDWFQOQELNGNRK--VIDPSNHWVDEIVN-LDEVKVVYIPKVVK 537
ECU06_0950 SSLVRFRRHYKIAMDLCVRSRLRPEEDGEDNMEKAVNGSLYSDNRSRLFYISDNRN-----HDFE 441

ECU02_1300 RYPFIRKFEENKAMFITTNASEVODEDLEPERIVSRPYEWLILRRGLRMTSWDGRTBKFYMFGNPLIYWYS 542
PMT2      KINFLKDFIHLNLMAMATNNALVPDPK-FDYLAASSAWQWPTLVNGLRLCGWGDNDPKYFLICTPASTWA 613
PMT4      PLPFLKWIETQKSMFESHNNKLS-----EHPFASBPYSWPGSLSGVSEFWTNGDEKKQIYFIGNIIIGWVF 602
ECU06_0950 KKNESDGRPAETVANEPOKSFWKRILEHHRRLIKGFRRRWALVRRYALLPLONGKTR--QVKHDLIFNVL 509

ECU02_1300 SGVCVILSPVILLSRITRQRRRGKPLAFLRGEYIVFLS-----CCGWLLHYIPFFVVKRVLVYHHYVPA 607
PMT2      SSVAVLAFMATVVIILIRWOR--QYVDLRNPSNWNVFLMGGFYPLLAWGLHYMPFVIMSRVIVVHHYLP 681
PMT4      QVISLAVEVGLIVADLITRHRGYIALNKMTRKLYGFLM---FFFVSWCCHYEPFFLMARQKFLHHYLP 669
ECU06_0950 TMLSSFLPLMVLVNLHISWRKYKGLVTRREDDFFLCMMH-----LCAVLIETTLNLGQALTEVLRIMMAL 574

ECU02_1300 LFFALESLCYVMKF-----VRLRLVAVFVSAATISFFLYSRLTYG 647
PMT2      LNFALILLAYCFDAGLQKWSRSKCGR-----IMRFVLYACFMALVIGCFWYFSPISLFG 734
PMT4      HLIACLFSGALWEVIFSDCKSLDLEKDEDISGASYERNPKVVKPYIVFLVCVSCAVAWFFVYFSPLYG 739
ECU06_0950 SLVSLFCTR-----PVFLFSVFLSSSMRFLR----- 601

ECU02_1300 FAEETEFLRRISIIPWDFIEKEQ- 671
PMT2      MEGPSSNFRYLNWFSIWDIADKQEA 759
PMT4      DVSLSPSEVVSREWFDIELNFSK-- 762
ECU06_0950 ----- 601

```

**Figure 1. Alignement des protéines O-mannosyltransférases (PMT) de *E. cucuculi* (ECU02\_1300 et ECU06\_0950) et *A. locustae* avec les PMT2 et 4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Les deux protéines d' *E. cucuculi* présentent une séquence commune au domaine PMT de 240 acides aminés pour ECU02\_1300 et 222 pour ECU06\_0950 et un taux d'identité de 22%. La protéine ECU02\_1300 montre 34% d'identité avec la PMT2 de *S. cerevisiae*. Les résidus identiques et similaires sont respectivement surlignés en noir et gris.**

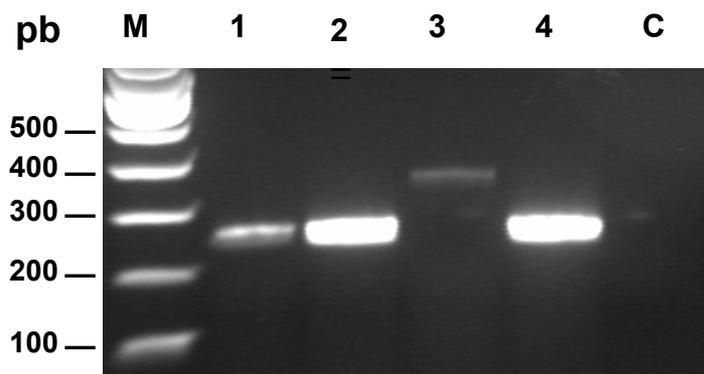
catalysent le transfert du résidu mannose du Dol-P-Man à un résidu sérine ou thréonine d'une protéine entrant dans le RE et sont localisées chez les levures dans ce compartiment cellulaire.

Lors du séquençage du génome complet d' *E. cuniculi*, deux CDS ont été annotés comme protéine-O-mannosyltransférases potentielles. ECU02\_1300 code pour une protéine de 78,3 kDa qui possède un peptide signal, 11 hélices transmembranaires et un point isoélectrique (pI) basique de 9,8 (**Tableau 1**). Le domaine pour l'activité catalytique des PMT (17% d'identité avec le consensus) est conservé entre les résidus amino-acides 14 et 254 (**Fig. 1**). La protéine ECU02\_1300 semble donc être une PMT typique et pourrait être l'enzyme qui permet l'accrochage du premier mannose à une protéine. Un second CDS, ECU06\_0950, code une protéine plus courte de 68,2 kDa et annotée comme « similaire à une dolichol-phosphate : protéine mannosyltransférase ». Son pI est également basique (9,7) et de 6 à 11 hélices transmembranaires ainsi qu'un peptide signal sont prédits. Elle montre 15,6% d'identité avec la séquence consensus du domaine PMT, celui-ci étant situé entre les acides aminés 16 et 238. Les deux protéines montrent seulement 22% d'identité entre elles.

Les PMT des levures sont au nombre de 7 et réparties en 3 sous-familles : PMT1, PMT2 et PMT4. ECU02\_1300 peut être placée dans la sous-famille PMT2 (50 et 52% de similarité avec les PMT2 de *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*, respectivement). Plus divergente, ECU06\_0950 n'a pu être assignée clairement à une sous-famille. Aucune de ces protéines n'a été retrouvée lors de l'analyse du protéome sporal d' *E. cuniculi* (Brosson *et al.*, 2006) cependant cette analyse est incomplète.

Afin de vérifier leur expression, des réactions de transcription inverse à partir d'ARN extraits de spores d' *E. cuniculi* ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques des CDS ECU02\_1300, ECU06\_0950 et du CDS codant la protéine d'endospore EnP1 et servant de témoin positif. La **Fig. 2** montre que ces ARNm sont transcrits, les produits d'amplification correspondant aux tailles attendues : 252 pb pour ECU06\_0950 et 336 pb pour ECU02\_1300.

Les deux gènes ont aussi été clonés et des anticorps ont été produits contre les protéines recombinantes. L'immunolocalisation en microscopie électronique a été réalisée sur cryocoupes d' *E. cuniculi* et *A. locustae* (données non montrées). Une réaction positive est observée avec chaque sonde immunologique chez les deux microsporidies. Le marquage est relativement dispersé dans les sporoblastes et les spores matures, souvent à proximité d'éléments du RE.



**Figure 2.** Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes codant pour les protéines O-mannosyltransférases (PMT) d' *E. cuniculi*. Analyse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification des CDS ECU06\_0950 (piste 1), ECU02\_1300 (piste 3) et EnP1 (pistes 2 et 4). C= contrôle, sans réaction de reverse transcription.

```

ECU04_1060  ---MYNIIIPTYNEGPNIKVLLRMVSDVMS--EEGKPFKIIIVVDDSPDGTYKIVESMG--LQNVCLLSRK 64
ORF 1659    ---MYNLIIPTYNEVENLEPLVHMLHNEFA--EMSREYIIIVVDDNSPDGTFEKAELSR-TYNVTSVKRD 65
Sc DPM1     MSIEYSVIVPAPYHEKLNLIKPLITTRLFAGMSPEMAKKTETLIFVDDNSQDGSVEEVDALAHQGNVRIIVRT 70

ECU04_1060  KKLGLGSAYKTALHCEHPFTVVMDCDLSDHPMYIKDMIRLCK-KGADIVAGSRYS-CEGAVCGWSMKRK 132
ORF 1659    RKLGLASAYAEGLLHCTGEYVFTMDADLISHDKYLRKSFLLSQASKNCDVVMSTRYS-SNGGVYCWPFWRR 134
Sc DPM1     NERGLSSAVLKGIFYEAKGOYLVCMDADLQHPPEETVPKLFESLH--DHAFTLGTRYAPGVGIDKDWPMR 138

ECU04_1060  IISLGANNLARIFLNVNVDLIGSFRLYRTEVLRLLIEESVSTGYSEFQMEIMC---LAKRRGFVSECP 199
ORF 1659    AMSRGANNLAQVILGTESSDATSQYRLYRRSTLEFLLSRTTSICYSIQMELAY---LAETCNLRIAEVPI 201
Sc DPM1     VISSTARMMARPLT-IASDPMSGFEGLQKKYLENCNPRDINSQGFKTALETAKLPIPRDPRVATGEV 207

ECU04_1060  VFHERRRGGSKLSLMEIVMILKAIGVILFFSA----- 230
ORF 1659    VFVDRTRGRSKCGTTEVLHFLVTVLVLEFARP----- 232
Sc DPM1     TEGVRETEGESKLSGKVIIQTLQQLKEIYVFKFGANNLILFITFWSILFFYVQYQLYHLVF 267

```

**Figure 3.** Alignement de l'enzyme dolichol-mannosyl synthase (DPM1) de *S. cerevisiae* avec ses homologues chez *E. cuniculi* (ECU04\_1060) et *A. locustae* (ORF 1659). Les séquences de *E. cuniculi* (230 aa) et *A. locustae* (232 aa) présentent respectivement 30% et 33% d'identité avec celle de la levure (267aa). Les résidus identiques et similaires sont respectivement surlignés en noir et gris.

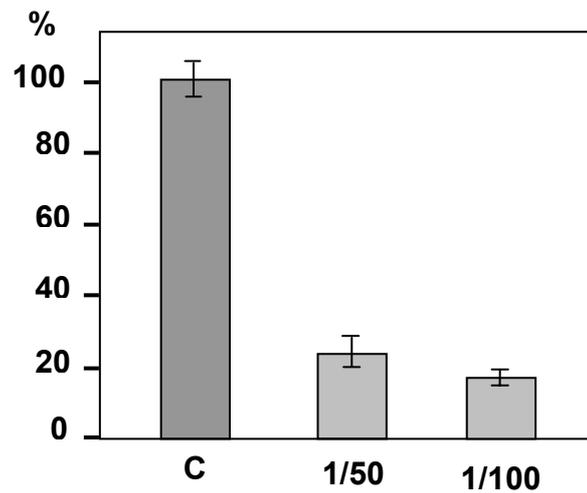
### Gènes de O-mannosylation chez *A. locustae*

Un seul homologue de PMT a été annoté comme mannosyltransférase putative dans le génome partiellement séquencé d' *A. locustae*, au niveau de l'ORF 1659; <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>. La séquence de 232 acides aminés révèle une identité de 18% avec la séquence consensus du domaine PMT (**Tableau 1**). Cependant, en BLAST P, cette séquence ne montre d'homologie qu'avec un seul CDS d'*E. cuniculi*: ECU04\_1060 (identité de 48%). Ce CDS, annoté comme une dolichol-mannosyl synthase, homologue à la protéine DPM1 de *Saccharomyces cerevisiae*, présente un domaine glycosyltransférase de type 2 (position 3-168). L'ORF 1659 est donc fortement apparenté à DPM1. De plus, la taille de cette protéine est proche de celle de l'homologue DPM1 d'*E. cuniculi* (230 aa) et beaucoup plus courte que ses deux PMT (601 et 671 aa) (**Fig.3**).

Les gènes nécessaires à la O-mannosylation des protéines sont présents dans le génome d'*E. cuniculi*. Chez *A. locustae*, l'identification de ces enzymes est compliquée par l'existence de deux bases de données différentes : <http://jbpc.mbl.edu/Nosema/Nblastcontig.html>; <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>. Par exemple, l'homologue de DPM1 chez *A. locustae* est sur le contig 157 et montre 40% d'identité avec celui d' *E. cuniculi*. Les gènes codant les quatre protéines essentielles à la O-mannosylation des protéines sont détectés au niveau de différents contigs du premier site (**Tableau 1**). Il est donc prévisible que, comme le parasite de mammifère *E. cuniculi*, le parasite d'insecte *A. locustae* soit capable de réaliser la synthèse des courtes chaînes de résidus mannose liés en  $\alpha$  1,2.

### Effet de la ConA sur la parasitémie de cellules en culture

L'addition de ConA au 1/50 et 1/100 à des cellules HFF simultanément à leur infestation avec des spores d'*E. cuniculi* a pour effet une diminution de la parasitémie de plus de 70 % (**Fig. 4**), sur la base de mesures effectuées 6 jours après l'infestation à l'aide d'un test ELISA spécifique des microsporidies. L'ajout de mannose en concentration élevée, dans le cas de cellules RK13 infectées avec *E. hellem*, montre un effet analogue à celui de la ConA (Xu *et al.*, 2004). Le mannose et des récepteurs à mannose pourraient être particulièrement impliqués dans l'adhésion du tube polaire à la cellule-hôte, d'autant plus que PTP1 est mannosylée (Xu *et al.*, 2004).



**Figure 4. Etude de l'effet de la lectine ConA sur *E. cuniculi* cultivé en cellules HFF.** L'estimation du degré de parasitémie 6 jours après infection a été réalisé à l'aide d'un test ELISA révélant de façon spécifique la présence du parasite. Un traitement lors de l'infestation avec la lectine au 1/50 entraîne une diminution significative du nombre de parasites en culture de 75%, et avec la ConA au 1/100 de 80% par rapport au contrôle sans lectine (C).

### **3.3. Présence de protéines fucosylées dans la paroi microsporidienne**

Durant nos premiers travaux sur l'étude de la glycosylation chez les microsporidies, différentes lectines ont été appliquées à des transferts de profils protéiques de spores d' *E. cuniculi*. Nous avons constaté une affinité de certaines bandes pour l'agglutinine d' *Ulex europaeus I* (UEA) qui reconnaît spécifiquement le L-fucose lié en  $\alpha$ 1,2. Ce résultat est surprenant car cet ose est typiquement en position terminale dans les N-glycanes alors que les N-glycanes n'ont pu être détectés. Sachant que le fucose (Fuc) peut être lié en O sur quelques protéines du myxomycète *Dictyostelium discoideum*, il était intéressant de poursuivre les expérimentations dans ce domaine. La lectine UEA et l'anticorps monoclonal mAb83.5 reconnaissant un épitope inconnu O-lié au Fuc chez *Dictyostelium* (West et Erdos, 1988) ont été appliqués à des profils électrophorétiques de protéines d' *E. cuniculi* et à des coupes ultra-fines de *E. cuniculi* et *A. locustae* .

### **Matériels et méthodes**

#### **Purification de spores et extraction protéique**

*Encephalitozoon cuniculi* (isolat GB-M1) est cultivé sur cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ou fibroblastiques HFF (Human Foreskin Fibroblast). Ces cultures s'effectuent à 37°C, en milieu MEM (« Minimum Essential Medium », Life technologies) supplémenté en sérum de veau foetal 5%, L-glutamine 2mM, ampicilline 100µg/ml, streptomycine 100µg/ml, pénicilline 100 U/ml et fungizone 2,5µg/ml, dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Le surnageant de culture, contenant les spores libérées par lyse naturelle des cellules-hôtes, est collecté tous les deux jours. Les débris de cellules-hôtes sont éliminés par 10 centrifugations successives à 20 000 g pendant 3 min en PBS et la pureté des spores est vérifiée en microscopie photonique. Les spores d'*Antonospora locustae*, isolées de criquets infectés, sont disponibles chez « M&R Durango Insectary » (Bayfield, Colorado, USA). Trois lavages PBS ainsi qu'un contrôle de pureté sont effectués avant utilisation.

Les spores des deux espèces sont placées dans la solution DTT 100mM-urée 4M, pour être ensuite soumises à plusieurs cycles de congélation/décongélation successifs en azote liquide, suivis par une série de courtes expositions aux ultrasons (15 x 1 min dans la glace). L'homogénat est mis sous agitation à 4°C pendant 3 jours. Les échantillons sont finalement centrifugés 5 min à 20 000 g et les surnageants sont récupérés.



### **SDS-PAGE et transfert**

Les protéines de l'extrait DTT-urée sont séparées par SDS-PAGE (12% acrylamide) sous ampérage constant (25 mA) pendant 1,5 h. Elles sont ensuite colorées au bleu de Coomassie (BioRad) ou transférées sur des membranes PVDF (Millipore).

#### Liaison à UEA biotinylée

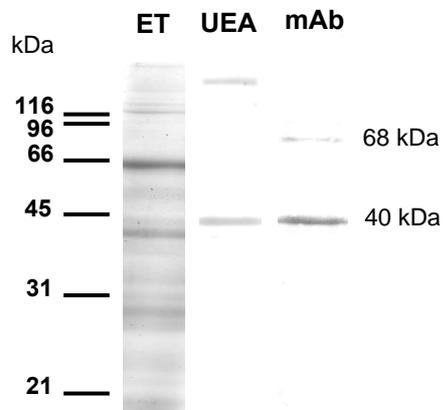
Les membranes sont saturées pendant 1 h à température ambiante en présence de PBS-lait écrémé 5%, lavées en TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) puis en tampon de réaction lectine (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>) pour une incubation de 1 h avec la lectine UEA (*Ulex europaeus* I) biotinylée diluée au 1/500 (EY Laboratories, San Mateo, Ca, USA). Après lavages en TBS, les membranes sont traitées successivement avec un anticorps chèvre anti-biotine (Sigma) et un anti-IgG couplé à la peroxydase, dilués au 1/10 000. La liaison de la lectine est finalement détectée par chimioluminescence sur des hyperfilms ECL (Amersham). La spécificité a été vérifiée par préincubation des membranes dans une solution de fucose 200 mM durant une nuit à 4°C.

#### Liaison à mAb83.5

Les membranes sont saturées en PBS-lait écrémé 5% et incubées pendant 3 h avec une dilution au 1/100 de l'anticorps monoclonal mAb83.5 reconnaissant un épitope fucose O-lié chez *Dictyostelium discoideum* (fourni par le Dr West C, Oklahoma, USA). Après lavage, elles sont traitées 1 h avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (Promega) dilué au 1/10 000 puis révélées à l'aide du mélange usuel NBT-BCIP (Promega).

### **Ultracryotomie et cytochimie**

Des cellules MDCK infestées par *E. cuniculi* sont fixées pendant 1 h à température ambiante avec le mélange paraformaldéhyde 4% -glutaraldéhyde 0,1 % en tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4. Après élimination du fixateur et plusieurs lavages en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (15 min à 1700 g), les cellules sont incubées dans un milieu cryoprotecteur (glycérol 25%-DMSO 5%) pendant 1 h. L'échantillon est congelé par immersion dans l'azote pâteux obtenu à la pression de 10<sup>-6</sup> Torr, puis stocké dans l'azote liquide. Des coupes ultrafines (80-90 nm) sont réalisées à -110°C avec l'ultramicrotome UltracutS Leica pourvu du système Fc4 pour cryocoupes. Les coupes sont déposées sur des grilles de nickel (150 mesh) recouvertes d'une membrane de collodion et conservées à 4°C en PBS, en attente des traitements cytochimiques.



**Figure 1. Présence de protéines fucosylées. (ET)** Profil SDS-PAGE (10%) des protéines totales d' *E. cuniculi*. **(UEA)** Liaison avec la lectine UEA en western Blot. **(mAb)** Immunomarquage en western blot avec l'anticorps mAb83.5 de *D. discoideum*. ET, extrait total; UEA, *Ulex Europaeus*.

### Liaison à UEA biotinylée

Après saturation pendant 1 h en tampon PBS-ovalbumine 1%, les coupes sont déposées pendant 1 h sur une dilution au 1/50 de la lectine UEA biotinylée. Elles sont ensuite traitées 1 h avec l'anticorps anti-biotine au 1/100, puis 1 h avec un anti-IgG conjugué à des billes d'or colloïdal de 5 nm, au 1/100. La spécificité de la réaction a été contrôlée à l'aide d'un pré-traitement avec 80 mU d'une  $\alpha$ -fucosidase (GLYKO) à 37°C pendant 36 h.

### Liaison à mAb83.5

Les coupes sont saturées comme précédemment, incubées 3 h avec l'anticorps mAb 83.5 dilué au 1/20 en PBS, lavées et traitées avec le même anti-IgG couplé à l'or colloïdal pendant 1 h en chambre humide. Elles sont finalement contrastées et enrobées avec une solution acétate d'uranyle 0,8%-méthylcellulose 1,6% pendant 10 min.

Les coupes sont observées au microscope électronique à transmission JEOL 1200EX.

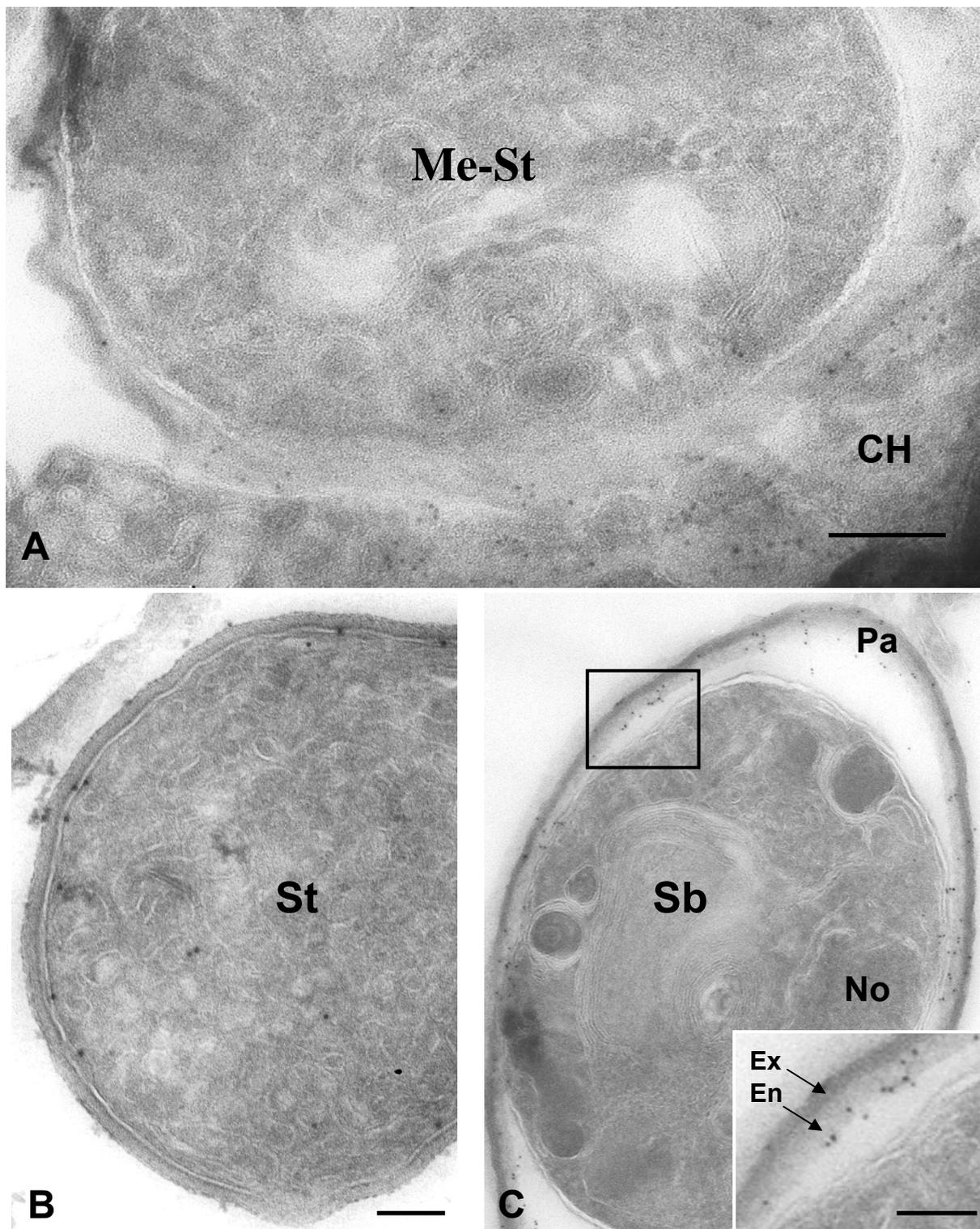
### **Traitement des cellules par la lectine UEA et quantification des parasites**

Les cellules HFF sont cultivées en plaques 96 puits à 37°C jusqu'à confluence, puis  $10^4$  spores purifiées d'*E. cuniculi* sont ajoutées par puit. Dans les premières expériences, l'un des deux partenaires du système hôte-parasite utilisé (cellules HFF ou spores d'*E. cuniculi*) était exposé pendant 2 h à UEA diluée au 1/50<sup>e</sup>, lavé au PBS puis mis en contact avec l'autre partenaire pour le suivi de l'infection sans incubation ultérieure avec la lectine. En l'absence d'effet significatif de ces pré-traitements sur la parasitémie, il a été procédé à une exposition continue à UEA (1/50) à partir du premier jour de post-infection. Plus précisément, les spores sont tout d'abord mises en contact avec les cellules HFF durant 1h30 puis les spores non adhérentes sont éliminées par lavage. Le milieu avec lectine est alors utilisé et renouvelé tous les deux jours. Au 6<sup>ème</sup> jour, les cellules sont fixées, lavées et soumises au test ELISA comme indiqué pour le traitement avec ConA (p107).

## **Résultats/Discussion**

### **Les microsporidies présentent des protéines fucosylées**

Les spores microsporidiennes possédant une paroi très résistante, les procédés d'extraction des protéines nécessitent l'utilisation d'urée et d'un agent réducteur des ponts disulfures (DTT). Les étapes de congélation-décongélation améliorent également la solubilité des protéines. La séparation de protéines en SDS-PAGE, le transfert sur membrane et le traitement avec la



**Figure 2. Localisation en MET des sites de liaison à la lectine UEA et à l'anticorps mAb83.5 sur des cryocoupes d' *E. cuniculi* et *A. locustae*. A-E, liaison UEA sur *E. cuniculi*. A. Le marquage est abondant au niveau de la cellule-hôte et quelques billes sont présentes chez le parasite (méronte-sporonte). B. Chez le sporonte des particules d'or sont déjà observées au niveau de la paroi. C. Le marquage est présent au niveau de l'endospore dans le stade sporoblaste.**

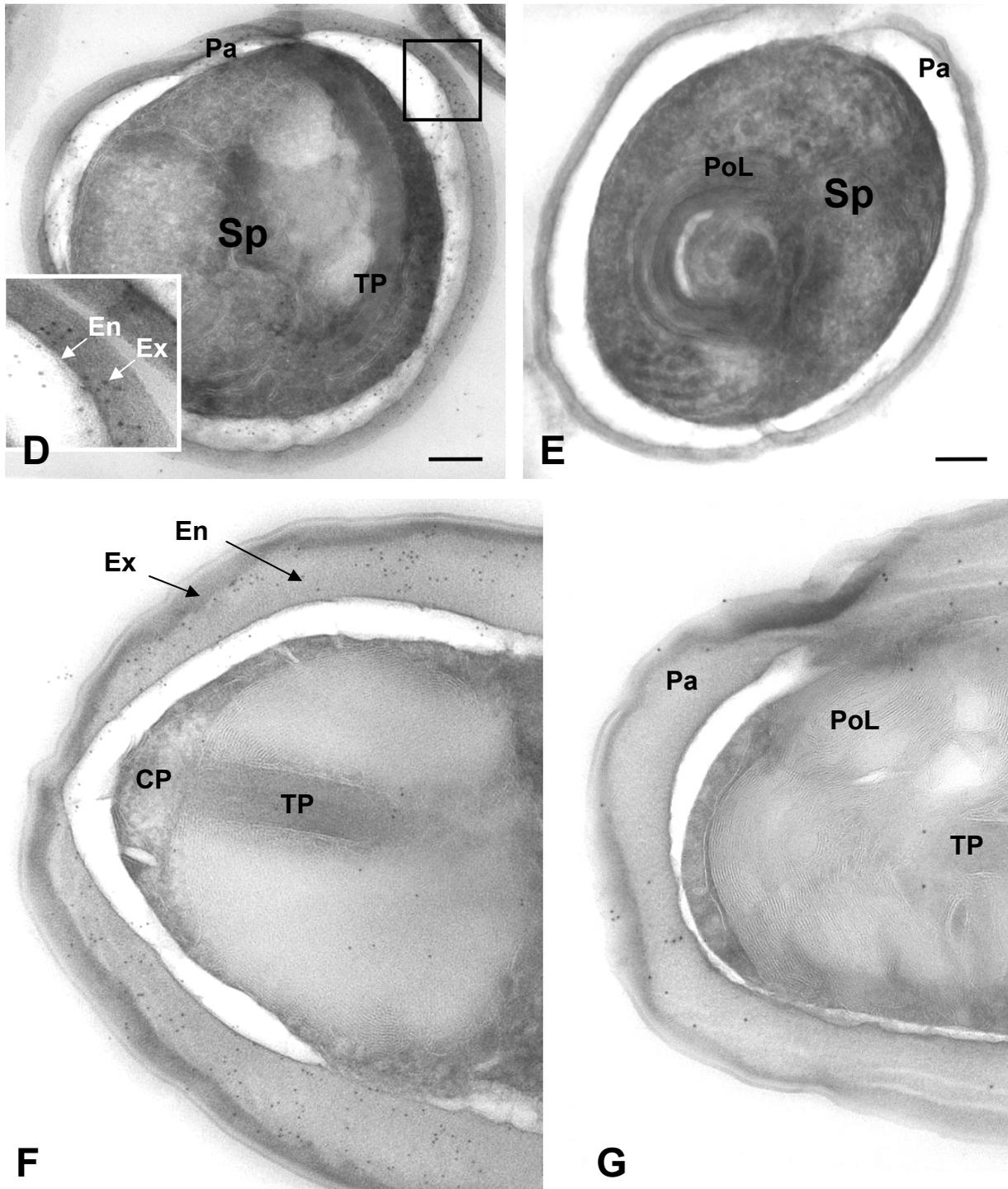
lectine UEA biotinylée ou l'anticorps mAb.83.5 de *D. discoideum* ont ensuite été réalisés. Deux bandes correspondant aux tailles protéiques de 200 kDa et 40 kDa réagissent avec UEA (**Fig. 1**). Une pré-incubation des blots avec du fucose empêche la liaison de la lectine sur ces bandes. L'anticorps mAb83.5 révèle une même bande majeure à 40 kDa ainsi qu'une bande à 68 kDa.

### Les protéines fucosylées sont localisées dans la paroi sporale

La localisation de protéines potentiellement fucosylées chez *E. cuniculi* et *A. locustae* a été recherchée par traitement de cryocoupes ultrafines avec la lectine UEA et l'anticorps mAb83.5. La **Fig. 2A** montre un stade de transition méronte-sporonte. Le marquage UEA très dense au niveau du cytoplasme de la cellule-hôte fournit un bon témoin positif. Quelques particules d'or sont aussi visibles sur la surface du parasite. Le marquage est nettement localisé sur toute la surface des sporontes (**Fig. 2B**) avant de devenir préférentiellement associé à la couche interne de la paroi des sporoblastes (**Fig. 2C**). Une faible réaction est cependant observée au niveau de la couche externe. La situation est inchangée dans la spore mature : l'endospore est plus fortement marquée que l'exospore (**Fig. 2D**). Le marquage est inhibé par un traitement avec une fucosidase, démontrant ainsi la spécificité de la réaction (**Fig. 2E**). Des résultats similaires sont obtenus avec la lectine UEA sur des coupes d' *A. locustae*, les spores matures présentant une réaction importante au niveau de la couche interne de la paroi sporale, marquage très net au vu de l'épaisseur importante de l'endospore chez cette espèce (**Fig. 2F**). Les coupes d' *A. locustae* ont été traitées avec l'anticorps mAb83.5, les spores matures montrant un faible marquage au niveau de l'endospore (**Fig. 2G**). Un marquage plus faible mais toujours localisé majoritairement à l'endospore est obtenu pour *E. cuniculi* (données non montrées).

### Les enzymes impliquées dans la fucosylation

Deux types d'enzymes responsables de l'addition de O-fucose à certaines protéines existent : les protéine-O-fucosyltransférases de types 1 et 2. Les enzymes de type 1 catalysent le transfert du fucose sur des résidus amino-acides hydroxylés dans des motifs répétés de type « epidermal growth factor » ou EGF (Wang *et al.*, 1996), et celles de type 2 dans des répétitions de type thrombospondine ou TSR (Luo *et al.*, 2006). Chez *E. cuniculi*, aucun CDS ne montre d'homologie significative avec les séquences de telles enzymes et aucun gène ne



**Figure 2 (suite).** **D.** La spore mature montre également un marquage abondant au niveau de l'endospore, marquage inhibé par un traitement avec l'enzyme fucosidase (**E**). **F.** Les cryocoupages d' *A. locustae* sont aussi très réactives à la liaison UEA au niveau de l'endospore. **G.** Immunolocalisation avec le mAb83.5 chez *A. locustae*, la même réaction est visible au niveau de l'endospore du parasite mais avec une intensité plus faible. CH, cellule-hôte; CP, capuchon polaire; En, endospore; Ex, exospore; Me, méronite; No, noyau; Pa, paroi cellulaire; PoL, polaroplaste lamellaire; Sb, sporoblaste; Sp, spore; St, sporonte; TP, tube polaire; Echelle, 200 nm.

présente une séquence consensus de O-fucosylation : CXXGG(S/T)C pour le type EGF ou CSX(S/T)CG pour le type TSR. Il faut cependant tempérer ces conclusions négatives car les séquences des enzymes connues sont très divergentes les unes par rapport aux autres et les motifs EGF et TSR ne sont pas les seuls reconnus par les enzymes. Ainsi, la fucosylation d'un inhibiteur de protéases, issu de cellules d'insectes se réalise sur un motif différent (Nakakura *et al.*, 1992) et l'anticorps mAb83.5 ne reconnaît pas la O-fucosylation des modules EGF chez *Dictyostelium* (Srikrishna *et al.*, 1998).

### **ECU10\_1800, une $\alpha$ 1,2-fucosyltransférase putative chez *E. cuniculi***

En dehors des protéine-O-fucosyltransférases, les fucosyltransférases identifiées ou prédites à ce jour sont distribuées dans 3 groupes différents en fonction de leur spécificité de substrat:  $\alpha$ 1,2-fucosyltransférases,  $\alpha$ 1,3/4-fucosyltransférases,  $\alpha$ 1,6-fucosyltransférases (Becker et Lowe, 2003; Martinez-Duncker *et al.*, 2004). Ces enzymes catalysent le transfert du fucose à partir du GDP-fucose à un résidu Gal pour la liaison  $\alpha$ 1,2 ou à un résidu GlcNAc pour la liaison  $\alpha$ 1,3,  $\alpha$ 1,4 ou  $\alpha$ 1,6. Une analyse bioinformatique classique excluait la présence de telles enzymes chez *E. cuniculi*. Par contre, la recherche de courts motifs conservés pour les  $\alpha$ 1,2-fucosyltransférases a permis de détecter un CDS candidat. Ce CDS code la protéine hypothétique ECU10\_1800, avec une taille (336 amino-acides ; 38,5 kDa) proche de celle des fucosyltransférases considérées mais dépourvue du domaine Pfam caractéristique de la famille glycosyltransférase 11. La protéine affiche un pI basique de 9,4 et une seule hélice transmembranaire superposable à un peptide signal dont le site de clivage serait entre les résidus 22 et 23. C'est par une stratégie similaire que des séquences codant des  $\alpha$ 1,2-fucosyltransférases ont été trouvées chez différents organismes : 13 chez *Caenorhabditis elegans*, une seule chez *Leishmania major* (gène non caractérisé) et plusieurs autres chez des bactéries (Oriol *et al.*, 1999). Trois motifs peptidiques sont communs à la plupart de ces protéines. Le motif qui semble le plus conservé est l'heptapeptide HVRRGDY/F (Breton *et al.*, 1998). La protéine microsporidienne ECU10\_1800 possède bien un motif similaire : DVKKGDY. En raison de la forte divergence entre les séquences d'origines différentes, un alignement global fiable ne peut cependant être obtenu (**Fig. 3**).

En conclusion, ECU10\_1800 apparaît comme la seule  $\alpha$ 1,2-fucosyltransférase putative d'*E. cuniculi* dont l'activité pourrait justifier l'affinité de quelques protéines du parasite à la lectine UEA. Le plus souvent, les  $\alpha$ 1,2-fucosyltransférases ajoutent le fucose à des chaînes N-glycaniques. Chez *Dictyostelium*, il peut y avoir addition de fucose en  $\alpha$ 1,2 sur

1 MRKDRVIAFM LTFVLLILC TGAIVMQRRS RGSQSYRTPY KSGCCTSEVG DKNPSRGVAA  
61 KDRTLRFRL TGTVEENEDV KSNSFVLAPG ENHGLTGKED FSHASNREPI EDKLFRRSPR  
121 LISFDVKKGD YIGSCLFELL RKTIDNICDS TPAGQKIHKY FEVNSEHTGL ISHYMKYLRV  
181 FSRRLVLYY DNLEVEDIYT PYSDSIDCFT GIKLTKYHTS TNFTEEEQKY ISYIRQFVDP  
241 EAEKIPKIE SEAQSRLNAM DHIVYTLHY ISLFYKSKQN TMDMLYAKVR AERTGTSTTD  
301 PSRVINGYKY SDIVESVRPI HFVNTNACIV KPLIVK

**Figure 3. Une 1,2 fucosyltransférase potentielle.** Séquence protéique codée par le CDS ECU10\_1800 (336 aa) d'*E. cuniculi*. Elle montre un des motifs conservés des 1,2 fucosyltransférases en position 125 à 131 (surligné en gris).

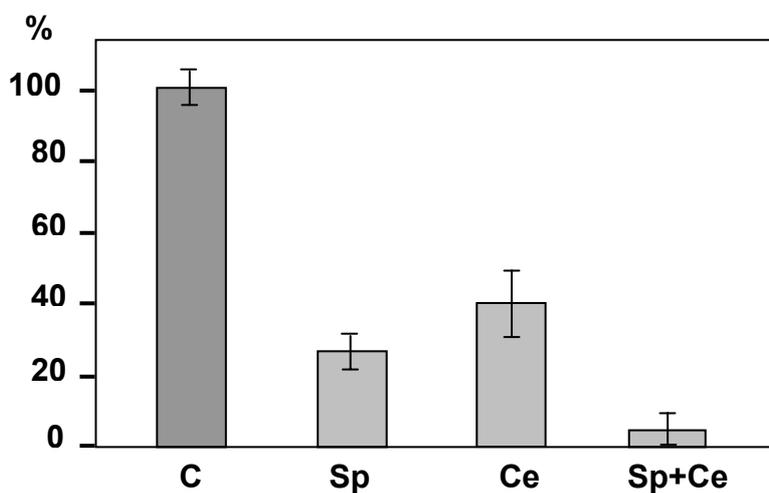
les O-glycanes de l'ubiquitine ligase Skp1; dans ce cas, l'enzyme impliquée est une  $\alpha$ 1,2-fucosyltransférase cytosolique du nom de FT85 (van Der Wel *et al.*, 2001). Aucun homologue de FT85 n'est présent parmi les séquences protéiques d'*E. cuniculi* et la recherche de motifs similaires à ceux des deux domaines glycosyltransférase 2 portés par FT85, s'est révélée négative.

### Quelle forme de fucosylation pour les microsporidies?

Une analyse de la composition en monosaccharides a été réalisée sur les protéines particulièrement insolubles de la paroi des spores d'*E. cuniculi*. Le fucose a été détecté mais en quantité si faible qu'il ne peut être attribuée de façon certaine au parasite lui-même (légère contamination imputable aux cellules-hôtes ou simplement aux manipulations ?).

L'anticorps monoclonal mAb83.5 que nous avons utilisé reconnaît un épitope inconnu O-lié au fucose sur les protéines de surface de *Dictyostelium* (West et Erdos, 1988). Toutefois, l'épitope minimal reconnu par cet anticorps semble être le fucose-1-P puisque aucune glycosylation supplémentaire n'est requise pour la réactivité de l'anticorps (Srikrishna *et al.*, 1998), 2 résidus Fuc ou plus peuvent tout de même accroître cette réactivité. D'après une étude sur la protéine de surface majeure SP96, l'anticorps mAb83.5 reconnaît également la structure : Fuc ( $\alpha$ 1-3)GlcNAc- $\alpha$ -1-P-Ser (Mreyen *et al.*, 2000). Ainsi, la réactivité de protéines microsporidiennes avec cet anticorps ne permet pas de trancher entre les différentes hypothèses pour la liaison du fucose à d'autres sucres.

Les N-glycanes apparaissant absents chez les microsporidies, il semble logique d'envisager la présence de fucose dans des chaînes O-glycaniques. Les analyses en spectrométrie de masse MALDI-TOF et en RMN jusqu'alors réalisées n'ont pas fourni de preuves tangibles pour cette présence. Les conditions d'extraction ne sont peut-être pas optimales pour une fraction protéique fucosylée qui est mineure et principalement associée à une structure pariétale (endospore) très riche en chitine, donc caractérisée par une très forte prépondérance de GlcNAc. La migration électrophorétique des protéines d'*E. cuniculi* se liant à la lectine UEA n'est pas altérée significativement après traitement par une fucosidase. Si ces protéines sont réellement fucosylées, il est tentant de penser que le fucose existe sous forme de très courtes chaînes. Une fucosylation impliquant un ou deux résidus Fuc O-liés en  $\alpha$ 1,2 constitue une hypothèse raisonnable.



**Figure 4. Etude de l'effet de la lectine UEA sur la parasitémie d' *E. cuniculi* sur cellules HFF en culture.** L'estimation du degré de parasitémie 6 jours après infection a été réalisée à l'aide d'un test ELISA révélant de façon spécifique la présence de *E.cuniculi*. La présence de lectine, dans le milieu de culture lors de son changement, est nécessaire afin d'obtenir une diminution significative de la parasitémie. Un prétraitement des spores avant infestation avec la lectine au 1/50 entraîne une diminution significative du nombre de parasites en culture de 70% (Sp), le même prétraitement effectué sur les cellules hôtes diminue la parasitémie de 60% (Ce). L'action combinée des deux prétraitements réduit le taux de parasites à moins de 10% (Sp+Ce) par rapport au témoin sans lectine (C). C, contrôle; Ce, cellule; Sp, spore.

## Effet de la lectine UEA sur la parasitémie

Le traitement avant infestation par la lectine UEA, pendant 2 h, des cellules HFF seules ou des spores d' *E. cuniculi* seules ne modifie pas significativement le nombre de parasites au 6<sup>ème</sup> jour de post-infection. Il en est de même lors d'une infestation impliquant le même pré-traitement pour les deux partenaires. Une diminution (60-70%) est par contre évidente si la lectine est constamment présente dans le milieu de culture (**Fig. 4**). Un test de cytotoxicité mesurant les effets de diverses concentrations de lectine sur la croissance des seules cellules HFF s'est avéré négatif, même à des concentrations supérieures à celles préconisées pour ce test. La lectine a donc un effet spécifique sur la multiplication des parasites. L'examen en microscopie photonique des cellules infestées par *E. cuniculi* révèle une nette réduction de la taille des vacuoles parasitophores.

Le rôle potentiel du fucose dans les phénomènes de reconnaissance et d'invasion n'est pas soutenu puisque le prétraitement UEA des spores ou des cellules HFF, sans ajout de lectine dans le milieu de culture, n'a pas d'incidence. L'action de UEA sur le parasite se déroulerait donc majoritairement en aval de ces processus. La faible taille des vacuoles parasitophores confirme bien le ralentissement du développement intracellulaire. Des examens en immunofluorescence et en microscopie électronique restent à réaliser.

## Recherche des séquences correspondant aux protéines affines à UEA

Après extraction en milieu DTT-urée, les protéines d' *E. cuniculi* ont été chargées sur des colonnes d'affinité UEA. Les protéines accrochées ont été éluées puis séparées par SDS-PAGE. La spécificité d'interaction a été vérifiée, pour les protéines éluées, sur blot avec la lectine UEA. Les bandes colorées au bleu de Coomassie ont été découpées afin de procéder à une analyse MALDI-TOF des peptides tryptiques puis à la recherche des séquences protéiques correspondantes dans les bases de données de *E. cuniculi*. Deux protéines à fonction inconnue sont ressorties avec respectivement 10% et 38% pour le taux de couverture de la séquence (programme Mascot): ECU01\_1070 (44 kDa) et ECU09\_1630 (37 kDa). Un peptide signal et une localisation extracellulaire (probabilité de 44%) sont prédits pour ces deux protéines pouvant justifier le marquage de la bande 40 kDa.

Des protéines recombinantes ont été obtenues et la production d'anticorps polyclonaux chez la souris est en cours, afin de savoir si ces protéines candidates à la fucosylation sont effectivement présentes dans la paroi sporale. Une autre piste pour la caractérisation d'une



protéine fucosylée chez *E. cuniculi* n'est pas à négliger. La bande à 40 kDa se liant à UEA correspond en effet à la taille de la protéine Enp1 (40 kDa), localisée dans l'endospore (Peuvel-Fanget *et al.*, 2005; Taupin *et al.*, 2006). La distribution du marquage UEA sur les cellules parasitaires est très similaire à celle observée avec les anticorps anti-EnP1. La purification de Enp1 sous un état natif permettrait de maintenir ses motifs glucidiques et donc de procéder à des analyses physico-chimiques révélant précisément, le mode d'association covalente à la protéine, la taille des chaînes et la séquence des oses.



## 4. PROTOCOLE DE SEPARATION DES STADES PARASITAIRES D' *E. CUNICULI* SUR GRADIENT DE PERCOLL

---

A l'heure actuelle, l'étude du métabolisme et de la physiologie des microsporidies reste encore fortement entravée par le fait que ces parasites se développent obligatoirement à l'intérieur d'autres cellules. La grande majorité des analyses biochimiques ont été effectuées sur les spores, stades de résistance libérés après lyse des cellules-hôtes. Un important challenge est donc représenté par l'isolement de stades microsporidiens métaboliquement plus actifs que les spores. Le présent protocole de séparation des stades parasites d'*Encephalitozoon cuniculi* a été mis au point dans le but de disposer de fractions cellulaires en quantité suffisante pour mener des études comparatives au niveau moléculaire.

Le matériel biologique de départ est représenté par les surnageants de cultures de cellules de mammifères fortement infectées par *E. cuniculi*. Le choix du mode de séparation s'est porté sur la centrifugation en gradient de densité avec un milieu Percoll-saccharose. La fragilité des stades précoces d'*E. cuniculi* a nécessité l'optimisation de nombreux paramètres : conditions de lyse de la cellule-hôte, réduction des contaminants, nature et concentration des solutés utilisés pour les gradients, vitesse de centrifugation... La filtration sur une colonne de laine de verre s'est révélée être une étape importante pour l'élimination des agrégats et débris cellulaires, préalablement aux centrifugations en gradient de densité. L'homogénéité des fractions collectées et le degré de préservation morphologique des parasites ont été contrôlés en microscopie électronique à transmission.

Quatre fractions issues d'un premier gradient contiennent des stades sporogoniques bien distincts. Trois de ces fractions sont dépourvues de contaminants visibles, soit : une fraction « jeunes sporoblastes », une fraction « sporoblastes âgés + spores immatures » et une fraction « spores matures ». Un second gradient a permis d'éliminer les contaminants de la fraction ayant la plus faible densité et de recueillir ainsi une fraction « sporontes ». Moins abondants et plus fragiles, les mérontes n'ont pu être purifiés. Une comparaison des profils électrophorétiques 2D des protéines extraites des fractions « sporontes » et « spores matures »



fournit un aperçu global de l'expression différentielle de certaines protéines au cours de la sporogonie.

Ce procédé de fractionnement offre donc des perspectives intéressantes pour la biochimie du développement microsporidien : comparaisons de la composition moléculaire des principaux stades sporogoniques, recherche de marqueurs stade-spécifiques, suivi des fluctuations d'activités enzymatiques...



**An improved procedure for Percoll gradient separation of sporogonial stages in *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia)**

Vanessa Taupin, Guy Méténier, Christian P Vivarès and Gérard Prensier

Publié dans Parasitology Research



# An improved procedure for Percoll gradient separation of sporogonial stages in *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia)

Vanessa Taupin · Guy Méténier · Christian P. Vivarès · Gérard Prensier

Received: 11 April 2006 / Accepted: 27 April 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** Intracellular development of microsporidian parasites comprises a proliferative phase (merogony) followed by a differentiation phase (sporogony) leading to the release of resistant spores. Sporogony implies, successively, meront-to-sporont transformation, sporont division into sporoblasts, and sporogenesis. We report a procedure improving the separation of sporogonial stages of *Encephalitozoon cuniculi*, a species that develops inside parasitophorous vacuoles of mammalian cells. Supernatants of *E. cuniculi*-infected Madin–Darby canine kidney cell cultures provided a large number of parasites mixed with host-cell debris. This material was gently homogenized in phosphate-buffered saline containing 0.05% saponin and 0.05% Triton X-100 then filtered through glass wool columns. Centrifugation of the filtrate on 70% Percoll–0.23 M sucrose gradient gave a reproducible pattern of bands at different densities. Transmission electron microscopy showed that three of the four collected fractions were free of visible contaminants. Corresponding prominent cell stages were early sporoblasts (fraction B), late sporoblasts plus immature spores (fraction C), and mature spores (fraction D). Further centrifugation of the lightest fraction (A) on 30% Percoll–0.23 M sucrose gradient generated a sporont-rich fraction (A2). First analysis of proteins from fractions A2 and D by two-dimensional gel electrophoresis suggested a potential use of the described method for proteomic profiling.

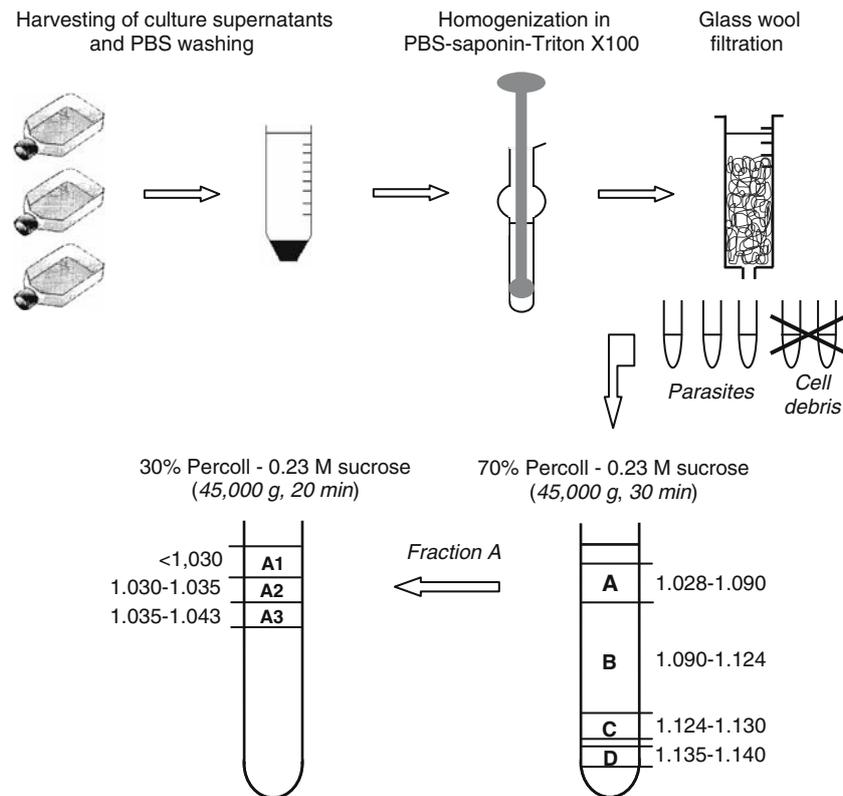
## Introduction

Cell differentiation is necessarily associated with switches between more or less complex life-cycle stages of unicellular eukaryotic parasites. Previous development of methods allowing for the separation and purification of different stages has greatly facilitated some large-scale studies on the stage-specific expression of proteins in these parasites. A good example is provided by a high-throughput proteomics analysis of four isolated stages of *Plasmodium falciparum* (sporozoites, merozoites, trophozoites, and gametocytes) that led to the functional profiling of 2,415 proteins, i.e., 46% of all gene products predicted for the malaria agent (Florens et al. 2002). In *Leishmania donovani*, a comparison of the proteomes of promastigote and amastigote stages has revealed 104 stage-specific proteins that were distributed among five major functional categories (Bente et al. 2003).

Microsporidia are ubiquitous obligate intracellular parasites, and some of these organisms, including *Encephalitozoon cuniculi*, are opportunistic pathogens in immune-deficient humans (Didier 2005; Franzen and Müller 2001). The infective phase of the life cycle of these organisms is mediated by environmentally resistant spores, each harboring a coiled polar tube that can be extruded and then used for transferring the sporoplasm into a new host cell. The proliferative phase or merogony, subsequent to sporoplasm internalization, corresponds to the multiplication of morphologically simple cells called the meronts. Occurring in a same host cell, the differentiation phase or sporogony comprises three main steps: (1) meront-to-sporont transformation characterized by the deposition of a dense cell coat, (2) sporont division producing sporoblasts, and (3) sporoblast-to-spore differentiation marked by the biogenesis of a thick cell wall and of specific cytoplasmic structures such as the polar tube.

V. Taupin · G. Méténier · C. P. Vivarès (✉) · G. Prensier  
Equipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, LBP,  
UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal,  
24 Avenue des Landais,  
63177 Aubière Cedex, France  
e-mail: christian.vivares@univ-bpclermont.fr





**Fig. 1** Main steps of the fractionation of *E. cucurbiti* sporogonial stages

Depending on the considered genus and/or developmental phase, microsporidian cells are in direct contact with host cytoplasm or separated from host cytoplasm by either a thick layer of secreted material (“sporophorous vesicle”) or the membrane of a true parasitophorous vacuole (PV) (Vavra and Larson 1999).

Comparisons of microsporidian stages have mainly been achieved through morphological, cytochemical, and immunocytochemical investigations. Recently, we showed that an in situ RNA hybridization approach using ultrathin frozen sections was of interest for the detection of mRNAs among all the intracellular stages of *E. cucurbiti* coexisting inside PVs (Taupin et al. 2006). This contrasts with the limitations encountered in the use of biochemical methods to study the metabolism and development of these parasites, mainly because only spores were generally purified in sufficient amounts. However, a few procedures involving Percoll gradient centrifugations have been reported for the fractionation of *E. cucurbiti* sporogonial stages that were collected after homogenization of infected host cells (Bacchi et al. 2001, 2004) or after natural release of these stages in culture media (Green et al. 1999). Fractions containing sporonts and early sporoblasts were especially difficult to purify, and the recovery of these cell stages was generally too low for biochemical analyses.

Sequencing of the *E. cucurbiti* genome has revealed about 2,000 potential protein-coding genes (Katinka et al. 2001). Following a proteomic study that identified the sequences of 177 individual proteins in a spore-rich fraction of the same species (Brosson et al. 2006), it became important to have the possibility to analyse some fractions representative of earlier differentiation stages. In this paper, we describe a relatively simple protocol of the separation of *E. cucurbiti* sporogonial stages, from sporonts to mature spores, which should be useful for the identification of developmentally regulated microsporidian proteins and for other comparative molecular studies.

## Materials and methods

### Cell cultures

*Encephalitozoon cucurbiti* (isolate GB-M1, strain I) was maintained with Madin–Darby canine kidney (MDCK) host cells that were grown in Falcon cell culture flasks (25 cm<sup>2</sup>) containing minimum essential medium supplemented with 5% fetal calf serum and 2 mM glutamine, at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (Beauvais et al. 1994). Culture media were changed twice weekly under aseptic



conditions. Supernatants containing parasites released from MDCK cells were harvested.

#### Isolation of microsporidian cell stages

Culture media supernatants were collected from 70 flasks over 1 week. Cells were washed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), 0.8% NaCl [phosphate-buffered saline (PBS)], and concentrated by two successive centrifugations at  $20,000\times g$  for 5 min. Resulting pellet ( $\sim 10^8$  parasite cells) was resuspended in 15 ml of a solution containing 0.05% saponin and 0.05% (v/v) Triton X-100 in PBS. After gentle stirring in a Dounce glass homogenizer (clearance 0.062–0.0875 mm; Kontes Glass) kept on ice, the cell suspension was passed through glass wool plugs (2 g per plug), each occupying a volume of 3–4 ml in 5-ml plastic syringe barrels. Successive fractions ( $\sim 0.5$  ml) of the filtrate were collected and thoroughly checked by light microscopy. After elimination of the most contaminated fractions, the filtrate was equally distributed in two polycarbonate tubes (15 $\times$ 75 mm), each containing 8 ml of 70% Percoll (Pharmacia Fine Chemicals) in 0.23 M sucrose. Gradients were centrifuged at  $45,000\times g$  for 30 min, in a TFT 6513 angular rotor of a Centrikon T-2100 Kontron ultracentrifuge (4°C). Four major regions were distinguished in the following order of increasing density: fraction A (1.028–1.090 g/ml), fraction B (1.090–1.124 g/ml), fraction C (1.124–1.130 g/ml), and fraction D (1.135–1.140 g/ml). Each gradient region was collected with a sterile Pasteur pipette, then diluted in PBS for centrifugation at  $20,000\times g$  for 5 min. The relative purity was evaluated by electron microscopy (EM) examination of corresponding sectioned material. To better purify very early sporogonial stages associated with fraction A, the washed fraction ( $\sim 1.5$  ml) was layered over 8 ml of 30% Percoll–0.23 M sucrose and centrifuged at  $45,000\times g$  for 20 min (4°C). Three upper layers were collected and PBS-washed: fraction A1 (<1.030 g/ml), fraction A2 (1.030–1.035 g/ml), and fraction A3 (1.035–1.043 g/ml). Fraction A2 was significantly enriched in sporonts. Buoyant densities were determined using colored markers (density marker beads, Pharmacia). The whole procedure is outlined in Fig. 1.

#### Transmission EM

Pellets derived from all PBS-washed gradient fractions were fixed in 2% glutaraldehyde, 0.05% ruthenium red, and 0.07 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h at room temperature. After washing for 30 min in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, cells were postfixed for 1 h in 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated through a graded ethanol series, infiltrated in propylene oxide and embedded in Epikote resin (Agar Scientific). Ultrathin sections obtained with an UltracutS

Leica ultramicrotome were double-stained with uranyl acetate and lead citrate, then examined under a JEOL 1200EX transmission electron microscope.

#### Protein extraction and gel electrophoresis

For two-dimensional (2-D) gel electrophoresis, proteins were extracted from cell fractions by repeated cycles of freezing–thawing and sonication in the presence of 7 M urea, 2 M thiourea, 100 mM dithiothreitol (DTT), 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid (CHAPS) and 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS). Insoluble material was removed by centrifugation for 10 min at  $20,000\times g$ . Total protein concentration was estimated using the Bio-Rad Bradford protein assay with bovine serum albumin as standard. Protein samples (50  $\mu$ g) were subjected to isoelectrofocalization along linear immobilized pH gradient strips of 7 cm, pH 3–10 (Amersham) in rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2 mM tributyl phosphine, and 0.5% ampholytes, using the IPGPhor apparatus (Pharmacia). The following sequential program was applied: 30 V for 12 h, 400 V for 30 min, 500 V for 30 min, 800 V for 30 min, 1,000 V for 1 h, 4,000 V for 1 h, and 8,000 V for 2 h. After equilibration with 50 mM Tris–HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 100 mM DTT, and then 135 mM iodoacetamide, strips were loaded onto 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) slab gels (10 $\times$ 7 cm). Electrophoresis was carried out at 25 mA for 1 h. Gels were stained with Coomassie brilliant blue.

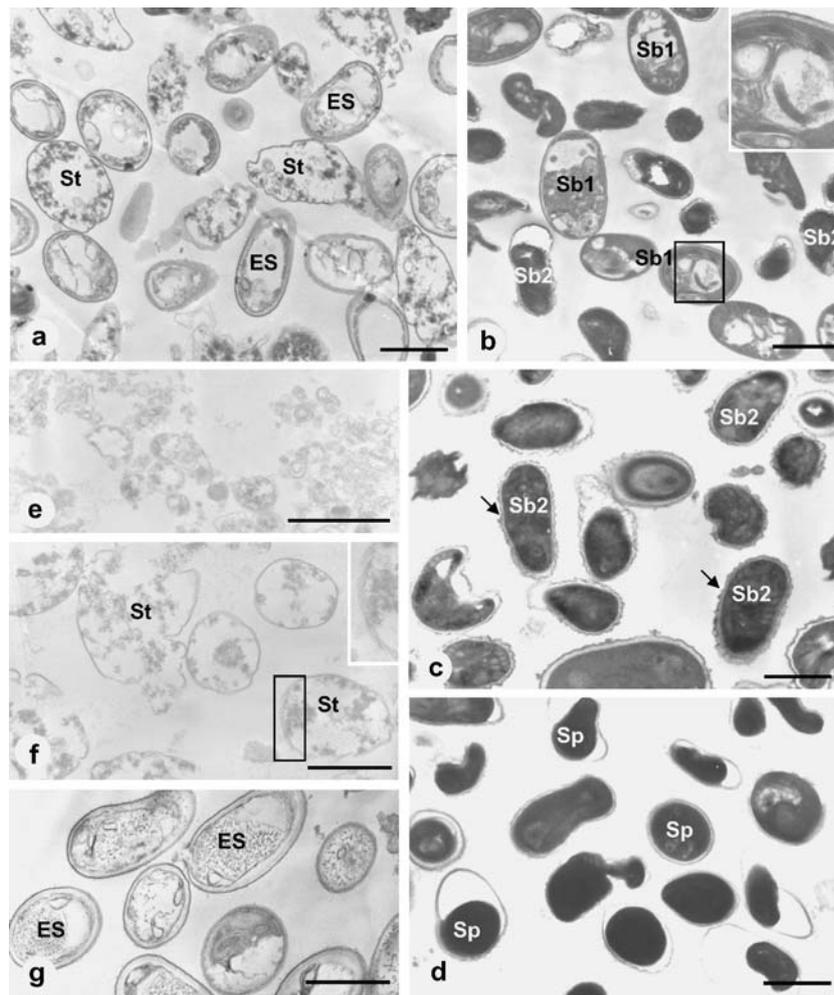
## Results and discussion

#### Percoll gradient separation of *E. cuniculi* sporogonial stages

The procedure we developed for separating different developmental stages of the microsporidian *E. cuniculi* was based on the use of continuous Percoll gradients (Fig. 1). Starting material was represented by cell culture supernatants that contained a population of parasite cells mixed with debris resulting from the lysis of heavily infected MDCK host cells. Small spores predominated but younger parasite stages were also released in the culture medium, given the asynchronous character of *E. cuniculi* development inside PVs.

A mechanical treatment in the presence of a chelator of divalent cations (EDTA) was poorly efficient to dissociate cell aggregates after centrifugation. Thus, after washing in PBS, cells were homogenized with a detergent solution containing saponin and Triton X-100 at low concentrations, as previously used in a protocol producing a sporoblast-enriched fraction (Chavant et al. 2005). This was of special





**Fig. 2** Ultrathin sections of *E. cucurbiti* cells seen in different Percoll gradient fractions. For the fractions obtained by 70% Percoll gradient centrifugation (**a–d**), fraction A (**a**) is a mixture of sporonts (*St*) and “empty” germinated spores (*ES*), and fraction B (**b**) is rich in early sporoblasts (*Sb1*). *Insert* shows higher magnification of a cell region with polar tube precursors. Fraction C (**c**) mainly contains late sporoblasts (*Sb2*) exhibiting thickened chitinous inner wall layers

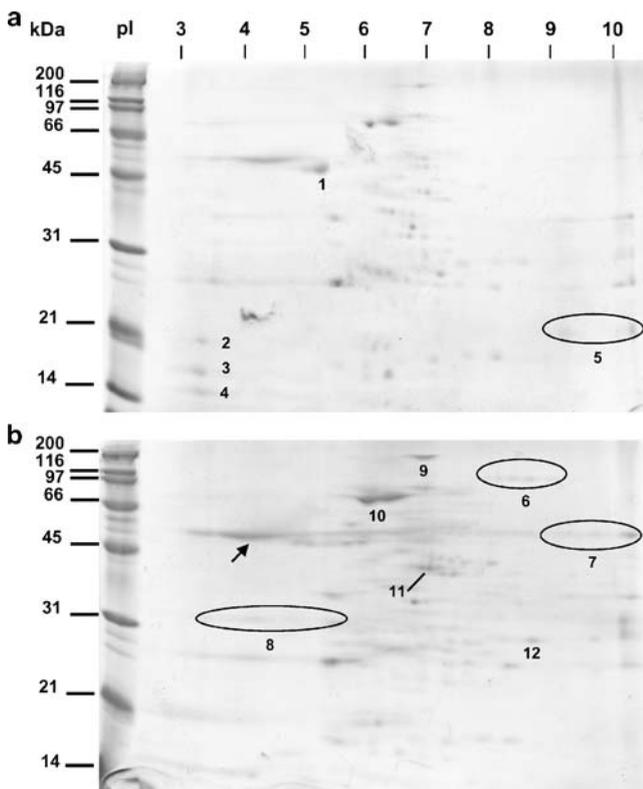
and corrugated outer wall layers (*arrows*). Fraction D (**d**) is typically represented by electron-dense mature spores (*Sp*). After centrifugation on 30% Percoll gradient, fraction A was separated into three parts: fraction A1 (**e**) containing cell debris; fraction A2 (**f**) strongly enriched in sporonts (*St*) with visible cell coat strips, as shown in the *insert*; and fraction A3 (**g**) presenting empty spores (*ES*). *Bar*, 1  $\mu\text{m}$

interest for increasing parasite yield via the disruption of the membrane of PVs that were still recognizable within some incompletely lysed host cells. In the next step, elimination of cellular debris was achieved after filtration through columns of packed glass wool. For continuous density gradient centrifugation, several trials were performed using different Percoll concentrations (from 60 to 90%) and additions to Percoll solution of either 10 $\times$  PBS, 1.5 M NaCl, or 2.3 M sucrose at 1:9 dilution. As judged by phase contrast microscopy, parasite cells with less-refractile cytoplasm and poorly developed cell walls, representative of early sporogonial stages, were present in fractions of low densities. Providing a wide distribution of discrete bands above the heaviest major band containing mature spores, 70% Percoll–0.23 M sucrose gradients were finally chosen.

Four regions (A to D) within a total density range of 1.028–1.140 g/ml were separately processed for EM analysis (Fig. 2a–d).

Centered on 1.060 g/ml near the top of the gradient, fraction A contained two very different kinds of cells: (1) sporonts that were recognizable by their wavy cell coat and (2) “empty” spores that were typically limited by a bipartite cell wall but had lost most internal structures (Fig. 2a) as a result of the germination process then breakage of extruded polar tubes. Small clumps of cellular debris were visible. Fraction B, corresponding to multiple faint bands between 1.090 and 1.124 g/ml, showed sporoblasts that were engaged in various degrees of cell wall and polar tube development (Fig. 2b). The estimated proportion of early sporoblasts, marked by a





**Fig. 3** 2-D gel electrophoresis of proteins from sporont-rich fraction A2 (**a**) and mature-rich spore fraction D (**b**). Spots 1 to 5 are found only in fraction A2. Spots 6 to 8 are found only in fraction D. Spots 9 to 12 are overrepresented in fraction D. *Arrow* indicates a region known to contain PTP1 and SWP1, among other proteins

non- or poorly developed electron-lucent endospore, was close to 70%. A broad heavy band (fraction C) contained late sporoblasts and immature spores displaying a thickened cell wall and polar tube coils (Fig. 2c). As expected, mature spores with a highly electron-dense cytoplasm and two fully differentiated cell wall layers (exospore and endospore) were associated with band D (Fig. 2d). In spite of some variations in cell content of culture supernatants, the pattern of major bands in Percoll–sucrose gradient was reproducible in four independent experiments.

The last step of the procedure aimed to reduce the heterogeneity of fraction A. The cellular material of corresponding bands was pooled, PBS-washed, then loaded on two 30% Percoll–0.23 M gradients. Three A-derived fractions were collected in the upper region of these gradients (Fig. 1) and EM-examined (Fig. 2e–g). The lightest fraction (A1) mainly consisted of cellular debris (Fig. 2e). Fraction A2 in intermediate position was strongly enriched for sporonts (Fig. 2f), their proportion attaining at least 80%. A significant swelling of these cells was observed under the conditions of purification used here. Probably, the slightly thickened cell coat of sporonts did not provide a sufficient protection against external osmotic

pressure changes. Fraction A3 was characterized by a large majority of germinated spore bodies (Fig. 2g). To summarize, we succeeded in the isolation of four cell fractions representative of different *E. cuniculi* sporogonial stages and virtually free of host contaminants: A2 for sporonts, B for early sporoblasts, C for late sporoblasts and immature spores, and D for mature spores.

Compared to a previous method of fractionation of these stages by continuous Percoll gradients (Green et al. 1999), our protocol mainly differed in three points: (1) PBS-washed pellets from culture supernatants were not directly loaded onto gradients but were subjected to saponin–Triton X-100 treatment and glass wool filtration, as additional steps to disrupt aggregates and to reduce the amount of contaminating particles; (2) the use of a single type of gradient consisting of a Percoll–sucrose mixture was sufficient to provide sporoblast and spore fractions with satisfying degrees of purity, whereas a series of three different Percoll gradients (80, 50, and 30%) was applied in Green’s method; and (3) a sporont-rich fraction was secondarily purified by a less-dense Percoll gradient, which was not the case previously. In addition, a good recovery of empty spores in fraction A3 may be viewed as a first step toward the isolation of spore wall fractions. Trypsinized monolayers of *E. cuniculi*-infected RK-13 cells, subjected to disruption in PBS then filtration through 5- $\mu\text{m}$  polycarbonate filters, have been reported to give two major bands on a Percoll gradient (Bacchi et al. 2001). A heavy band contained immature and mature spores while a light band consisted of sporoblasts, empty spores, and some debris. Unfortunately, meronts and sporonts were not identified in the light fraction and the yield of parasite cells was too low for further purification of sporoblasts.

Starting from initial PBS-washed pellets comprising about  $10^8$  *E. cuniculi* cells in two independent experiments, cell counts provided the following total cell numbers for the different fractions: A2,  $8.8\text{--}9.2 \times 10^6$ ; A3,  $1.0\text{--}1.3 \times 10^7$ ; B,  $1.6\text{--}2.1 \times 10^7$ ; C,  $2.6\text{--}2.9 \times 10^7$ ; and D,  $1.8\text{--}2.2 \times 10^7$ . The total recovery of parasites was between 80 and 90%. Fractions A2, A3, B, C, and D were found to contain approximately 250, 190, 670, 650, and 300  $\mu\text{g}$  protein, respectively. The value obtained for mature spores in fraction D is likely an underestimate because of technical difficulties for optimizing the breakage of highly resistant spore walls prior to protein extraction. Protein amounts were, however, sufficient to undertake comparative electrophoretic analyses.

A first comparison of 2-D protein profiles of isolated sporonts and spores

A comparison of the six fractions isolated by Green et al. (1999), using SDS-PAGE and Western blotting with a



murine antiserum to *E. cuniculi*, has supported the expression of new proteins during parasite development. A study on the proteome of *E. cuniculi*, restricted to proteins from a spore-rich fraction, was recently achieved in our laboratory (Brosson et al. 2006). Among spots revealed on 2-D gels, 139 different proteins have been identified using mass spectrometry (MS) techniques and an *E. cuniculi* genome database. In a first attempt to evaluate the interest of our fractionation method for analyzing protein expression in different sporogonial stages, fractions A2 (sporonts) and D (mature spores) were chosen for protein extraction followed by 2-D gel electrophoresis. This choice was justified by a need to assess the quality of the protein profile of fraction A2 containing fragile cell stages and a realistic expectation to find very significant differences in protein distribution when comparing the two farthest stages in sporogony. Figure 3 shows corresponding Coomassie blue-stained profiles after use of a wide pH gradient of ampholytes (3 to 10) in the first dimension step.

Protein spots were scattered in grossly similar isoelectric point (pI) and apparent molecular mass (Mr) intervals for both fractions. Five spots seemed to be specific of sporont fraction (Fig. 3a): a 49-kDa spot (pI 5.0) named spot 1, a more acidic triplet (pI 3.5) declined in three low apparent Mrs (14, 16.5, and 20 kDa for spots 2, 3, and 4, respectively) and a trail in a basic region (pI 9–10) at 21 kDa (spot 5). Some proteins were visualized only in spore fraction, especially those in an ill-resolved 100-kDa region with a pI range of 7.5–8 (spot 6), a 55-kDa basic spot (spot 7), and a 30-kDa region extending from pI 3 to 5.5 (spot 8), as indicated in Fig. 3b. No putative assignment of each of these spots to a single protein sequence was inferred from a search for strictly identical spot positions in the available reference set of MS-identified proteins. However, at least two major structural proteins of the spore are logically present in an acidic region (Fig. 3b, arrow): PTP1, a proline-rich and highly glycosylated polar tube protein with apparent Mr ~55 kDa (Delbac et al. 1998; Peek et al. 2005; Xu et al. 2004) and SWP1, a outer spore wall (exospore) protein with apparent Mr ~51 kDa (Böhne et al. 2000). Among the spots that were clearly most prominent in fraction D and assignable to defined protein sequences, we noted the four following ones: spot 9 for a large-sized polar tube protein (PTP3; locus ECU11\_1440), spot 10 for a doublet of Hsp70 chaperones (ECU03\_0520 and ECU02\_0100), spot 11 for actin (ECU01\_0460), and spot 12 for a protein of unknown function (ECU09\_1820). An up-regulation of *ptp3* mRNA during sporogony has been inferred from reverse transcription-PCR assays (Peuvel et al. 2002), but whether PTP3 protein may really begin to be synthesized in the sporont stage, lacking recognizable polar tube elements, still requires experimental investigations. An overexpression of chaperone proteins in mature

spores that have to be exposed to environmental stresses seems likely. Actin has previously been detected in spores of two *Encephalitozoon* species, the major sites of this conserved cytoskeletal protein being a cortical layer and some cytoplasmic areas close to polar tube coils (Bigliardi et al. 1999).

Thus, although we cannot definitely exclude the possibility a partial leakage of sporont proteins during homogenization and centrifugation steps, the 2-D protein profile of fraction A2 appears fairly adequate for differential proteomics purposes. An improved spot resolution may be expected using large-sized gels, narrower pH gradients, and a silver staining procedure. SDS-PAGE analyses of all purified *E. cuniculi* cell fractions and Western blotting with specific antibodies are currently performed to follow the fluctuations of some major proteins composing spore polar tube and cell wall.

### Perspectives

The described procedure has led to a significant improvement in the separation of cell stages characterizing the progression of *E. cuniculi* sporogony, especially for isolating sporonts and early sporoblasts. An increased yield of such cells with reduced contaminating material was mainly due to a gentle detergent pretreatment and an efficient glass wool filtration. A finer subfractionation of sporoblast stages starting from Percoll–sucrose gradient region B is conceivable. As our initial objective was a good recovery of sporoblasts for preparing extracts destined to 2-D gel electrophoresis or enzyme assays, we decided to collect the entire layer. However, the observation of discrete bands throughout region B strongly suggested the presence of different sporoblast subpopulations. Further EM analysis should help to identify corresponding degrees of development. Depending mainly on laboratory facilities for large-scale cultures, additional fractions reflecting various steps in sporoblast maturation might be obtained and amenable for biochemical and immunological studies.

Differences in spot intensity and number between 2-D protein profiles of *E. cuniculi* sporonts and mature spores have been observed, as expected for the two extreme stages of a long-duration developmental phase involving specific secretory processes. These differences may be exploited for MS analysis of the spots that were overexpressed in the sporal stage and have escaped a previous proteomic study.

Some spots were present in sporont profile and absent in spore profile. This does not imply that such spots contain sporont-specific proteins, given the current lack of protein data for a comparison with precursor merogonial stages. Meronts have been successfully isolated only in *Paranosema* (formerly *Nosema*) *grylli* (Seleznev et al. 1995), but, in contrast with *Encephalitozoon* species, this cricket-infecting microspori-



dian multiplies without being confined inside membrane-bounded PVs. *Encephalitozoon* meronts do not survive for a long time in culture supernatants and do not resist during the fractionation used for sporogonial stages. Despite the fact that these highly fragile stages failed to be purified from a light gradient fraction after mechanical disruption of heavily infected RK-13 cells in PBS (Bacchi et al. 2001), it remains preferable to work with host cells in attempts for *E. cuculiculi* meront isolation. A major obstacle is related to the close apposition between meront plasma membrane and PV membrane (Pakes et al. 1975). Conditions for dissociating this junction without altering meront cell organization have not been found so far. An alternative objective may be the purification of intact PVs followed by the isolation of a fraction enriched in PV membrane–meront cell complexes. It is noteworthy that PVs containing *Leishmania* promastigotes have been purified by calnexin immunoaffinity selection after fractionation on a sucrose step gradient (Kima and Dunn 2005). Immunofluorescence staining of several types of host cells infected with *E. cuculiculi* did not reveal the localization of calnexin, as well as some endosomal and lysosomal markers, in the PV membrane (Fasshauer et al. 2005). The use of an immunoaffinity selection procedure for microsporidia thus remains dependent on the identification of PV or meront membrane proteins.

**Acknowledgements** We are thankful to Dr. Catherine Texier and Dr. Damien Brosson for providing a copy of their manuscript on spore proteomics (in press) and for helping in the spots determinations of 2-D protein profiles. V. Taupin was supported by a grant from “Ministère de l’Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie.”

## References

- Bacchi CJ, Lane S, Weiss LM, Yarlett N, Takvorian P, Cali A, Wittner M (2001) Polyamine synthesis and interconversion by the Microsporidian *Encephalitozoon cuculiculi*. *J Eukaryot Microbiol* 48:374–381
- Bacchi CJ, Rattendi D, Faciane E, Yarlett N, Weiss LM, Frydman B, Woster P, Wei B, Marton LJ, Wittner M (2004) Polyamine metabolism in a member of the phylum Microspora (*Encephalitozoon cuculiculi*): effects of polyamine analogues. *Microbiology* 150:1215–1224
- Beauvais B, Sarfati C, Challier S, Derouin F (1994) In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuculiculi*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2440–2448
- Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, Clos J, Bruchhaus I (2003) Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3:1811–1829
- Bigliardi E, Riparbelli MG, Selmi MG, Bini L, Liberatori S, Pallini V, Bernuzzi A, Gatti S, Scaglia M, Sacchi L (1999) Evidence of actin in the cytoskeleton of microsporidia. *J Eukaryot Microbiol* 46:410–415
- Böhne W, Ferguson DJ, Kohler K, Gross U (2000) Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuculiculi*. *Infect Immun* 68:2268–2275
- Brosson D, Kuhn L, Delbac F, Garin J, Vivarès C, Texier C (2006) Proteomic analysis of the eucaryotic parasite *Encephalitozoon cuculiculi* (Microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics* vol 6 (in press) DOI: 10.1002/pmic.200500796
- Chavant P, Taupin V, El Alaoui H, Wawrzyniak I, Chambon C, Prensier G, Méténier G, Vivarès CP (2005) Proteolytic activity in *Encephalitozoon cuculiculi* sporogonial stages: predominance of metallopeptidases including an aminopeptidase-P-like enzyme. *Int J Parasitol* 35:1425–1433
- Delbac F, Peyret P, Méténier G, David D, Danchin A, Vivarès CP (1998) On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuculiculi*. *Mol Microbiol* 29:825–834
- Didier ES (2005) Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94:61–76
- Fasshauer V, Gross U, Bohne W (2005) The parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuculiculi* lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. *Eukaryot Cell* 4:221–224
- Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, Moch JK, Muster N, Sacci JB, Tabb DL, Witney AA, Wolters D, Wu Y, Gardner MJ, Holder AA, Sinden RE, Yates JR, Carucci DJ (2002) A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419:520–526
- Franzen C, Müller A (2001) Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect* 3:389–400
- Green LC, Didier PJ, Didier ES (1999) Fractionation of sporogonial stages of the microsporidian *Encephalitozoon cuculiculi* by Percoll gradients. *J Eukaryot Microbiol* 46:434–438
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier 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 CP (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuculiculi*. *Nature* 414:450–453
- Kima PE, Dunn W (2005) Exploiting calnexin expression on phagosomes to isolate *Leishmania* parasitophorous vacuoles. *Microb Pathog* 38:139–145
- Pakes SP, Shaddock JA, Cali A (1975) Fine structure of *Encephalitozoon cuculiculi* from rabbits, mice and hamsters. *J Protozool* 22:481–488
- 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* 73:7906–7913
- Peuvél I, Peyret P, Méténier G, Vivarès CP, Delbac F (2002) The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuculiculi*. *Mol Biochem Parasitol* 122:69–80
- Seleznev KV, Issi IV, Dolgikh VV, Belostotskaya GB, Antova OA, Sokolova JJ (1995) Fractionation of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli* from crickets *Gryllus bimaculatus* by centrifugation in Percoll density gradient for biochemical research. *J Eukaryot Microbiol* 42:288–292
- Taupin V, Méténier G, Delbac F, Vivarès CP, Prensier G (2006) Expression of two cell wall proteins during the intracellular development of *Encephalitozoon cuculiculi*: an immunocytochemical and in situ hybridization study with ultrathin frozen sections. *Parasitology* Jun 132(Pt 6):815–825 DOI: 10.1017/S0031182005009777
- Vavra J, Larson J (1999) Structure of the microsporidia. In: Wittner & Weiss (eds) *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM, Washington, DC, pp 7–84
- Xu Y, Takvorian PM, Cali A, Orr G, Weiss LM (2004) Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infect Immun* 72:6341–6350



*"Toute science crée une  
nouvelle ignorance." Henri  
Michaux.*

*Discussion générale*

*et*

*Perspectives*



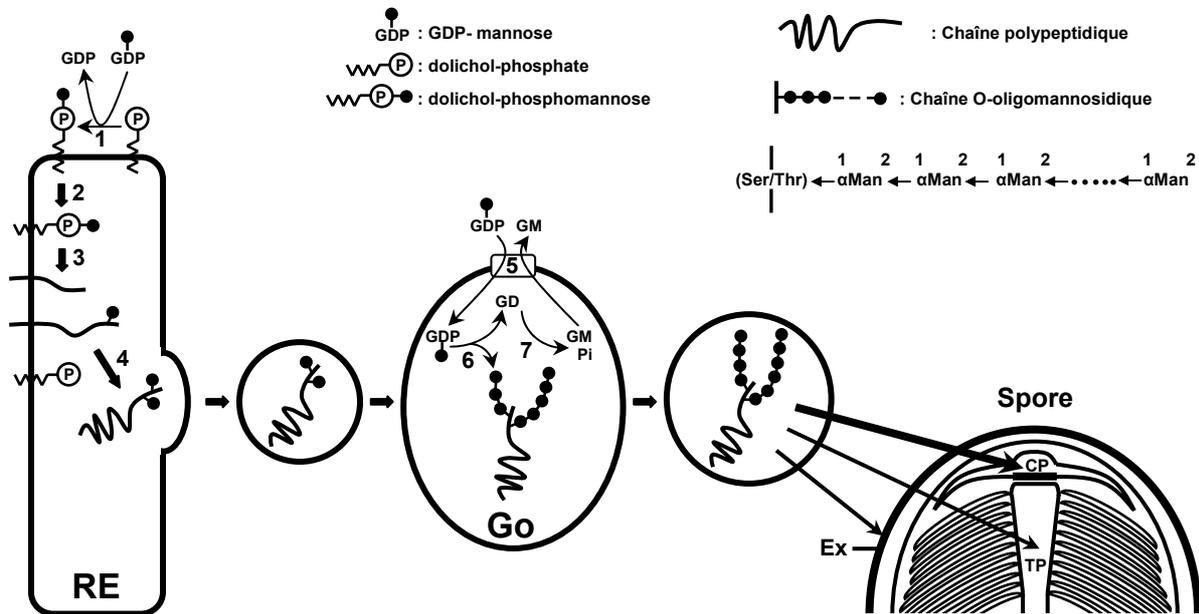
# 1. PROCESSUS DE GLYCOSYLATION

---

## Perte de la N-glycosylation

L'analyse bioinformatique du génome d'*E. cuniculi* a procuré divers exemples de voies métaboliques qui seraient manquantes ou très simplifiées, par rapport à d'autres organismes eucaryotes, y compris d'autres parasites. Un exemple remarquable, également valable pour la microsporidie d'insecte *A. locustae*, est l'absence d'homologues d'enzymes absolument nécessaires à la N-glycosylation : la Dol-P:GlcNAc-P-transférase (Alg7), première enzyme de la biosynthèse de glycanes dépendante du dolichol-P, et l'oligosaccharyltransférase (OST) dont la sous-unité catalytique STT3 assure la formation de la liaison N-glycosidique (Samuelson *et al.*, 2005). De plus, semblablement à *Plasmodium* et *Giardia* (Helenius et Aebi, 2004; Parodi, 2000), *Encephalitozoon* n'a aucun gène pour la machinerie du réticulum endoplasmique (RE) opérant sur les N-glycanes, incluant l'UDP-Glc: glycoprotéine glucosyltransférase, les glucosidases I et II, le système calréticuline/calnexine et les  $\alpha$ 1,2 mannosidases.

Le protéome potentiel d'*E. cuniculi* est aussi dépourvu de certaines protéines connues pour être toujours N-glycosylées chez d'autres Eucaryotes. Un bel exemple a été retrouvé à l'occasion d'une étude menée dans notre laboratoire sur l'activité protéolytique d'une fraction « sporoblastes » (Chavant *et al.*, 2005). Cette activité est largement corrélable à celle de l'aminopeptidase P (AP-P) cytosolique. Les cellules animales présentent deux AP-P bien distinctes et codées par des gènes différents, l'une membranaire, l'autre cytosolique. L'AP-P membranaire localisée dans les lysosomes est N-glycosylée alors que l'AP-P cytosolique ne l'est pas. Seule l'AP-P cytosolique est codée dans le génome d'*E. cuniculi*. La prédiction d'une perte de capacité de N-glycosylation pendant l'évolution microsporidienne n'a pas été contredite par les résultats de nos analyses de fractions glycaniques, tout comme par d'autres recherches qui n'ont pu faire réellement démonstration d'un état N-glycosylé de certaines glycoprotéines. Il est intéressant de rappeler que la sous-unité catalytique STT3 du complexe OST est elle-même N-glycosylée (2 sites très conservés chez les eucaryotes) et que cette N-glycosylation est essentielle au fonctionnement du complexe puisqu'une mutation ponctuelle de l'un des deux sites suffit à l'inactiver (Li *et al.*, 2005). On peut imaginer qu'une mutation touchant le site de N-glycosylation primordial de STT3 aurait pu suffire à rendre inactif OST et conduire à la perte de gènes devenus non essentiels pour la vie du parasite.



**Figure 23. Représentation schématique de la voie de O-mannosylation chez les microsporidies.** (1) Synthèse du Dol-P-Man sur la face cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). (2) Flipping du Dol-P-Man sur la face luminale de la membrane du RE. (3) Le mannose issu du Dol-P-Man est O-lié aux polypeptides en court de synthèse. (4) Achèvement de la synthèse protéique suivie d'un transport vésiculaire vers le Golgi (Go). (5) Entrée du GDP-Man dans la lumière du Golgi couplée à la sortie de GMP. (6) Addition des résidus mannoses liés en  $\alpha 1,2$ . (7) Hydrolyse du GDP. Les mannoprotéines finales peuvent être ciblées aux trois structures sporales majeures: le capuchon polaire (CP), le tube polaire (TP) et l'exospore (Ex).

Le coeur commun aux N-glycanes est considéré comme un facteur important nécessaire au repliement correct des chaînes polypeptidiques néo-synthétisées (Parodi, 2000). Chez les microsporidies, l'incapacité d'effectuer la N-glycosylation peut donc avoir eu pour conséquence une mauvaise conformation de certaines protéines, principalement de protéines membranaires, d'où leur dégradation ultérieure par un système enzymatique spécialisé du RE ou tout au moins la perte de leur fonction d'origine. Il devient alors logique de s'attendre à ce que d'éventuelles interactions entre les membranes plasmiques du parasite et de la cellule-hôte ne fassent pas appel à des protéines parasitaires N-glycosylées. En fait, les zones de contact du parasite avec la surface de la cellule-hôte semblent être limitées à la paroi sporale et au tube polaire extrudé. Seule l'internalisation du sporoplasme par endocytose peut rendre compte d'une interaction entre les deux membranes mais cela est encore du domaine de l'hypothèse (Takvorian *et al.*, 2005).

## O-mannosylation et fucosylation

Nous avons montré que les O-glycanes d'*E. cuniculi* et *A. locustae* sont majoritairement des chaînes linéaires de résidus mannose (Man) liés en  $\alpha$ 1,2. D'une longueur ne dépassant pas 8 Man, ces chaînes sont similaires à celles de certains champignons, notamment de *Candida albicans* où le nombre de Man liés en  $\alpha$ 1,2 peut aller jusqu'à 7 (Gemmill et Trimble, 1999). En s'appuyant sur les données de l'annotation génomique chez *E. cuniculi*, les étapes majeures de la O-mannosylation chez les microsporidies ont été illustrées en **Figure 23**. Une Dol-P-Man synthase (homologue de Dpm1 de *S. cerevisiae*) apporte le Dol-P à une Dol-P-Man mannosyltransférase (famille PMT) qui lie le premier Man à certains résidus Ser/Thr de protéines en cours de transfert co-translationnel dans le RE. Au niveau de l'appareil de Golgi, un transporteur de GDP-Man (homologue de Vrg4 de *S. cerevisiae*) apporte le nucléotide-ose à une  $\alpha$ 1,2-mannosyltransférase (famille KTR) permettant l'élongation de courts glycanes à mannose. Aucun ajout de Man en  $\alpha$ 1,3 ne devrait avoir lieu. Les protéines O-mannosylées peuvent appartenir à trois structures sporales distinctes : le tube polaire, la paroi et le capuchon polaire. Concernant le tube polaire, la protéine PTP1 est un bon candidat puisque son affinité à la ConA a été clairement démontrée (Xu *et al.*, 2004). Au niveau de la paroi, une adhérence des spores d'*E. intestinalis* à la surface de cellules en culture semble impliquer les GAG des protéoglycanes-hôtes (Hayman *et al.*, 2005). Il est connu que la portion mannane des mannoprotéines pariétales est le médiateur majeur de l'adhérence de champignons pathogènes, tels *C. albicans*, à la surface de cellules de l'organisme-hôte (Fukazawa et



Kagaya, 1997). Aucune protéine n'a encore été identifiée au niveau du capuchon polaire. Toutefois, il s'agit de la structure la plus riche en glycoconjugués et sa réactivité avec des lectines spécifiques du mannose indique bien la présence de composants mannosylés. De plus, la réponse immunitaire contre *Encephalitozoon* spp. est partiellement dirigée contre les glycanes de certaines protéines de haut poids moléculaire (100 -250 kDa). Protéines dont la réaction globale en immunofluorescence a été observée dans une zone apicale de la spore coïncidant avec celle occupée par le capuchon polaire (Peek *et al.*, 2005). L'analyse en spectrométrie de masse des peptides tryptiques dérivant de protéines retenues sur colonne d'affinité GNA nous a révélé deux protéines candidates : ECU01\_0990 (141 kDa) et ECU03\_0510 (143 kDa). Après obtention de protéines recombinantes chez *E. coli*, la production d'anticorps chez la souris permettra de tester l'hypothèse d'une localisation dans le capuchon polaire.

Bien que la fucosylation de protéines ne soit pas prédite par l'annotation des gènes microsporidiens, nous avons apporté des arguments expérimentaux en faveur de l'existence d'un tel processus, à l'aide d'une lectine pour Fuc en  $\alpha$ 1,2 (UEA) et d'un anticorps pour un épitope Fuc O-lié (mAb83.5). Deux bandes protéiques sont réactives, l'endospore est particulièrement marquée et la parasitémie est inhibée par UEA. La O-fucosylation de protéines est nécessaire au maintien de l'intégrité de la couche externe de la paroi sporale chez *D. discoideum* (Gonzalez-Yanes *et al.*, 1989). Compte-tenu des résultats de localisation ultrastructurale et de la forte réduction des vacuoles parasitophores en présence d'UEA, il peut être considéré que les protéines fucosylées putatives des microsporidies sont destinées à la paroi sporale et que le blocage de la fucosylation perturbe la biogenèse de la dite paroi, notamment de l'endospore. En d'autres termes, le fucose lié à des protéines pariétales serait déterminant pour une complète élaboration de l'enveloppe protectrice de la spore microsporidienne.

L'importance, peut-être vitale, de la O-mannosylation et de la fucosylation des protéines chez les microsporidies, mériterait d'être testée par l'inactivation génique des enzymes potentiellement impliquées dans ces mécanismes et l'observation des phénotypes résultants. Malheureusement, une telle approche reste théorique car aucune technique de transformation stable n'est actuellement disponible pour ces parasites. Outre le fait qu'aucun des signaux de transcription et traduction ne soit parfaitement connu, la paroi sporale est extrêmement épaisse, difficile à perforer et, pour accéder éventuellement au cytoplasme du méronite d'*E. cuniculi*, le transgène doit franchir successivement la membrane de la cellule-



hôte, celle de la vacuole parasitophore et enfin celle du parasite. La réalisation d'expériences de complémentation chez *Saccharomyces* est plus envisageable.

## **La glypiation est prédite chez *E. cuniculi* mais non documentée expérimentalement**

L'addition d'ancre GPI à certaines protéines a lieu dans le RE de divers Eucaryotes et ces protéines sont souvent impliquées dans la transduction de signaux. Cette glypiation est une forme de glycosylation majeure chez *Plasmodium* (Gowda *et al.*, 1997). L'ancrage GPI des protéines VSP de *Giardia* (Gillin *et al.*, 1990) ou VSG de *Trypanosoma* (Pays *et al.*, 2004), permet à ces protéines d'occuper un maximum de surface au niveau de la membrane plasmique, formant alors un important manteau protecteur.

Deux séquences géniques (ECU07\_0310 et ECU09\_1070) sont révélatrices de la possibilité d'une telle modification chez *E. cuniculi* (Vivarès et Méténier, 2004). La protéine potentielle ECU07\_0310 est similaire à Gpi7, l'une des trois protéines de levure (Gpi7, Gpi13 et Med4) transférant la phosphoéthanolamine sur une chaîne de 3 résidus mannose (Toh-e A et Oguchi, 2002) et se révélant essentielle pour la mise en place de protéines de paroi (Richard *et al.*, 2002). La réaction de transamination qui remplace la séquence signal à l'extrémité C-terminale de la protéine par un GPI devrait dépendre de ECU09\_1070, homologue du composant catalytique Gpi8 de la transaminase. Quelques études récentes suggèrent aussi que certaines protéines d'endospore seraient GPI ancrées (Brosson *et al.*, 2005; Peuvél-Fanget *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). Il pourrait être aussi envisagé un pontage avec des oligomères de chitine, similaire à celui existant chez *Saccharomyces* (Kollar *et al.*, 1997), mais excluant la présence du  $\beta$ -glucane. Les résidus GlcNAc de ces oligomères justifieraient alors l'adsorption de SWP1 et SWP2 d'*E. intestinalis* à une colonne agarose-WGA (Hayman *et al.*, 2001) ou la réactivité de quelques bandes protéiques avec WGA chez *Glugea plecoglossi* (Kim *et al.*, 1999) et *E. cuniculi* (résultats non montrés). La caractérisation physico-chimique des ancres GPI chez les microsporidies apparaît donc comme une voie de recherche parfaitement complémentaire de celle entreprise pour les O-glycanes.



## 2. BIOGENESE DE LA PAROI SPORALE ET AUTRES ASPECTS DU DEVELOPPEMENT PARASITAIRE

---

### Expression de SWP1 et EnP1

Quatre protéines ont été jusqu'alors assignées à l'enveloppe sporale d'*E. cuniculi* : SWP1 dans l'exospore (Bohne *et al.*, 2000), EnP1 et EnP2 dans l'endospore (Peuvel-Fanget *et al.*, 2005), et la possible chitine désacétylase *EcCDA* à l'interface endospore-membrane plasmique (Brosson *et al.*, 2005). Dans notre travail, l'utilisation de l'ultracryotomie a facilité l'accessibilité des sondes anticorps et ADN aux coupes pratiquées dans des stades intracellulaires, permettant ainsi une comparaison SWP1 / EnP1 pour l'expression des ARN messagers et des protéines correspondantes au cours du développement parasitaire. Au niveau transcriptionnel, il s'agit de la première étude par hybridation *in situ* appliquée à une microsporidie, cette approche présentant l'avantage de mettre en relation directe un niveau d'ARNm avec un stade cellulaire défini. Pour SWP1, l'apparition de la protéine dans le revêtement de surface particulier des sporontes va de pair avec un niveau élevé de l'ARNm chez ces sporontes. Pour EnP1, tant la protéine que son messager ont été détectés plus précocement, autrement dit au stade méronite. Le dépôt de cette protéine se poursuit pendant une grande partie du développement au sein d'une couche pariétale interne de plus épaisse et très riche en chitine. Ainsi, EnP1 semble être soumise à une sécrétion constitutive, alors que la production de SWP1 est spécifiquement induite durant la transition méronite-sporonte.

Le dépôt initial de SWP1 se présente nettement sous forme de bandes légèrement espacées (« lamelles ») qui encerclent progressivement le jeune sporonte et devraient contribuer à sa libération dans la lumière de la vacuole parasitophore. Le positionnement périphérique de SWP1 pendant toute la sporogénèse semble pouvoir être mis en relation avec une importante asymétrie de la structure spatiale de cette protéine, suggérée par la structure primaire. La séquence de SWP1 présente en effet une région C-terminale répétitive et extrêmement riche en sérine (44 Ser pour une longueur de 92 aa ; Bohne *et al.*, 2000), une particularité qui n'est retrouvée dans aucune autre séquence protéique d'*E. cuniculi*. Des observations ultrastructurales après cryodécapage ont révélé une nette organisation tripartite de l'exospore chez *E. hellem* (Bigliardi *et al.*, 1996). Une sous-couche externe d'aspect épineux repose sur deux autres sous-couches formées par des fibrilles de 4 nm, ces fibrilles



étant étroitement alignées dans la lamina intermédiaire et assimilées à des fibrilles de chitine. Il se pourrait donc qu'un domaine de SWP1 participe à la formation d'un complexe incluant des chaînes de chitine, le reste de la glycoprotéine étant plus exposé au milieu extracellulaire. Selon Hayman *et al.* (2001), le domaine riche en sérine aurait une position externe.

## **Formation du complexe capuchon polaire-tube polaire, un curieux « serpent »**

L'empilement de coupes sériées passant par des sporoblastes d'*E. cuniculi* a permis la reconstitution 3D de cinq stades représentatifs de la progression de la sporogénèse, soit principalement de la biogénèse de l'appareil invasif car l'évolution de la paroi ne pouvait pas être examinée par la méthode contrastante ZIO. La mise en évidence de microtubules nous a fait postuler un rôle majeur de ces éléments, non seulement dans le transport vésiculaire mais aussi dans le contrôle de la forme du tube polaire. La reconstitution 3D d'un long « serpent » correspondant à une grande ébauche de tube polaire munie d'une coiffe antérieure, pose le problème de l'analyse fine de la séquence spatio-temporelle des processus sécrétoires et morphogénétiques conduisant au complexe «capuchon polaire-tube polaire ». Entre diverses questions concernant l'intervention de l'enveloppe nucléaire, du RE, de l'appareil de Golgi et du cytosquelette, on peut s'interroger sur la réalité du phénomène de fusion « bout à bout » des larges et longues vésicules couramment appelées « précurseurs de tube polaire ». Le diamètre et le contenu de ces vésicules sont sans aucun doute similaires à ceux du tube polaire mais dans notre travail, la reconstitution 3D n'a abouti qu'à un seul « serpent ». L'explication peut résider dans une résolution insuffisante des zones de contact entre vésicules successives, liée à l'épaisseur des coupes (80 nm environ), ainsi que dans l'absence de comparaison avec un stade sporoblastique moins avancé dans cette biogénèse. Une interprétation alternative mais relativement audacieuse serait un allongement progressif d'une seule structure tubulaire et sinueuse à partir d'un même centre organisateur. L'utilisation de la tomographie électronique à l'échelle cellulaire nous semble toute indiquée pour mieux résoudre la dynamique des ébauches de l'appareil invasif microsporidien.

## **Importance du capuchon polaire**

Pendant ces dernières années, la caractérisation moléculaire du tube polaire a significativement progressé au travers de l'identification de trois protéines PTP différentes



chez *Encephalitozoon* spp. (Delbac *et al.*, 1998b; Delbac *et al.*, 2001; Peuvrel *et al.*, 2002). Par contre, comme précédemment souligné, le capuchon polaire a été négligé. La connaissance des protéines mannosylées associées à ce capuchon est donc primordiale pour appréhender de possibles interactions avec des PTP lors de la germination sporale. Après exocytose, le dépôt de certaines de ces protéines le long du tube polaire extrudé pourrait faciliter l'adhérence à la surface d'une cellule-hôte, voire la pénétration dans cette cellule.

Même si la fréquente confusion d'une spore microsporidienne germée avec un spermatozoïde, de la part d'un observateur non averti, peut prêter à sourire, il n'est pas absurde de faire ici un bref parallèle entre le sac polaire et l'acrosome. Ces deux systèmes vésiculaires en forme de chapeau occupent une position apicale qui est critique pour le succès d'une phase de contact entre deux cellules suivie d'une phase de pénétration. L'acrosome du spermatozoïde dérive d'une importante maturation golgienne et renferme des enzymes hydrolytiques dont la libération est requise pour le franchissement d'une enveloppe protectrice de l'ovocyte. Le sac polaire est apparemment d'origine golgienne. Bien que les séquences codant des hydrolases dans le génome d'*E. cuniculi* soient peu diversifiées, un jeu de 26 protéases potentielles existe (Chavant *et al.*, 2005) et le ciblage de certaines d'entre elles à un compartiment microsporidien tel que le sac polaire n'est pas exclu. L'exposition à la ConA procure un marquage très prononcé de l'acrosome (Benoff, 1997) comme du capuchon polaire. Des interactions entre les deux gamètes font intervenir des récepteurs se liant au mannose. En dépit d'une finalité biologique très différente (invasion parasitaire *versus* fécondation) des interactions similaires pourraient exister pour le couple microsporidie / cellule-hôte.

## **Vers une approche globale de l'expression différentielle des protéines**

La mise au point d'un protocole d'isolement de stades sporogoniques d'*E. cuniculi* a été suivie d'une validation en électrophorèse 2D de l'utilisation possible des fractions obtenues pour une approche protéomique différentielle, similaire à celle réalisée pour quatre stades (sporozoïte, mérozoïte, trophozoïte et gamétocyte) chez *Plasmodium falciparum* (Florens *et al.*, 2002) ou deux stades (promastigote et épimastigote) chez *Leishmania donovani* (Bente *et al.*, 2003). Cette approche est d'autant plus envisageable que l'on dispose actuellement d'une première carte protéique d'*E. cuniculi* établie à partir d'une fraction sporale (Brosson *et al.*, 2006b). La principale difficulté à surmonter réside principalement dans l'obtention de cultures



en quantités suffisantes pour réaliser les expériences préliminaires visant à contrôler la reproductibilité du profil protéique 2D de chaque stade et appliquer éventuellement d'autres techniques de séparation des protéines.

Le seul moyen actuel pour différencier avec précision les stades microsporidiens est la microscopie électronique et l'expression de la plupart des protéines structurales connues s'étale sur la majeure partie de la sporogonie, voire aussi en mérogonie pour EnP1. Dans le contexte des études sur la différenciation sporale, la priorité pourrait donc être donnée à l'identification de marqueurs spécifiques des stades soumis à comparaison. Cela implique un repérage minutieux des spots protéiques présents dans un seul de ces stades, l'identification des séquences correspondantes dans le génome et leur expression en système hétérologue pour la production d'anticorps qui seront utilisés pour vérifier la validité des marqueurs au moyen de techniques d'immunofluorescence et d'immunocytochimie ultrastructurale. Des marqueurs de stades particulièrement utiles pourraient être les protéines-kinases, nombre d'entre elles étant impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et de processus morphogénétiques spécifiques (Hergovich, 2006). Chez les microsporidies, une seule protéine-kinase a été caractérisée expérimentalement (Equinet, 2004). Le répertoire génique dévolu à de telles enzymes chez *E. cuniculi* est relativement étendu et les homologies de séquences ne sont pas toujours suffisantes pour une prédiction fonctionnelle précise. L'identification puis l'étude des propriétés d'une protéine-kinase requise pour l'entrée dans la sporogénèse ou pour une étape particulière de cette différenciation seraient donc d'intérêt.

Ces travaux de thèse ont apporté des éléments nouveaux à la connaissance, aux niveaux moléculaire et cellulaire, des processus de glycosylation des protéines et de la biogénèse de la paroi sporale chez les microsporidies. Sans forcément répondre aux multiples questions posées par le déroulement du cycle biologique de ces parasites intracellulaires, la validation de certains outils (imagerie 3D, ultracryotomie et hybridation *in situ*) et le développement d'une méthode d'isolement de stades sporogoniques chez *Encephalitozoon cuniculi*, devraient être des atouts appréciables pour les futures études sur ce pathogène humain opportuniste.



"La recherche procède par des moments distincts et durables, intuition, aveuglement, exaltation et fièvre. Elle aboutit un jour à cette joie, et connaît cette joie celui qui a vécu des moments singuliers." *Albert Einstein.*

# Références bibliographiques



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeijon C, Hirschberg CB (1992).** Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 17, 32-36.
- Acosta-Serrano A, Almeida IC, Freitas-Junior LH, Yoshida N, et Schenkman S (2001).** The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol*, 114, 143-150.
- Aravind L, Iyer LM, Wellems TE, et Miller LH (2003).** *Plasmodium* biology: genomic gleanings. *Cell*, 115, 771-785.
- Avery SW, Undeen AH (1990).** Horizontal transmission of *Parathelohania anophelis* to the copepod, *Microcyclops varicans*, and the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *J Invertebr Pathol*, 56, 98-105.
- Baumann J (1985).** Fluorescence microscopical hybridocytochemistry. *Acta Histochem*, 31, 9-18.
- Baumeister W, Grimm R, et Walz J (1999).** Electron tomography of molecules and cells. *Trends Cell Biol*, 9, 81-85.
- Bause E (1983).** Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J*, 209, 331-336.
- Becker DJ, Lowe JB (2003).** Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 13, 41R-53R.
- Benoff S (1997).** Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod*, 3, 599-637.
- Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, Clos J et al (2003).** Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*, 3, 1811-1829.
- Berhe S, Gerold P, Kedees MH, Holder AA, et Schwarz RT (2000).** *Plasmodium falciparum*: merozoite surface proteins 1 and 2 are not posttranslationally modified by classical N- or O-glycans. *Exp Parasitol*, 94, 194-197.
- Biderre C, Pages M, Metenier G, Canning EU, et Vivares CP (1995).** Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Biochem Parasitol*, 74, 229-231.
- Bigliardi E, Riparbelli MG, Selmi MG, Bini L, Liberatori S, Pallini V, Bernuzzi A et al (1999).** Evidence of actin in the cytoskeleton of microsporidia. *J Eukaryot Microbiol*, 46, 410-415.
- Bigliardi E, Sacchi L (2001).** Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect*, 3, 373-379.
- Bigliardi E, Selmi MG, Lupetti P, Corona S, Gatti S, Scaglia M, et Sacchi L (1996).** Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *J Eukaryot Microbiol*, 43, 181-186.
- Bohm J, Lambert O, Frangakis AS, Letellier L, Baumeister W, et Rigaud JL (2001).** FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: a cryo-electron tomography study. *Curr Biol*, 11, 1168-1175.



- Bohne W, Ferguson DJ, Kohler K, et Gross U (2000).** Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun*, 68, 2268-2275.
- Boyle EC, Finlay BB (2003).** Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 633-639.
- Braun-Breton C., Rosenberry TL, et Pereira da Silva LH (1990).** Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens. *Res Immunol*, 141, 743-755.
- Braun-Breton C, Rosenberry TL, et da Silva LP (1988).** Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in *Plasmodium falciparum* by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C. *Nature*, 332, 457-459.
- Breton C, Oriol R, et Imberty A (1998).** Conserved structural features in eukaryotic and prokaryotic fucosyltransferases. *Glycobiology*, 8, 87-94.
- Briza P, Ellinger A, Winkler G, et Breitenbach M (1988).** Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *J Biol Chem*, 263, 11569-11574.
- Briza P, Winkler G, Kalchhauser H, et Breitenbach M (1986).** Dityrosine is a prominent component of the yeast ascospore wall. A proof of its structure. *J Biol Chem*, 261, 4288-4294.
- Brosson D, Kuhn L, Delbac F, Garin J, Vivares C, et Texier C (2006).** Proteomic analysis of the eucaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics*, (in press).
- Brosson D, Kuhn L, Prensier G, Vivarès CP, et Texier C (2005).** The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: a surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation. *FEMS Microbiol Lett*, 247, 81-90.
- Brown WJ, Farquhar MG (1984).** Accumulation of coated vesicles bearing mannose 6-phosphate receptors for lysosomal enzymes in the Golgi region of I-cell fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 5135-5139.
- Cali A, Takvorian P (1999).** Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In *The microsporidia and microsporidiosis*. Wittner, et Weiss (eds). ASM Press, pp. 85-128.
- Cali A, Weiss LM, et Takvorian PM (2002).** *Brachiola algerae* spore membrane systems, their activity during extrusion, and a new structural entity, the multilayered interlaced network, associated with the polar tube and the sporoplasm. *J Eukaryot Microbiol*, 49, 164-174.
- Canning EU (1993).** Microsporidia. In *Parasite Protozoa*. Kreier J.P. (ed)., pp. 299-370.
- Canning EU, Lom J (1986).** *The microsporidia of Vertebrates* London: Academic Press, pp. 1-289.
- Carruthers VB, Hakansson S, Giddings OK, et Sibley LD (2000).** *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infect Immun*, 68, 4005-4011.
- Cavalier-Smith T (1987).** Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*, 326, 332-333.
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, et Martinez JP (1998).** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 130-180.
- Chai W, Yuen CT, Kogelberg H, Carruthers RA, Margolis RU, Feizi T, et Lawson AM (1999).** High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-



- glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *Eur J Biochem*, 263, 879-888.
- Chandra NC, Spiro MJ, et Spiro RG (1998).** Identification of a glycoprotein from rat liver mitochondrial inner membrane and demonstration of its origin in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 273, 19715-19721.
- Chavant P, Taupin V, El Alaoui H, Wawrzyniak I, Chambon C, Prensier G, Metenier G et al (2005).** Proteolytic activity in *Encephalitozoon cuniculi* sporogonial stages: predominance of metallopeptidases including an aminopeptidase-P-like enzyme. *Int J Parasitol*, 35, 1425-1433.
- Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I et al (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, 2156-2162.
- Christian R, Schulz G, Schuster-Kolbe J, Allmaier G, Schmid ER, Sleytr UB, et Messner P (1993).** Complete structure of the tyrosine-linked saccharide moiety from the surface layer glycoprotein of *Clostridium thermohydrosulfuricum* S102-70. *J Bacteriol*, 175, 1250-1256.
- Ciucanu I, Kerek F (1984).** A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res*, 131, 209-217.
- Cohen RE, Ballou CE (1980).** Linkage and sequence analysis of mannose-rich glycoprotein core oligosaccharides by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 19, 4345-4358.
- Coluccio A, Bogengruber E, Conrad MN, Dresser ME, Briza P, et Neiman AM (2004).** Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 3, 1464-1475.
- Conzelmann A, Fankhauser C, et Desponds C (1990).** Myoinositol gets incorporated into numerous membrane glycoproteins of *Saccharomyces cerevisiae*; incorporation is dependent on phosphomannomutase (sec53). *EMBO J*, 9, 653-661.
- Conzelmann A, Puoti A, Lester RL, et Desponds C (1992).** Two different types of lipid moieties are present in glycoposphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 11, 457-466.
- Couzinet S, Cejas E, Schittny J, Deplazes P, Weber R, et Zimmerli S (2000).** Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, 68, 6939-6945.
- Coyle C, Kent M, Tanowitz HB, Wittner M, et Weiss LM (1998).** TNP-470 is an effective antimicrosporidial agent. *J Infect Dis*, 177, 515-518.
- Curgy J., Vavra J., et Vivarès C.P. (1980).** Presence of ribosomal RNAs prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol Cell*, 38, 49-52.
- Cutler JE (2001).** N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol*, 39 Suppl 1, 75-86.
- Dall DJ (1983).** A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the Microspora. *J Theor Biol*, 105, 647-659.
- Das S, Gillin FD (1996).** *Giardia lamblia*: increased UDP-N-acetyl-D-glucosamine and N-acetyl-D-galactosamine transferase activities during encystation. *Exp Parasitol*, 83, 19-29.



- Das S, Traynor-Kaplan A, Reiner DS, Meng TC, et Gillin FD (1991).** A surface antigen of *Giardia lamblia* with a glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem*, 266, 21318-21325.
- Datta B, Ray MK, Chakrabarti D, Wylie DE, et Gupta NK (1989).** Glycosylation of eukaryotic peptide chain initiation factor 2 (eIF-2)-associated 67-kDa polypeptide (p67) and its possible role in the inhibition of eIF-2 kinase-catalyzed phosphorylation of the eIF-2 alpha-subunit. *J Biol Chem*, 264, 20620-20624.
- Dayal-Drager R, Hoessli DC, Decrind C, Del Guidice G, Lambert PH, et Nasir uD (1991).** Presence of O-glycosylated glycoproteins in the *Plasmodium falciparum* parasite. *Carbohydr Res*, 209, c5-c8.
- del Aguila C, Rueda C, De la CC, et Fenoy S (2001).** Seroprevalence of anti-*Encephalitozoon* antibodies in Spanish immunocompetent subjects. *J Eukaryot Microbiol*, Suppl, 75S-78S.
- Delbac F, Duffieux F, David D, Metenier G, et Vivares CP (1998a).** Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *J Eukaryot Microbiol*, 45, 224-231.
- Delbac F, Peyret P, Méténier G, David D, Danchin A, et Vivarès CP (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, et Vivares CP (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, 1016-1024.
- Dell A, Reason AJ, Khoo KH, Panico M, McDowell RA, et Morris HR (1994).** Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers. *Methods Enzymol*, 230, 108-132.
- Desportes I (1976).** Ultrastructure de *Stempellia mutabilis* Léger & Hesse, microsporidie parasite de l'ephémère *Ephemera vulgata* L. *Protistologica*, 12, 121-150.
- Desportes-Livage I (1996).** Human microsporidiosis and AIDS: recent advances. *Parasite*, 3, 107-113.
- Desportes-Livage I, Chilmonczyk S, Hedrick R, Ombrouck C, Monge D, Maiga I, et Gentilini M (1996).** Comparative development of two microsporidian species: *Enterocytozoon bieneusi* and *Enterocytozoon salmonis*, reported in AIDS patients and salmonid fish, respectively. *J Eukaryot Microbiol*, 43, 49-60.
- Dieckmann-Schuppert A, Bause E, et Schwarz RT (1993).** Studies on O-glycans of *Plasmodium-falciparum*-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *Eur J Biochem*, 216, 779-788.
- Dieckmann-Schuppert A, Bender S, Odenthal-Schnittler M, Bause E, et Schwarz RT (1992).** Apparent lack of N-glycosylation in the asexual intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem*, 205, 815-825.
- Dolgikh VV, Semenov PB (2003).** Trehalose catabolism in microsporidia *Nosema grylli* spores. *Parazitologiya*, 37, 333-342.
- Doucey MA, Hess D, Blommers MJ, et Hofsteenge J (1999).** Recombinant human interleukin-12 is the second example of a C-mannosylated protein. *Glycobiology*, 9, 435-441.



- Dowd SE, Gerba CP, et Pepper IL (1998).** Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3332-3335.
- Dubochet J (1995).** High-pressure freezing for cryoelectron microscopy. *Trends Cell Biol*, 5, 366-368.
- Ecker M, Mrsa V, Hagen I, Deutzmann R, Strahl S, et Tanner W (2003).** O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep*, 4, 628-632.
- Elmendorf HG, Haldar K (1994).** *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *J Cell Biol*, 124, 449-462.
- Enriquez FJ, Ditrich O, Palting JD, et Smith K (1997).** Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J Clin Microbiol*, 35, 724-729.
- Ernst JF, Prill SK (2001).** O-glycosylation. *Med Mycol*, 39 Suppl 1, 67-74.
- Faille C, Wieruszkeski JM, Michalski JC, Poulain D, et Strecker G (1992).** Complete <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-resonance assignments for D-mannooligosaccharides of the beta-D-(1-->2)-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW.32 (serotype A). *Carbohydr Res*, 236, 17-27.
- Fasshauer V, Gross U, et Bohne W (2005).** The parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. *Eukaryot Cell*, 4, 221-224.
- Fast NM, Keeling PJ (2001).** Alpha and beta subunits of pyruvate dehydrogenase E1 from the microsporidian *Nosema locustae*: mitochondrion-derived carbon metabolism in microsporidia. *Mol Biochem Parasitol*, 117, 201-209.
- Fast NM, Law JS, Williams BA, et Keeling PJ (2003).** Bacterial catalase in the microsporidian *Nosema locustae*: implications for microsporidian metabolism and genome evolution. *Eukaryot Cell*, 2, 1069-1075.
- Fedorko DP, Nelson NA, et Cartwright CP (1995).** Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol*, 33, 1739-1741.
- Ferguson MA (1997).** The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352, 1295-1302.
- Ferguson MA (1999).** The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*, 112, 2799-2809.
- Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA, et Rademacher TW (1988).** Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, 239, 753-759.
- Ferguson MA, Low MG, et Cross GA (1985).** Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Biol Chem*, 260, 14547-14555.
- Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, Moch JK et al (2002).** A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 419, 520-526.



- Foucault C, Drancourt M (2000).** Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. *Microb Pathog*, 28, 51-58.
- Franzen C (2005).** How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol (Praha)*, 52, 36-40.
- Franzen C, Muller A (1999).** Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev*, 12, 243-285.
- Franzen C, Muller A (2001).** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect*, 3, 389-400.
- Franzen C, Muller A, Schwenk A, Salzberger B, Fatkenheuer G, Mahrle G, Diehl V et al (1995).** Intestinal microsporidiosis with *Septata intestinalis* in a patient with AIDS--response to albendazole. *J Infect*, 31, 237-239.
- Frixione E, Ruiz L., Santillan M., de Vargas L.V., Tejero J.M., et Undeen A.H. (1992).** Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motil Cytoskel*, 22, 38-50.
- Fukazawa Y, Kagaya K (1997).** Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol*, 35, 87-99.
- Funk VA, Thomas-Oates JE, Kielland SL, Bates PA, et Olafson RW (1997).** A unique, terminally glucosylated oligosaccharide is a common feature on *Leishmania* cell surfaces. *Mol Biochem Parasitol*, 84, 33-48.
- Gasnier F, Rousson R, Lerme F, Vaganay E, Louisot P, et Gateau-Roesch O (1992).** Mitochondrial dolichyl-phosphate mannose synthase. Purification and immunogold localization by electron microscopy. *Eur J Biochem*, 206, 853-858.
- Gemmill TR, Trimble RB (1999).** Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta*, 1426, 227-237.
- Gentsch M, Tanner W (1997).** Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology*, 7, 481-486.
- Gentsch M, Tanner W (1996).** The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J*, 15, 5752-5759.
- Germot A, Philippe H, et Le Guyader H (1997).** Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol Biochem Parasitol*, 87, 159-168.
- Gerold P, Dieckmann-Schuppert A, et Schwarz RT (1994).** Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J Biol Chem*, 269, 2597-2606.
- Gerold P, Jung N, Azzouz N, Freiberg N, Kobe S, et Schwarz RT (1999).** Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum* in a cell-free incubation system: inositol acylation is needed for mannosylation of glycosylphosphatidylinositols. *Biochem J*, 344 Pt 3, 731-738.
- Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA, et Schwarz RT (1996).** Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 75, 131-143.



- Gerwig GJ, Kamerling JP, Vliegthart JF, Morag E, Lamed R, et Bayer EA (1993).** The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*. *J Biol Chem*, 268, 26956-26960.
- Gerwig GJ, van Kuik JA, Leeftang BR, Kamerling JP, Vliegthart JF, Karr CD, et Jarroll EL (2002).** The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel beta(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study. *Glycobiology*, 12, 499-505.
- Gillin FD, Hagblom P, Harwood J, Aley SB, Reiner DS, McCaffery M, So M et al (1990).** Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4463-4467.
- Girrbach V, Strahl S (2003).** Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem*, 278, 12554-12562.
- Gonzalez-Yanes B, Cicero JM, Brown RD, Jr., et West CM (1992).** Characterization of a cytosolic fucosylation pathway in *Dictyostelium*. *J Biol Chem*, 267, 9595-9605.
- Gonzalez-Yanes B, Mandell RB, Girard M, Henry S, Aparicio O, Gritzali M, Brown RD, Jr. et al (1989).** The spore coat of a fucosylation mutant in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol*, 133, 576-587.
- Gowda DC, Gupta P, et Davidson EA (1997).** Glycosylphosphatidylinositol anchors represent the major carbohydrate modification in proteins of intraerythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 272, 6428-6439.
- Green JR, Northcote DH (1978).** The structure and function of glycoproteins synthesized during slime-polysaccharide production by membranes of the root-cap cells of maize (*Zea mays*). *Biochem J*, 170, 599-608.
- Guerardel Y, Balanzino L, Maes E, Leroy Y, Coddeville B, Oriol R, et Strecker G (2001).** The nematode *Caenorhabditis elegans* synthesizes unusual O-linked glycans: identification of glucose-substituted mucin-type O-glycans and short chondroitin-like oligosaccharides. *Biochem J*, 357, 167-182.
- Guha-Niyogi A, Sullivan DR, et Turco SJ (2001).** Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology*, 11, 45R-59R.
- Guitteny AF, Fouque B, Mouglin C, Teoule R, et Bloch B (1988).** Histological detection of messenger RNAs with biotinylated synthetic oligonucleotide probes. *J Histochem Cytochem*, 36, 563-571.
- Gustafson GL, Milner LA (1980).** Occurrence of N-acetylglucosamine-1-phosphate in proteinase I from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*, 255, 7208-7210.
- Hallgren P, Lundblad A, et Svensson S (1975).** A new type of carbohydrate-protein linkage in a glycopeptide from normal human urine. *J Biol Chem*, 250, 5312-5314.
- Hang HC, Bertozzi CR (2005).** The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem*, 13, 5021-5034.
- Harris RJ, Leonard CK, Guzzetta AW, et Spellman MW (1991).** Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry*, 30, 2311-2314.



- Harris RJ, Spellman MW (1993).** O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology*, 3, 219-224.
- Hart GW (1997).** Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem*, 66, 315-335.
- Harty C, Strahl S, et Romisch K (2001).** O-mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell*, 12, 1093-1101.
- Haselbeck A (1989).** Purification of GDP mannose:dolichyl-phosphate O-beta-D-mannosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 181, 663-668.
- Hayette MP, Strecker G, Faille C, Dive D, Camus D, Mackenzie DW, et Poulain D (1992).** Presence of human antibodies reacting with *Candida albicans* O-linked oligomannosides revealed by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids. *J Clin Microbiol*, 30, 411-417.
- Hayman JR, Hayes SF, Amon J, et Nash TE (2001).** Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect Immun*, 69, 7057-7066.
- Hayman JR, Southern TR, et Nash TE (2005).** Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infect Immun*, 73, 841-848.
- Haynes PA, Ferguson MA, et Cross GA (1996).** Structural characterization of novel oligosaccharides of cell-surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Glycobiology*, 6, 869-878.
- Haynes PA, Gooley AA, Ferguson MA, Redmond JW, et Williams KL (1993).** Post-translational modifications of the *Dictyostelium discoideum* glycoprotein PsA. Glycosylphosphatidylinositol membrane anchor and composition of O-linked oligosaccharides. *Eur J Biochem*, 216, 729-737.
- Heitzmann H, Richards FM (1974).** Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 3537-3541.
- Helenius A, Aebi M (2004).** Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 73, 1019-1049.
- Herscovics A, Orlean P (1993).** Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J*, 7, 540-550.
- Hiltpold A, Frey M, Hulsmeier A, et Kohler P (2000).** Glycosylation and palmitoylation are common modifications of *Giardia* variant surface proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 109, 61-65.
- Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, Canning EU, et Embley TM (1997).** A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol*, 7, 995-998.
- Hoessli DC, Poincelet M, Gupta R, Ilangumaran S, et Nasir uD (2003).** *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Eur J Biochem*, 270, 366-375.
- Hofsteenge J, Huwiler KG, Macek B, Hess D, Lawler J, Mosher DF, et Peter-Katalinic J (2001).** C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem*, 276, 6485-6498.
- Hofsteenge J, Muller DR, de Beer T, Loffler A, Richter WJ, et Vliegenthart JF (1994).** New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry*, 33, 13524-13530.



- Homans SW, Ferguson MA, Dwek RA, Rademacher TW, Anand R, et Williams AF (1988).** Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature*, 333, 269-272.
- Horowitz RA, Koster AJ, Walz J, et Woodcock CL (1997).** Automated electron microscope tomography of frozen-hydrated chromatin: the irregular three-dimensional zigzag architecture persists in compact, isolated fibers. *J Struct Biol*, 120, 353-362.
- Huang W, Klionsky D (2002).** Autophagy in yeast: a review of molecular machinery. *Cell Struct Funct*, 27, 409-420.
- Ilg T, Overath P, Ferguson MA, Rutherford T, Campbell DG, et McConville MJ (1994).** O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. *J Biol Chem*, 269, 24073-24081.
- Ilg T, Stierhof YD, Craik D, Simpson R, Handman E, et Bacic A (1996).** Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *J Biol Chem*, 271, 21583-21596.
- Ishihara R, Hayashin Y (1968).** Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *N. bombycis*. *J Invertebr Pathol*, 11, 377-385.
- Ivatt RL, Das OP, Henderson EJ, et Robbins PW (1984).** Glycoprotein biosynthesis in dictyostelium discoideum: developmental regulation of the protein-linked glycans. *Cell*, 38, 561-567.
- Jambou R, Hatin I, et Jaureguiberry G (1995).** Evidence by *in situ* hybridization for stage-specific expression of the ATP/ADP translocator mRNA in *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol*, 80, 568-571.
- Jensen HM, Wellings SR (1972).** Development of the polar filament-polaroplast complex in a microsporidian parasite. *J Protozool*, 19, 297-305.
- John HA, Birnstiel ML, et Jones KW (1969).** RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223, 582-587.
- Johnson SW, Alhadeff JA (1991).** Mammalian alpha-L-fucosidases. *Comp Biochem Physiol B*, 99, 479-488.
- Joseph J, Vemuganti GK, et Sharma S (2005).** Microsporidia: emerging ocular pathogens. *Indian J Med Microbiol*, 23, 80-91.
- Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C et al (2004).** A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119, 329-341.
- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Muller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M et al (2000).** The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol*, 35, 601-611.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V et al (2001).** Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414, 450-453.
- Keeling PJ (2003).** Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet Biol*, 38, 298-309.



- Keeling PJ, Fast NM (2002).** Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol*, 56, 93-116.
- Kentzer EJ, Buko A, Menon G, et Sarin VK (1990).** Carbohydrate composition and presence of a fucose-protein linkage in recombinant human pro-urokinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 171, 401-406.
- Keohane E, Weiss LM (1999).** The microsporidian polar tube. In *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Wittner M, et Weiss LM (eds). Washington D.C.: pp. 196-224.
- Keohane EM, Orr GA, Zhang HS, Takvorian PM, Cali A, Tanowitz HB, Wittner M et al (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 EM, Weiss LM (1998).** Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia Parasitol (Praha)*, 45, 117-127.
- Khan AH, Qazi AM, Hoessli DC, Torred-Duarte AP, Senaldi G, Qazi MH, Walker-Nasir E et al (1997).** Carbohydrate moiety of *Plasmodium falciparum* glycoproteins: the nature of the carbohydrate-peptide linkage in the MSP-2 glycoprotein. *Biochem Mol Biol Int*, 43, 655-668.
- Kieliszewski MJ, O'Neill M, Leykam J, et Orlando R (1995).** Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline O-arabinylation. *J Biol Chem*, 270, 2541-2549.
- Kim JH, Ogawa K, et Wakabayashi H (1999).** Lectin-reactive components of the microsporidian *Glugea plecoglossi* and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis Aquat Organ*, 39, 59-63.
- Kim K, Bulow R, Kampmeier J, et Boothroyd JC (1994).** Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma* antigen SAG1 (p30) in CHO cells. *Infect Immun*, 62, 203-209.
- Kimura EA, Couto AS, Peres VJ, Casal OL, et Katzin AM (1996).** N-linked glycoproteins are related to schizogony of the intraerythrocytic stage in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 271, 14452-14461.
- Klinger MM, Laine RA, et Steiner SM (1981).** Characterization of novel amino acid fucosides. *J Biol Chem*, 256, 7932-7935.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, et Brul S (2002).** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 26, 239-256.
- Kobayashi H, Komido M, Watanabe M, Matsuda K, Suzuki M, Ikeda T, Oyamada H et al (1994).** Structure of cell wall mannan of *Candida kefyr* IFO 0586. *Infect Immun*, 62, 4425-4431.
- Kocharova NA, Knirel YA, Widmalm G, Jansson PE, et Moran AP (2000).** Structure of an atypical O-antigen polysaccharide of *Helicobacter pylori* containing a novel monosaccharide 3-C-methyl-D-mannose. *Biochemistry*, 39, 4755-4760.
- Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonova J, Kapteyn JC et al (1997).** Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*, 272, 17762-17775.
- Kornberg A (1999).** Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Prog Mol Subcell Biol*, 23, 1-18.



- Koudela B, Kucerova S, et Hudcovic T (1999).** Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitol (Praha)*, 46, 171-174.
- Kremer JR, Mastronarde DN, et McIntosh JR (1996).** Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*, 116, 71-76.
- Krieg J, Hartmann S, Vicentini A, Glasner W, Hess D, et Hofsteenge J (1998).** Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. *Mol Biol Cell*, 9, 301-309.
- Krusius T, Finne J, Margolis RK, et Margolis RU (1986).** Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem*, 261, 8237-8242.
- Kucerova-Pospisilova Z, Secor WE, Moura H, Desportes-Livage I, Datry A, Bern C, Leitch G et al (2001).** An ELISA test to detect human serum antibodies reactive with *Encephalitozoon intestinalis*. *J Eukaryot Microbiol*, Suppl, 73S-74S.
- Ladinsky MS, Mastronarde DN, McIntosh JR, Howell KE, et Staehelin LA (1999).** Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol*, 144, 1135-1149.
- Lampert DT, Katona L, et Roerig S (1973).** Galactosylserine in extensin. *Biochem J*, 133, 125-132.
- Lane JE, Ribeiro-Rodrigues R, Olivares-Villagomez D, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, et Carter CE (2003).** Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA within murine cardiac tissue sections by *in situ* polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98, 373-376.
- Langer PR, Waldrop AA, et Ward DC (1981).** Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 6633-6637.
- Larabell CA, Le Gros MA (2004).** X-ray tomography generates 3-D reconstructions of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, at 60-nm resolution. *Mol Biol Cell*, 15, 957-962.
- Leiro J, Ortega M, Estevez J, Ubeira FM, et Sanmartin ML (1996).** The role of opsonization by antibody and complement in *in vitro* phagocytosis of microsporidian parasites by turbot spleen cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 51, 201-210.
- Li G, Yan Q, Nita-Lazar A, Haltiwanger RS, et Lennarz WJ (2005).** Studies on the N-glycosylation of the subunits of oligosaccharyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 280, 1864-1871.
- Lipke PN, Ovalle R (1998).** Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol*, 180, 3735-3740.
- Lloyd D, Harris JC (2002).** *Giardia*: highly evolved parasite or early branching eukaryote? *Trends Microbiol*, 10, 122-127.
- Lom J (1972).** On the structure of the extruded microsporidian polar filament. *Zeitung Parasitenkund*, 38, 200-213.
- Longacre S, Mendis KN, et David PH (1994).** *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus. *Mol Biochem Parasitol*, 64, 191-205.
- Lowe JB (2003).** Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 531-538.



- Lujan HD, Mowatt MR, et Nash TE (1997).** Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 294-304.
- Luo Y, Koles K, Vorndam W, Haltiwanger RS, et Panin VM (2006).** Protein O-fucosyltransferase 2 adds O-fucose to thrombospondin type 1 repeats. *J Biol Chem*, 281, 9393-9399.
- Lussier M, Sdicu AM, Bussereau F, Jacquet M, et Bussey H (1997).** The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *J Biol Chem*, 272, 15527-15531.
- Lussier M, Sdicu AM, et Bussey H (1999).** The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1426, 323-334.
- Magno RC, Straker LC, de Souza W, et Attias M (2005).** Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc Microanal*, 11, 166-174.
- Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, et Frank J (1994).** The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech*, 27, 278-283.
- Martinez-Duncker I, Michalski JC, Bauvy C, Candelier JJ, Mennesson B, Codogno P, Oriol R et al (2004).** Activity and tissue distribution of splice variants of alpha6-fucosyltransferase in human embryogenesis. *Glycobiology*, 14, 13-25.
- Martone ME, Zhang Y, Simpliciano VM, Carragher BO, et Ellisman MH (1993).** Three-dimensional visualization of the smooth endoplasmic reticulum in Purkinje cell dendrites. *J Neurosci*, 13, 4636-4646.
- Masterson WJ, Doering TL, Hart GW, et Englund PT (1989).** A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. *Cell*, 56, 793-800.
- Mathis A, Michel M, Kuster H, Muller C, Weber R, et Deplazes P (1997).** Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology*, 114 ( Pt 1), 29-35.
- Matsubayashi H, Koike T, Mikata T, et Hagiwara S (1959).** A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Arch Pathol*, 67, 181-187.
- McConville MJ, Blackwell JM (1991).** Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem*, 266, 15170-15179.
- McConville MJ, Ferguson MA (1993).** The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J*, 294 ( Pt 2), 305-324.
- McCulloch R (2004).** Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends Parasitol*, 20, 117-121.
- Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastro D, Gerisch G, et Baumeister W (2002).** Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*, 298, 1209-1213.
- Mehlert A, Zitzmann N, Richardson JM, Treumann A, et Ferguson MA (1998).** The glycosylation of the variant surface glycoproteins and procyclic acidic repetitive proteins of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 91, 145-152.



- Mehta DP, Ichikawa M, Salimath PV, Etchison JR, Haak R, Manzi A, et Freeze HH (1996).** A lysosomal cysteine proteinase from *Dictyostelium discoideum* contains N-acetylglucosamine-1-phosphate bound to serine but not mannose-6-phosphate on N-linked oligosaccharides. *J Biol Chem*, 271, 10897-10903.
- Melo EJ, Attias M, et de Souza W (2000).** The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol*, 130, 27-33.
- Merello S, Parodi AJ, et Couso R (1995).** Characterization and partial purification of a novel enzymatic activity. UDP-GlcNAc:Ser-protein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*, 270, 7281-7287.
- Méténier G, Vivarès CP (2001).** Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes Infect*, 3, 407-415.
- Méténier G, Vivarès CP (2004).** Genomics of microbial parasites: the microsporidial paradigm. In *Organelles, genomes and eukaryote phylogeny. An evolutionary synthesis in the age of genomics.* Hirt RP, et Horner DS (eds). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 207-236.
- Miao YM, Awad-El-Kariem FM, Franzen C, Ellis DS, Muller A, Counihan HM, Hayes PJ et al (2000).** Eradication of cryptosporidia and microsporidia following successful antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 25, 124-129.
- Mohn SF, Nordstoga K, et Moller OM (1982).** Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Transplacental transmission of the parasite. *Acta Vet Scand*, 23, 211-220.
- Molina, J.M., Goguel, J., Sarfati, C., Chastang, C., Desportes-Livage, I., Michiels, J.F. et al. (1997)** Potential efficacy of fumagillin in intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with HIV infection: results of a drug screening study. The French Microsporidiosis Study Group. *AIDS* 11(13), 1603-1610
- Molina JM, Oksenhendler E, Beauvais B, Sarfati C, Jaccard A, Derouin F, et Modai J (1995).** Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *J Infect Dis*, 171, 245-249.
- Moloney DJ, Haltiwanger RS (1999).** The O-linked fucose glycosylation pathway: identification and characterization of a uridine diphosphoglucose: fucose-beta1,3-glycosyltransferase activity from Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology*, 9, 679-687.
- Moloney DJ, Shair LH, Lu FM, Xia J, Locke R, Matta KL, et Haltiwanger RS (2000).** Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem*, 275, 9604-9611.
- Monteiro VG, Soares CP, et de Souza W (1998).** Host cell surface sialic acid residues are involved on the process of penetration of *Toxoplasma gondii* into mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett*, 164, 323-327.
- Morel G, Cavalier A (2001).** Hybridation *in situ* en microscopie électronique. Morel G (ed). Paris: TEC & DOC, pp. 1-456.
- Morel G, Dihl F, et Gossard F (1989).** Ultrastructural distribution of growth hormone (GH) mRNA and GH intron I sequences in rat pituitary gland: effects of GH releasing factor and somatostatin. *Mol Cell Endocrinol*, 65, 81-90.
- Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, et Ashwell G (1971).** The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem*, 246, 1461-1467.



- Morelle W, Jimenez JC, Cieniewski-Bernard C, Dei-Cas E, et Michalski JC (2005).** Characterization of the N-linked glycans of *Giardia intestinalis*. *Glycobiology*, 15, 549-559.
- Mreyen M, Champion A, Srinivasan S, Karuso P, Williams KL, et Packer NH (2000).** Multiple O-glycoforms on the spore coat protein SP96 in *Dictyostelium discoideum*. Fuc(alpha1-3)GlcNAc-alpha-1-P-Ser is the major modification. *J Biol Chem*, 275, 12164-12174.
- Munro CA, Bates S, Buurman ET, Hughes HB, MacCallum DM, Bertram G, Atrih A et al (2005).** Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem*, 280, 1051-1060.
- Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA et al (2000).** Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med*, 192, 1563-1576.
- Nakakura N, Hietter H, Van Dorsselaer A, et Luu B (1992).** Isolation and structural determination of three peptides from the insect *Locusta migratoria*. Identification of a deoxyhexose-linked peptide. *Eur J Biochem*, 204, 147-153.
- Nakano A (2004).** Yeast Golgi apparatus--dynamics and sorting. *Cell Mol Life Sci*, 61, 186-191.
- Nash T (1992).** Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today*, 8, 229-234.
- Nasir ud Din, Drager-Dayal R, Decrind C, Hu BH, Del Giudice G, et Hoessli D (1992).** *Plasmodium falciparum* synthesizes O-glycosylated glycoproteins containing O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem Int*, 27, 55-64.
- O'Toole ET, Giddings TH, McIntosh JR, et Dutcher SK (2003).** Three-dimensional organization of basal bodies from wild-type and delta-tubulin deletion strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Biol Cell*, 14, 2999-3012.
- Odenthal-Schnittler M, Tomavo S, Becker D, Dubremetz JF, et Schwarz RT (1993).** Evidence for N-linked glycosylation in *Toxoplasma gondii*. *Biochem J*, 291 ( Pt 3), 713-721.
- Olafson RW, Thomas JR, Ferguson MA, Dwek RA, Chaudhuri M, Chang KP, et Rademacher TW (1990).** Structures of the N-linked oligosaccharides of Gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. *J Biol Chem*, 265, 12240-12247.
- Oriol R, Mollicone R, Cailleau A, Balanzino L, et Breton C (1999).** Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria. *Glycobiology*, 9, 323-334.
- Orlandi PA, Turco SJ (1987).** Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem*, 262, 10384-10391.
- Orlean P (1990).** Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 10, 5796-5805.
- Orlean P, Albright C, et Robbins PW (1988).** Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein. *J Biol Chem*, 263, 17499-17507.
- Osumi M (1998).** The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, 29, 207-233.



- Ouarzane-Amara M, Franetich JF, Mazier D, Pettit GR, Meijer L, Doerig C, et Desportes-Livage I (2001).** In vitro activities of two antimitotic compounds, pancratistatin and 7-deoxynarciclasine, against *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidium causing infections in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 3409-3415.
- Pakes SP, Shaddock JA, et Cali A (1975).** Fine structure of *Encephalitozoon cuniculi* from rabbits, mice and hamsters. *J Protozool*, 22, 481-488.
- Pancake SJ, Holt GD, Mellouk S, et Hoffman SL (1992).** Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *J Cell Biol*, 117, 1351-1357.
- Papanastasiou P, McConville MJ, Ralton J, et Kohler P (1997).** The variant-specific surface protein of *Giardia*, VSP4A1, is a glycosylated and palmitoylated protein. *Biochem J*, 322 ( Pt 1), 49-56.
- Pardue ML, Gall JG (1969).** Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64, 600-604.
- Parodi AJ (2000).** Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem*, 69, 69-93.
- Pays E, Vanhamme L, et Perez-Morga D (2004).** Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr Opin Microbiol*, 7, 369-374.
- Peek R, Delbac F, Speijer D, Polonais V, Greve S, Wentink-Bonnema E, Ringrose J et al (2005).** Carbohydrate moieties of microsporidian polar tube proteins are targeted by immunoglobulin G in immunocompetent individuals. *Infect Immun*, 73, 7906-7913.
- Pereira-Chioccola VL, Acosta-Serrano A, Correia dA, I, Ferguson MA, Souto-Padron T, Rodrigues MM, Travassos LR et al (2000).** Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 7), 1299-1307.
- Peters C, Stierhof YD, et Ilg T (1997).** Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infect Immun*, 65, 783-786.
- Peuvel I, Peyret P, Méténier G, Vivarès CP, et Delbac F (2002).** The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Biochem Parasitol*, 122, 69-80.
- Peuvel-Fanget I, Polonais V, Brosson D, Texier C, Kuhn L, Peyret P, Vivares C et al (2005).** EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. *Int J Parasitol*.
- Peyretailade E, Broussolle V, Peyret P, Metenier G, Gouy M, et Vivares CP (1998).** Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol Biol Evol*, 15, 683-689.
- Pickel VM, Joh TH, et Reis DJ (1975).** Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in noradrenergic neurons of brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 659-663.
- Pleshinger J, Weidner E (1985).** The microsporidian spore invasion tube. IV. Discharge activation begins with pH-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *J Cell Biol*, 100, 1834-1838.
- Polonais V, Prensier G, Méténier G, Vivarès CP, et 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 Genet Biol*, 42, 791-803.



- Prensier G, Slomianny C (1986).** The karyotype of *Plasmodium falciparum* determined by ultrastructural serial sectioning and 3D reconstruction. *J Parasitol*, 72, 731-736.
- Previato JO, Gorin PA, Mazurek M, Xavier MT, Fournet B, Wieruszkes JM, et Mendonca-Previato L (1990).** Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 265, 2518-2526.
- Prill SK, Klinkert B, Timpel C, Gale CA, Schroppel K, et Ernst JF (2005).** PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol*, 55, 546-560.
- Rademacher TW, Parekh RB, et Dwek RA (1988).** Glycobiology. *Annu Rev Biochem*, 57, 785-838.
- Richard M, De Groot P, Courtin O, Poulain D, Klis F, et Gaillardin C (2002).** GPI7 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Microbiology*, 148, 2125-2133.
- Riley GR, West CM, et Henderson EJ (1993).** Cell differentiation in *Dictyostelium discoideum* controls assembly of protein-linked glycans. *Glycobiology*, 3, 165-177.
- Robbins PW, Samuelson J (2005).** Asparagine linked glycosylation in *Giardia*. *Glycobiology*, 15, 15G-16G.
- Romero PA, Lussier M, Veronneau S, Sdicu AM, Herscovics A, et Bussey H (1999).** Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha-1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology*, 9, 1045-1051.
- Rudkin GT, Stollar BD (1977).** High resolution detection of DNA-RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. *Nature*, 265, 472-473.
- Ruoslahti E (1988).** Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*, 4, 229-255.
- Samuelson J, Banerjee S, Magnelli P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, et Robbins PW (2005).** The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1548-1553.
- Sanders SL, Gentzsch M, Tanner W, et Herskowitz I (1999).** O-Glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p is required for its stability, localization, and function in daughter cells. *J Cell Biol*, 145, 1177-1188.
- Sasaki T, Yamada H, Matsumura K, Shimizu T, Kobata A, et Endo T (1998).** Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle alpha-dystroglycan. *Biochim Biophys Acta*, 1425, 599-606.
- Scanlon M, Leitch GJ, Visvesvara GS, et Shaw AP (2004).** Relationship between the host cell mitochondria and the parasitophorous vacuole in cells infected with *Encephalitozoon microsporidia*. *J Eukaryot Microbiol*, 51, 81-87.
- Schachter H (1986).** Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol*, 205, 53-85.
- Schatten H, Ris H (2004).** Three-dimensional imaging of *Toxoplasma gondii*-host cell interactions within the parasitophorous vacuole. *Microsc Microanal*, 10, 580-585.
- Schauer R, Wember M, et Howard RJ (1984).** Malaria parasites do not contain or synthesize sialic acids. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 365, 185-194.



- Schenkman RP, Vandekerckhove F, et Schenkman S (1993).** Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 61, 898-902.
- Schenkman S, Eichinger D (1993).** *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol Today*, 9, 218-222.
- Schmidt MA, Riley LW, et Benz I (2003).** Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends Microbiol*, 11, 554-561.
- Schofield L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, et Tachado SD (1996).** Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol*, 156, 1886-1896.
- Sekine Y, Okada Y, Noda Y, Kondo S, Aizawa H, Takemura R, et Hirokawa N (1994).** A novel microtubule-based motor protein (KIF4) for organelle transports, whose expression is regulated developmentally. *J Cell Biol*, 127, 187-201.
- Sentandreu R, Northcote DH (1969).** Yeast cell-wall synthesis. *Biochem J*, 115, 231-240.
- Shadduck JA (1969).** *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. *Science*, 166, 516-517.
- Shibata S, Takeda T, et Natori Y (1988).** The structure of nephritogenoside. A nephritogenic glycopeptide with alpha-N-glycosidic linkage. *J Biol Chem*, 263, 12483-12485.
- Shibuya N, Goldstein IJ, Van Damme EJ, et Peumans WJ (1988).** Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J Biol Chem*, 263, 728-734.
- Silberstein S, Gilmore R (1996).** Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J*, 10, 849-858.
- Slamovits CH, Williams BA, et Keeling PJ (2004).** Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonospora locustae* n. comb. based on molecular and ultrastructural data. *J Eukaryot Microbiol*, 51, 207-213.
- Slomianny C (1990).** Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. *Blood Cells*, 16, 369-378.
- Slomianny C, Prensier G (1986).** Application of the serial sectioning and tridimensional reconstruction techniques to the morphological study of the *Plasmodium falciparum* mitochondrion. *J Parasitol*, 72, 595-598.
- Slomianny C, Prensier G (1990).** A cytochemical ultrastructural study of the lysosomal system of different species of malaria parasites. *J Protozool*, 37, 465-470.
- Slomianny C, Prensier G, et Charet P (1985).** [Comparative ultrastructural study of the process of hemoglobin degradation by *P. berghei* (Vincke and Lips, 1948) as a function of the state of maturity of the host cell]. *J Protozool*, 32, 1-5.
- Smythe C, Caudwell FB, Ferguson M, et Cohen P (1988a).** Isolation and structural analysis of a peptide containing the novel tyrosyl-glucose linkage in glycogenin. *EMBO J*, 7, 2681-2686.
- Smythe JA, Coppel RL, Brown GV, Ramasamy R, Kemp DJ, et Anders RF (1988b).** Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 5195-5199.



- Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, et Peattie DA (1989).** Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*, 243, 75-77.
- Sokolova J, Lange C (2002).** An ultrastructural study of *Nosema locustae* Canning (Microsporidia) from three species from Acrididae (Orthoptera). *Acta Protozool*, 41, 229-237.
- Sokolova Y, Snigirevskaya E, Morzhina E, Skarlato S, Mironov A, et Komissarchik Y (2001).** Visualization of early golgi compartments at proliferate and sporogenic stages of a microsporidian *Nosema grylli*. *J Eukaryot Microbiol*, Suppl, 86S-87S.
- Spiro RG, Bhojroo VD (1980).** Studies on the carbohydrate of collagens. Characterization of a glucuronic acid-mannose disaccharide unit from *Nereis* cuticle collagen. *J Biol Chem*, 255, 5347-5354.
- Sprague V (1977).** Systematics of the Microsporidia. L.A.Bulla J, et T.C.Cheng (eds). New York: Plenum Press, pp. 1-510.
- Sprague V, Vernick S.H. (1969).** Light and electron microscope observations on *Nosema nelsoni* Sprague, 1950 (Microsporidia Nosematidae) with particular reference to its Golgi complex. *J Protozool*, 16, 264-271.
- Sprague V, Vernick SH (1971).** The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia, Nosematidae) and its taxonomic significance. *J Protozool*, 18, 560-569.
- Srikrishna G, Wang L, et Freeze HH (1998).** Fucose beta-1-P-Ser is a new type of glycosylation: using antibodies to identify a novel structure in *Dictyostelium discoideum* and study multiple types of fucosylation during growth and development. *Glycobiology*, 8, 799-811.
- Sternberger L (1979).** Immunocytochemistry New York: 2<sup>nd</sup> Ed John Wiley and Sons.
- Strahl-Bolsinger S, Gentsch M, et Tanner W (1999).** Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1426, 297-307.
- Strahl-Bolsinger S, Immervoll T, Deutzmann R, et Tanner W (1993).** PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8164-8168.
- Striepen B, Zinecker CF, Damm JB, Melgers PA, Gerwig GJ, Koolen M, Vliegenthart JF et al (1997).** Molecular structure of the "low molecular weight antigen" of *Toxoplasma gondii*: a glucose alpha 1-4 N-acetylgalactosamine makes free glycosyl-phosphatidylinositols highly immunogenic. *J Mol Biol*, 266, 797-813.
- Stubbs J, Simpson KM, Triglia T, Plouffe D, Tonkin CJ, Duraisingh MT, Maier AG et al (2005).** Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science*, 309, 1384-1387.
- Stults NL, Cummings RD (1993).** O-linked fucose in glycoproteins from Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology*, 3, 589-596.
- Stwora-Wojczyk MM, Kissinger JC, Spitalnik SL, et Wojczyk BS (2004).** O-glycosylation in *Toxoplasma gondii*: identification and analysis of a family of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Int J Parasitol*, 34, 309-322.
- Svard SG, Meng TC, Hetsko ML, McCaffery JM, et Gillin FD (1998).** Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*, 30, 979-989.



- Takvorian PM, Cali A (1994).** Enzyme histochemical identification of the Golgi apparatus in the microsporidian, *Glugea stephani*. *J Eukaryot Microbiol*, 41, 63S-64S.
- Takvorian PM, Cali A (1996).** Polar tube formation and nucleoside diphosphatase activity in the microsporidian, *Glugea stephani*. *J Eukaryot Microbiol*, 43, 102S-103S.
- Takvorian PM, Weiss LM, et Cali A (2005).** The early events of *Brachiola algerae* (Microsporidia) infection: spore germination, sporoplasm structure, and development within host cells. *Folia Parasitol (Praha)*, 52, 118-129.
- Taupin V, Metenier G, Delbac F, Vivares CP, et Prensier G (2006).** Expression of two cell wall proteins during the intracellular development of *Encephalitozoon cuniculi* : an immunocytochemical and in situ hybridization study with ultrathin frozen sections. *Parasitology*, 1-11.
- Texier C, Brosson D, El Alaoui H, Metenier G, et Vivares CP (2005).** Post-genomics of microsporidia, with emphasis on a model of minimal eukaryotic proteome: a review. *Folia Parasitol (Praha)*, 52, 15-22.
- Thiéry JP (1967).** Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microscopie*, 6, 987-1018.
- Thomarat F, Vivarès CP, et 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, 780-791.
- Thompson J, Sinden RE (1994).** In situ detection of Pbs21 mRNA during sexual development of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol*, 68, 189-196.
- Toh-e A, Oguchi T (2002).** Genetic characterization of genes encoding enzymes catalyzing addition of phospho-ethanolamine to the glycosylphosphatidylinositol anchor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst*, 77, 309-322.
- Tomanek M, Pisselet C, Monget P, Madigou T, Thieulant ML, et Monniaux D (1997).** Estrogen receptor protein and mRNA expression in the ovary of sheep. *Mol Reprod Dev*, 48, 53-62.
- Tomavo S, Schwarz RT, et Dubremetz JF (1989).** Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol Cell Biol*, 9, 4576-4580.
- Tonetti M, Sturla L, Bisso A, Benatti U, et De Flora A (1996).** Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. *J Biol Chem*, 271, 27274-27279.
- Torres CR, Hart GW (1984).** Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*, 259, 3308-3317.
- Treumann A, Zitzmann N, Hulsmeier A, Prescott AR, Almond A, Sheehan J, et Ferguson MA (1997).** Structural characterisation of two forms of procyclic acidic repetitive protein expressed by procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol*, 269, 529-547.
- Trimble RB, Lubowski C, Hauer CR, III, Stack R, McNaughton L, Gemmill TR, et Kumar SA (2004).** Characterization of N- and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology*, 14, 265-274.
- Turco SJ, Descoteaux A (1992).** The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, 46, 65-94.



- Udenfriend S, Kodukula K (1995).** How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem*, 64, 563-591.
- Ueno M, Yamada S, Zako M, Bernfield M, et Sugahara K (2001).** Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence. *J Biol Chem*, 276, 29134-29140.
- Undeen AH, Vander Meer RK (1999).** Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *J Invertebr Pathol*, 73, 294-302.
- van de Peer Y, Ben Ali A, et Meyer A (2000).** Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene*, 246, 1-8.
- van Der Wel H, Morris HR, Panico M, Paxton T, North SJ, Dell A, Thomson JM et al (2001).** A non-Golgi alpha 1,2-fucosyltransferase that modifies Skp1 in the cytoplasm of *Dictyostelium*. *J Biol Chem*, 276, 33952-33963.
- van Gool T, Snijders F, Reiss P, Eeftinck Schattenkerk JK, van den Bergh Weerman MA, Bartelsman JF, Bruins JJ et al (1993).** Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J Clin Pathol*, 46, 694-699.
- van Gool T, Vetter JC, Weinmayr B, Van Dam A, Derouin F, et Dankert J (1997).** High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *J Infect Dis*, 175, 1020-1024.
- Vavra J (1972).** Detection of polysaccharides in microsporidian spores by means of the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate test. *J Microscopie*, 14, 357-360.
- Vavra J (1976).** Biology of the microsporidia. In *Comparative Pathobiology*. Bulla LA, et Cheng TC (eds). New York: Plenum Press, p. 371.
- Vavra J, Larson J (1999).** Structure of the microsporidia. In *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Wittner M, et Weiss LM (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 7-84.
- Vavra J, Vinckier D., Torpier G., Porchet E., et Vivier E. (1986).** A freeze-fracture study of microsporidia (Protozoa: Microspora) I. The sporophorous vesicle, the spore wall, the spore plasma membrane. *Protistologica*, 22, 143-154.
- Vervenne RA, Dirks RW, Ramesar J, Waters AP, et Janse CJ (1994).** Differential expression in blood stages of the gene coding for the 21-kilodalton surface protein of ookinetes of *Plasmodium berghei* as detected by RNA *in situ* hybridisation. *Mol Biochem Parasitol*, 68, 259-266.
- Villarejo A, Buren S, Larsson S, De Jardin A, Monne M, Rudhe C, Karlsson J et al (2005).** Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol*, 7, 1224-1231.
- Vinckier D (1975).** *Nosemoides* gen. n., *N. vivieri* (Vinckier, Dechauville et Prensier, 1970), comb. nov. (Microsporidia), étude de la différenciation sporoblastique et génèse des différentes structures de la spore. *J Protozool*, 22, 170-184.
- Vivarens CP (2001).** Introduction: the microsporidial world, a paragon for analyzing intracellular parasitism. *Microbes Infect*, 3, 371-372.



- Vivarens CP, Loubes C, et Bouix G (1976).** Recherches cytochimiques approfondies sur les microsporidies parasites du Crabe vert de la Méditerranée, *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884. *Ann Parasitol Hum Comp*, 51, 1-14.
- Vivarens CP, Méténier G (2004).** The microsporidia genome: living with minimal genes as an intracellular eukaryote. In *Opportunistic infections: Toxoplasma, Sarcocystis and Microsporidia. World Class Parasites*. Lindsay DS, et Weiss LM (eds). Kluwer Academic Pub., Boston, pp. 215-242.
- Vossbrinck CR, Andreadis TG, Vavra J, et Becnel JJ (2004).** Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic Microsporidia (Microsporidia: Amblyosporidae). *J Eukaryot Microbiol*, 51, 88-95.
- Vossbrinck CR, Maddox JV, Friedman S, Debrunner-Vossbrinck BA, et Woese CR (1987).** Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, 326, 411-414.
- Vossbrinck CR, Woese CR (1986).** Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature*, 320, 287-288.
- Wang Y, Lee GF, Kelley RF, et Spellman MW (1996).** Identification of a GDP-L-fucose:polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains. *Glycobiology*, 6, 837-842.
- Weidner E, Byrd W., Scarborough A., Pleshinger J., et Sibley D. (1984).** Microsporidian spore discharge and the transfert of polaroplast organelle membrane into plasma membrane. *J Protozool*, 31, 195-198.
- Weidner E, Findley A (2002).** Peroxisomal catalase in extrusion apparatus posterior vacuole of microsporidian spores. *Biol Bull*, 203, 212.
- Weidner E, Findley A (2003).** Catalase in microsporidian spores before and during discharge. *Biol Bull*, 205, 236-237.
- Weiss LM (2001).** Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop*, 78, 89-102.
- Weiss LM, Zhu X, Cali A, Tanowitz HB, et Wittner M (1994).** Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitol (Praha)*, 41, 81-90.
- West CM, Erdos GW (1988).** The expression of glycoproteins in the extracellular matrix of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Cell Differ*, 23, 1-16.
- Wieland F, Heitzer R, et Schaefer W (1983).** Asparaginyglucose: Novel type of carbohydrate linkage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 5470-5474.
- Wiese TJ, Dunlap JA, et Yorek MA (1994).** L-fucose is accumulated via a specific transport system in eukaryotic cells. *J Biol Chem*, 269, 22705-22711.
- Willer T, Brandl M, Sipiczki M, et Strahl S (2005).** Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol*, 57, 156-170.
- Willer T, Valero MC, Tanner W, Cruces J, et Strahl S (2003).** O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol*, 13, 621-630.
- Williams BA, Hirt RP, Lucoq JM, et Embley TM (2002).** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*, 418, 865-869.



- Wilson IB, Gavel Y, et von Heijne G (1991).** Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites. *Biochem J*, 275 ( Pt 2), 529-534.
- Xu Y, Takvorian P, Cali A, Wang F, Zhang H, Orr G, et Weiss LM (2006).** Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun*, 74, 239-247.
- Xu Y, Takvorian PM, Cali A, Orr G, et Weiss LM (2004).** Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infect Immun*, 72, 6341-6350.
- Xu Y, Weiss LM (2005).** The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *Int J Parasitol*, 35, 941-953.
- Yang S, Nikodem D, Davidson EA, et Gowda DC (1999).** Glycosylation and proteolytic processing of 70 kDa C-terminal recombinant polypeptides of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 expressed in mammalian cells. *Glycobiology*, 9, 1347-1356.
- Zamze SE, Ashford DA, Wooten EW, Rademacher TW, et Dwek RA (1991).** Structural characterization of the asparagine-linked oligosaccharides from *Trypanosoma brucei* type II and type III variant surface glycoproteins. *J Biol Chem*, 266, 20244-20261.
- Zanetta JP, Timmerman P, et Leroy Y (1999).** Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology*, 9, 255-266.
- Zinecker CF, Striepen B, Tomavo S, Dubremetz JF, et Schwarz RT (1998).** The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. *Mol Biochem Parasitol*, 97, 241-246.









# Résumé

Affiliées aux champignons, les microsporidies forment un grand groupe de parasites intracellulaires obligatoires, dont certaines espèces sont des pathogènes opportunistes en émergence. Leur cycle biologique comprend toujours trois phases (invasion, mérogonie et sporogonie) et la spore microsporidienne constitue à la fois la forme de résistance dans l'environnement et le support de la transmission de l'infection d'un hôte à l'autre.

L'application d'une technique de reconstruction tridimensionnelle, à l'aide de coupes sériées, a permis de visualiser différents stades cellulaires dans leur globalité et de repérer des événements cytologiques majeurs de la sporogonie, chez *Encephalitozoon cuniculi*, une microsporidie-modèle parasitant divers mammifères.

Dans le cadre de l'analyse post-génomique de *E. cuniculi*, la détection des transcrits de gènes codant deux protéines de paroi (SWP1 et EnP1), au moyen de l'hybridation *in situ* sur coupes à congélation, a été couplée à l'immunolocalisation des protéines correspondantes et a révélé leur expression différentielle pendant le développement intracellulaire.

La méconnaissance actuelle des modifications post-traductionnelles et leur implication potentielle dans le mécanisme d'invasion des cellules-hôtes, ont fait entreprendre une étude sur la glycosylation des protéines chez deux microsporidies phylogénétiquement distantes : *E. cuniculi* et *Antonospora locustae*. Les deux conclusions majeures ressortant de cette étude sont l'absence de N-glycosylation et l'existence d'une voie de O-mannosylation. Ressemblant à celles de certains champignons, les chaînes O-glycaniques sont linéaires et contiennent, au maximum, huit résidus mannose liés en  $\alpha$ 1,2. Les mannoprotéines sont préférentiellement localisées dans le capuchon polaire, un élément essentiel de l'appareil invasif. La présence de protéines fucosylées dans la paroi sporale est indiquée par la réactivité avec une lectine affine au fucose.

La mise au point d'un protocole de séparation des stades sporogoniques d'*E. cuniculi*, basé sur la centrifugation en gradient de densité, offre des perspectives d'analyses comparatives utiles à la compréhension des événements moléculaires de la différenciation sporale.

## Mots-clés:

Microsporidies, parasites intracellulaires

Sporogonie, O-mannosylation, fucose

Hybridation *in situ*, analyse tridimensionnelle