



HAL
open science

Identification de protéines parasitaires et de glycanes exogènes impliqués dans l'infection des microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* et *Anncaliia algerae*

Nastasia Prybylski

► **To cite this version:**

Nastasia Prybylski. Identification de protéines parasitaires et de glycanes exogènes impliqués dans l'infection des microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* et *Anncaliia algerae*. Microbiologie et Parasitologie. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC057 . tel-03621931

HAL Id: tel-03621931

<https://theses.hal.science/tel-03621931v1>

Submitted on 28 Mar 2022

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

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

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

École doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement

THESE DE DOCTORAT

Présentée à l'Université Clermont Auvergne par

Nastasia PRYBYLSKI

En vue de l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : **Microbiologie – Parasitologie**

Soutenue publiquement le 28 octobre 2021

Identification de protéines parasitaires et de glycanes exogènes impliqués dans l'infection des microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* et *Anncaliia algerae*

Directeurs de thèse :

Dr Hicham EL ALAOUI (Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS
6023, Université Clermont Auvergne),

Dr Pascal DUBESSAY (Institut Pascal, UMR CNRS 6602, Université Clermont Auvergne)

JURY

Rapporteurs

Pr Isabelle FLORENT PU, Muséum national d'Histoire naturelle

Pr Laurence LACHAUD PU-PH, Centre Hospitalier Universitaire Montpellier

Dr Eric Viscogliosi DR CNRS, Institut Pasteur de Lille

Examinatrice

Dr Mathilde Bonnet

MCU, Université Clermont-Auvergne

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement - UMR CNRS 6023 – Université Clermont
Auvergne

Institut Pascal – UMR CNRS 6602 – Université Clermont Auvergne

Résumé

Les microsporidies sont des parasites eucaryotes unicellulaires apparentés aux champignons et responsables de parasitoses chez de nombreux organismes hôtes, dont l'Homme. Les microsporidies utilisent différentes stratégies d'adhésion et d'invasion des cellules hôtes, parmi lesquelles l'extrusion d'un tube polaire harponnant et véhiculant la forme infectieuse à l'intérieur des cellules hôtes. À ce jour, seules quelques protéines ont été identifiées comme impliquées dans l'adhésion, mais leur neutralisation par des essais d'inhibition ne suffit pas à éliminer complètement l'infection, suggérant l'implication d'autres acteurs moléculaires. Dans cette étude, nous avons combiné des approches de surfomics et *in silico* dans le but d'une part d'identifier de nouveaux candidats protéiques potentiellement impliqués dans les processus d'infection de deux microsporidies (*Encephalitozoon cuniculi* et *Anncaliia algerae*), et d'autre part de déterminer leur rôle dans l'infection par des tests fonctionnels d'inhibition. Ces approches ont permis d'identifier les protéines de type Ricin-B-like, *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*, présentant une localisation au niveau de la paroi et/ou du tube polaire de la spore. Les tests fonctionnels d'inhibition, basés sur l'utilisation des protéines recombinantes et d'anticorps associés aux 3 protéines, ont révélé une diminution significative de la prolifération d'*E. cuniculi* et d'*A. algerae*, suggérant leurs rôles dans le processus d'adhésion/infection. En parallèle, l'étude d'autres protéines *EcSWP7*, *EcSWP9*, *EcSWP12* et *EcSWP26*, identifiées à l'appui des données de la littérature et complétées par une analyse *in silico*, a conduit à mettre en évidence une localisation pariétale de la spore et du tube polaire chez *E. cuniculi*. Enfin, l'approche surfomics par l'intermédiaire d'un décapage de la paroi des spores au SDS chaud a permis la sélection, chez *A. algerae*, de 6 protéines candidates (*AaRBLL-1*, *AaP6BE05*, *AaP13YM*, *AaP696T*, *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP03248*) pour évaluer leur rôle dans l'infection.

L'effet anti-microsporidien d'un polysaccharide issu de la microalgue rouge *Porphyridium marinum* (PM) a également été exploré dans le but de comprendre les mécanismes d'actions impliqués. Il semblerait que ce composé puisse agir à la surface des cellules hôtes et ainsi bloquer l'adhésion des spores aux cellules. En parallèle, un criblage de nouveaux polysaccharides a été réalisé pour rechercher de nouvelles molécules anti-microsporidiennes qui pourraient agir en combinaison avec le polysaccharide PM, notamment pour traiter *Nosema ceranae*, responsable de la nosérose des abeilles. Trois polysaccharides ont permis de diminuer de manière significative la charge parasitaire des abeilles infectées.

Mots clés : Microsporidies, *Encephalitozoon cuniculi*, *Anncaliia algerae*, invasion, Ricin-B lectin, adhésion, protéines de surface, motifs de liaisons aux carbohydrates, polysaccharides, *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*

Abstract

Microsporidia are unicellular eukaryotic parasites related to fungi and responsible for parasitosis in many host organisms including humans. Microsporidia use different strategies to adhere to and invade host cells, among which the extrusion of a polar tube harpooning and carrying the infectious form inside the host cells. To date, only a few proteins have been identified as involved in adhesion, but their neutralization by inhibition assays is not sufficient to completely eliminate infection, suggesting the involvement of other molecular actors. In this study, we combined surfomics and *in silico* approaches in order to identify new protein candidates potentially involved in the infection processes of two microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi* and *Anncaliia algerae*), and to determine their role in infection by functional inhibition assays. These approaches allowed the identification of Ricin-B-like proteins, *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* and *AaRBLL-2*, which are localized at the spore wall and/or at the polar tube of the spore. Functional inhibition assays, based on the use of recombinant proteins and antibodies associated with the 3 proteins, revealed a significant decrease in the proliferation of *E. cuniculi* and *A. algerae*, suggesting their roles in the adhesion/infection process. In parallel, the study of other proteins *EcSWP7*, *EcSWP9*, *EcSWP12* and *EcSWP26*, identified in support of literature data and complemented by *in silico* analysis, led to demonstrate a parietal localization of the spore and the polar tube in *E. cuniculi*. Finally, the surfomics approach by SDS extraction of the spore wall proteins allowed the selection of 6 candidate proteins (*AaRBLL-1*, *AaP6BE05*, *AaP13YM*, *AaP696T*, *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP03248*) in *A. algerae* to evaluate their role in infection.

The anti-microsporidian effect of a polysaccharide from the red microalga *Porphyridium marinum* (PM) was also explored in order to understand the mechanisms of action involved. It seems that this compound can act on the surface of host cells and thus block the adhesion of spores to cells. In parallel, a screening of new polysaccharides was carried out to search for new anti-microsporidian molecules that could act in combination with the PM polysaccharide, in particular to treat *Nosema ceranae*, responsible for the nosemosis of bees. Three polysaccharides were able to significantly reduce the parasite load of infected bees.

Keywords : Microsporidia, *Encephalitozoon cuniculi*, *Anncaliia algerae*, invasion, Ricin-B lectin, adherence, surface proteins, carbohydrate-binding motifs, polysaccharides, *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*

À mes parents, pour votre soutien inconditionnel
À Martial, pour tout l'amour que tu m'apportes
À Elyo, pour m'avoir donné le plus beau rôle du monde

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier, Mesdames, Pr Isabelle Florent, Pr Laurence Lachaud, Dr Mathilde Bonnet, ainsi que Dr Éric Viscogliosi pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Merci également à Dr Michel Hebraud et Dr Ayhan Kocer de m'avoir suivi et conseillé lors des comités de thèses.

Mes remerciements les plus sincères et chaleureux reviennent naturellement à Hicham El Alaoui et Pascal Dubessay, mes directeurs de thèse. Tout d'abord merci de m'avoir fait confiance en me donnant la possibilité de faire cette thèse. Durant ces quatre années, vous vous êtes rendus disponibles pour répondre à mes questions et pour me guider. Votre bonne humeur et surtout vos encouragements ont contribué à l'aboutissement de ce projet. Merci.

Je remercie également Frédéric Delbac, responsable de l'équipe Interactions Hôtes-Parasites (IHP) pour m'avoir fait confiance et avoir accepté de m'intégrer dans l'équipe qu'il dirige. Merci également d'avoir toujours été disponible pour discuter et répondre à mes questions, merci pour tes conseils.

Je souhaite également remercier, Philippe Michaud, pour m'avoir accueilli au sein de l'axe GePEB et de m'avoir permis d'effectuer mes travaux.

Je tiens à remercier Cédric Delattre et Guillaume Pierre pour vos conseils et votre aide, mais aussi et surtout pour nos conversations sur tout et n'importe quoi. Merci pour votre bonne humeur et vos blagues qui m'ont bien fait rire ! Et puis, c'est quand vous voulez pour le prochain Kébab !

Merci également à Christine Gardarin pour son aide, merci d'avoir été présente depuis le début. Je n'oublierai pas nos agréables sorties sushis qui m'ont permis de me vider la tête. Ton soutien et ton écoute m'ont été précieux tout au long de cette thèse.

Merci à Céline Laroche de m'avoir permis de produire le polysaccharide.

Un grand merci à Alina-Violeta Ursu pour ta patience et ton aide précieuse dans la purification du polysaccharide. Merci d'avoir pris le temps.

Merci à tous les membres de l'équipe IHP grâce à qui j'ai beaucoup appris.

Je tiens aussi à remercier l'équipe MEB pour votre soutien et votre agréable compagnie.

Merci à l'équipe de Patrick Vernet de m'avoir laissé réaliser ces derniers western blot mais surtout pour les bons moments de partage dans toutes les salles de repos.

J'aimerais également remercier mes ami(e)s doctorant(e)s et particulièrement Maurine et Thania, sans qui les journées auraient été beaucoup moins drôles et beaucoup trop longues. Merci pour votre aide, votre soutien et votre motivation. Vous êtes des personnes formidables, ne changez pas !

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ces travaux et que j'ai oubliées.

Une pensée particulière aux amis qui sont devenus la famille : Mallaury et Pascal ainsi qu'Aurélie et Nathan.

Mallaury et Pascal, nos Aveyronnais préférés ! Merci du fond du cœur pour tout, vous êtes des personnes incroyables, d'une générosité et d'un soutien sans limites. Merci pour les balades avec les poilus, merci d'avoir toujours été présents dans les moments difficiles comme dans les bons ! Merci pour tous les fous rires, la « bonne bouffe » et dommage que l'on ne profitera plus de cette clôture si bien posée. Vous nous manquez !

Aurélie et Nathan, merci pour votre soutien, pour les balades avec les gros ! Merci pour ces moments passés ensemble à manger de la raclette (avec de la mâche, pour faire passer le tout !).

Enfin, un grand merci à tous les quatre d'être si aimant envers Elyo.

A special thanks to you, Katrina. Thank you for being in my life, thank you for being the best friend I could ever ask for, the sister I never had. Thank you for always being there for me, listening to me and giving me the best advice. Thanks to you, I have so many great memories from high school. You're the best. I love you.

Un grand merci à ceux sans qui tout cela n'aurait pas été possible, mes parents. Merci, papa et maman, de m'avoir donné l'opportunité de faire des études, merci de votre soutien et de vos encouragements. Merci d'avoir cru en moi depuis le début. Merci à mes frères, Alexandre, Geoffray et Kentyn. Merci pour tous ces moments, tous ces souvenirs. Je suis fière d'être votre sœur. Restez comme vous êtes.

Ce n'est pas facile tous les jours d'être si loin de vous tous, mais vous savez à quel point je vous aime.

Merci du fond du cœur à mes beaux-parents, merci d'avoir été présents depuis tout ce temps, merci pour votre aide. Je vous aime.

Merci également à ma famille, à ma tatie, à mes cousines, à mes cousins. Merci, Aurélie de m'avoir écouté et soutenu (tu sais ce que c'est !).

Et puis, une pensée particulière à toi ma mamie Do, et à toi mon tonton. Je garde tous ces précieux souvenirs dans mon cœur. Vous me manquez...

J'ai évidemment gardé les plus chers à mon cœur pour la fin.

Je te remercie toi, Martial, mon mari, mon tout. Sans toi, je n'en serais pas là. Tu as su m'épauler depuis le début, me redonner confiance quand c'était difficile. Merci de m'avoir écouté, conseillé et guidé toutes ces années. Merci d'avoir cru en moi. Enfin, je pense que je ne te remercierai jamais assez, mais merci du fond du cœur de m'avoir offert le plus beau rôle de ma vie, de m'avoir donné l'opportunité de vivre cette magnifique expérience avec toi. Merci, car grâce à toi je suis maman de ce merveilleux petit prince, Elyo, notre rayon de soleil.

Je ne peux donc finir sans te remercier toi, My Mister Sweet Face, mon petit Elyo, mon fils, car tu ne le sais pas encore, mais tu as tellement changé ma vie. Tu m'as permis de voir la vie différemment et d'apprécier ces petits moments si précieux, merci d'être si exceptionnel, merci de me faire rire tous les jours et de m'apporter tant d'amour. Merci de m'avoir choisi.

« I love you forever, I like you for always, as long as I'm living, my baby you'll be”.

SOMMAIRE

Communications orales et publications

Introduction.....	1
Étude bibliographique.....	4
I. L'adhésion, une étape indispensable aux pathogènes intracellulaires.....	4
I.1. Voies d'entrée des parasites intracellulaires	5
I.2. Rôles des glycanes présents à la surface des cellules-hôtes et protéines parasitaires impliquées dans l'adhésion.....	6
II. Les microsporidies.....	10
II.1. Les microsporidioses humaines.....	12
II.2. Cycle de vie des microsporidies.....	13
II.3. Ultrastructure de la spore	15
II.4. Diagnostic et traitements des microsporidioses.....	17
II.4.1. Diagnostic	17
II.4.2. Traitements	18
III. Les mécanismes d'invasion des cellules par les microsporidies.....	20
III.1. Activation de la spore et extrusion du tube polaire	21
III.2. Invasion de la cellule	23
III.3. Caractérisation de la vacuole parasitophore.....	25
III.4. Impact de l'invasion chez l'hôte.....	26
IV. Identification de protéines impliquées dans l'adhésion chez les microsporidies.....	27
IV.1. Protéines de surface (SWP) et sécrétées.....	27
IV.2. Protéines du tube polaire (PTP).....	30
V. Utilisation de glycanes comme agents bloquant l'invasion.....	33
V.1. Activité antivirale d'exopolysaccharides (EPS).....	33
V.2. Activité antibactérienne d'EPS	35
V.3. Activités antifongiques d'EPS.....	36
VI. Objectifs de la thèse.....	36

Matériel et Méthodes.....	40
I. Identification de protéines de surface de spores d'<i>E. cuniculi</i> et <i>A. algerae</i>.....	40
I.1. Approche <i>in silico</i>	40
I.1.1. Analyses bio-informatiques	40
I.2. Approche surfomics.....	41
I.2.1. Entretien des cellules-hôtes et des parasites.....	41
I.2.2. Purification / enrichissement des spores	41
I.2.2.1. Purification sur gradient de Percoll.....	41
I.2.2.2. Purification des spores d' <i>E. cuniculi</i> par ultra-centrifugation dans un gradient de sucrose-Percoll.....	42
I.2.2.3. Vérification de la qualité de la purification des surnageants de culture	42
I.2.2.3.1. Marquage des parasites par hybridation <i>in situ</i> par fluorescence.....	42
I.2.2.3.2. Marquage des parasites à la lectine « Wheat Germ Agglutinin ».....	43
I.2.2.3.3. Marquage des parasites au Direct Yellow 96.....	43
I.2.2.3.4. Inclusion en résine EPON du culot des spores pour observation par microscopie électronique à transmission.....	43
I.2.3. Extraction et purification des protéines de surface des spores.....	44
I.2.3.1. Méthode par biotinylation des protéines de surface.....	44
I.2.3.2. Décapage des protéines de surface par trypsination.....	44
I.2.3.3. Décapage des protéines de surface par SDS chaud.....	45
I.2.3.4. Effets des décapages à la trypsinase et au SDS sur l'infectiosité des spores.....	45
I.2.4. Analyse en spectrométrie de masse.....	46
I.2.4.1. Préparation des échantillons protéiques.....	46
I.2.4.2. Traitements des données de spectrométrie de masse.....	47
I.3. Production de protéines recombinantes chez <i>Escherichia coli</i> et chez la levure <i>Pichia pastoris</i>	47
I.3.1. Construction des vecteurs d'expressions et transformation de systèmes hôtes....	47
I.3.2. Expression et purification des protéines recombinantes.....	50
I.3.2.1. Système bactérien, <i>E. coli</i> BL21λDE3.....	50
I.3.2.2. Système <i>Pichia</i> , KM71H	51
I.4. Production d'anticorps polyclonaux et Western Blot.....	52
I.5. Immunolocalisation	53

I.6. Tests fonctionnels d'inhibition du processus d'infection.....	54
I.6.1. Tests de cytotoxicité	54
I.6.2. Tests <i>in vitro</i> d'inhibition du développement parasitaire.....	55
I.6.2.1. Activité anti-microsporidienne des protéines recombinantes recEcRBLL-1, recAaRBLL-1 et recAaRBLL-2 et des anticorps anti-EcRBLL-1, AaRBLL-1 et AaRBLL-2	55
I.6.2.1.1. Test ELISA pour la quantification de la croissance d' <i>E. cuniculi</i>	55
I.6.2.1.2. Approche FISH pour la quantification de la croissance d' <i>A. algerae</i>	56
II. Recherche de glycanes exogènes inhibiteurs du processus d'infection des microsporidies.....	57
II.1. Initiation du décryptage du mécanisme d'action du polysaccharide <i>Porphyridium marinum</i>	57
II.1.1. Couplage du polysaccharide à un fluorochrome	57
II.1.2. Activité anti-microsporidienne du polysaccharide de <i>P. marinum</i>	57
II.1.3. Localisation du polysaccharide <i>i.e.</i> sur la cellule-hôte ou sur le parasite.....	57
II.2. Production du polysaccharide de <i>Porphyridium marinum</i> en photobioréacteur.....	58
II.2.1. Dosage des nitrates	59
II.2.2. Dosage des sucres totaux selon la méthode Dubois.....	59
II.2.3. Purification du surnageant de culture par diafiltration.....	60
II.3. Criblage de nouveaux polysaccharides à activité anti-microsporidienne.....	60
II.3.1. Activité anti-microsporidienne de polysaccharides sur abeilles infectées par <i>N. ceranae</i>	60
Résultats.....	62
I. Recherche de protéines impliquées dans l'adhésion.....	62
I.1. Approche <i>in silico</i>	62
I.1.1. Identification de protéines candidates de surface par recherche de motifs.....	62
I.1.2. Recherche de protéines orthologues de protéines de surface complétée par une analyse bio-informatique.....	63
I.2. Approches surfomics.....	64
I.2.1. Validation d'une méthode de purification/enrichissement de spores.....	64
I.2.2. Extraction de protéines de surface de spores.....	65
I.2.2.1. Biotinylation des protéines de surface de spores.....	65

I.2.2.2.	Décapage des protéines de surface de spores.....	66
I.2.2.3.	Évaluation du potentiel infectieux des spores « décapées ».....	67
I.2.3.	Caractérisation des fractions protéiques issues du shaving par analyse par spectrométrie de masse.....	69
I.3.	Protéines candidates sélectionnées	71
II.	Rôles des protéines RBLL dans l'adhésion.....	72
II.1.	Production de protéines recombinantes et génération des anticorps polyclonaux anti-RBLL.....	72
II.2.	Localisation d' <i>EcRBLL-1</i> , <i>AaRBLL-1</i> et <i>AaRBLL-2</i> au niveau du tube polaire et de la paroi de la spore.....	74
II.3.	Diminution et de l'infection avec les protéines recombinantes et les anticorps anti-RBLL en tant que compétiteurs dans l'adhésion de la spore.....	75
III.	Étude préliminaire d'autres protéines et de leur rôle dans l'adhésion	76
III.1.	Étude des protéines <i>EcSWP26</i> , <i>EcSWP7</i> , <i>EcSWP12</i> , <i>AaSWP7</i> et <i>AaSWP12</i> : localisation au niveau du tube polaire et de la paroi de la spore d' <i>EcSWP26</i> , <i>EcSWP9</i> et <i>EcSWP12</i>	77
III.2.	Étude des protéines <i>AaP13YM</i> , <i>AaP696T</i> , <i>AaP3569</i> , <i>AaP04039</i> , <i>AaP6BE05</i> et <i>AaP03248</i> , identifiées par l'approche surfomics	78
III.2.1.	Construction des vecteurs d'expression.....	78
III.2.2.	Production des protéines recombinantes.....	78
IV.	Utilisation de glycanes exogènes comme agents anti-microsporidiens	79
IV.1.	Mode d'action du polysaccharide issu de <i>Porphyridium marinum</i>	79
IV.1.1.	Activité du polysaccharide de PM sur des cellules infectées par <i>E. cuniculi</i>	79
IV.1.2.	Le polysaccharide de PM fluorescent est retrouvé à la périphérie des cellules humaines.....	80
IV.2.	Production et purification du polysaccharide de <i>P. marinum</i> en photobioréacteur	81
IV.3.	Activité d'autres polysaccharides chez des abeilles infectées par <i>Nosema ceranae</i>	81
Discussion.....	83
I.	Recherche d'acteurs moléculaires impliqués dans l'adhésion des spores microsporidiennes.....	83
I.1.	Intérêt et complémentarité des approches <i>in silico</i> et surfomics.....	84
I.2.	Caractérisation et rôles des protéines RBLL et autres protéines sécrétées identifiées.....	88

I.2.1. Protéines RBLL.....	88
I.2.2. Autres protéines sécrétées.....	90
II. Étude du mécanisme d'action du polysaccharide de <i>Porphyridium marinum</i> (PM).....	91
Conclusion.....	96
Références bibliographiques.....	99
Annexes.....	130

Abréviations

ActA : Actin assembly-inducing protein

AQP : Aquaporine

BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt

BMGY : Buffered Glycerol-complex Medium

BMMY : Buffered Methanol-complex Medium

BSA : Albumine de sérum bovin

DBL : Duffy binding-like

DMSO: Diméthyl sulfoxyde

DTT : Dithiothreitol

DY96 : Direct Yellow 96

EBA : Erythrocyte-Binding Antigen

EPCR : Endothelial Protein C Receptor

EPS : Exopolysaccharide

FAK : Focal Adhesion Kinase

FISH : Hybridation *in situ* par fluorescence

GAG : Glycosaminoglycanes

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

HBHA : Heparin-Binding HemAgglutinin

HBM : Motifs de liaisons à l'héparine

HFF : Cellules fibroblastiques de prépuce humain

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HSV : Virus herpes simplex

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

IPTG : Isopropyl- β -thio-galactopyranoside

LB : Luria-Bertani

MEM : Minimum Essential Eagle

MET : Microscopie Électronique à Transmission

MetAP2 : Aminopeptidase de type 2

MDCK : Cellules de reins de chien

MRC-5 : Fibroblastes embryonnaires humains

MS : Spectrométrie de masse

MTT : Bromure de 3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium

NBT : Nitro-blue tetrazolium chloride

Pb : Paire de bases

PFA : Paraformaldéhyde

PS : Polysaccharide

PM : Polysaccharide *Porphyridium marinum*

PTP : Protéine du tube polaire

PVDF : Polyvinylidenedifluoride

RBL : Reticulocyte binding-like

RBLL : Ricin-B Lectin like

RK13 : Cellules de reins de lapins

SAG : Surface Antigen

SDS : Dodécylsulfate de sodium

SVF : Sérum de Veau Fœtal

SWP : Protéine de la paroi

TA : Température ambiante

TH : Tampon d'hybridation

TfR1 : Transferrine 1

T_m : Température de fusion

TOR : Target of Rapamycin

VP : Vacuole parasitophore

vWF : von Willebrand

VZV : Virus responsable de la varicelle

VDAC : Voltage Dependend Anion

WGA : Wheat Germ Agglutinin

YNB : Yeast Nitrogen Base

2-ME : 2-mercaptoéthanol

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Aperçu des mécanismes d'entrées utilisés par les apicomplexes, les kinétoplastides et les microsporidies.

Figure 2 : Frise chronologique représentant les principales des découvertes concernant les microsporidies.

Figure 3 : Phylogénie des diverses espèces de microsporidies dont les génomes ont été séquencées ainsi que leurs principales caractéristiques.

Figure 4 : Phylogénie, hôtes et caractéristiques d'espèces microsporidiennes.

Figure 5 : Cycle de développement d'*Encephalitozoon cuniculi*.

Figure 6 : Représentation d'une spore de microsporidie.

Figure 7 : Représentation schématique de cibles thérapeutiques de microsporidies et leurs modes d'actions.

Figure 8 : Modèles hypothétiques d'invasion cellulaire par les microsporidies.

Figure 9 : Germination des spores microsporidiennes.

Figure 10 : Microscopie électronique à balayage de spores d'*Encephalitozoon intestinalis*.

Figure 11 : Modèle d'invagination lors de l'invasion d'*Encephalitozoon cuniculi*

Figure 12 : Mise en évidence d'EnP1 par immunomicroscopie électronique sur des spores d'*Encephalitozoon cuniculi*.

Figure 13 : Modèle d'invasion de microsporidie.

Figure 14 : Design expérimental de la thèse.

Figure 15 : Séquences protéiques d'*EcRBL-1*, *AaRBL-1* et *AaRBL-2*.

Figure 16 : Marquages de parasites d'*E. cuniculi* (de la fraction « culot ») obtenus après séparation des stades de développement par gradient de Percoll.

Figure 17 : Coupe obtenue par microscopie électronique à transmission (de la fraction « culot ») après purification par gradient de Percoll d'*Anncaliia algerae* et d'*Encephalitozoon cuniculi*.

Figure 18 : Frottis de spores d'*Anncaliia algerae* et d'*Encephalitozoon cuniculi* biotinylées.

Figure 19 : Profils protéiques obtenus après traitements des spores de microsporidies.

Figure 20 : Visualisation en FISH des foyers infectieux au niveau de cellules RK13 infectées par *Anncaliia algerae*.

Figure 21 : Visualisation par immunofluorescence des spores d'*Anncaliia algerae* traitées par SDS dans des cellules MRC5 infectées après 4 jours d'infection.

Figure 22 : Immunomarquage de frottis de spores d'*Anncaliia algerae*.

Figure 23 : Validation de la construction des vecteurs d'expression par électrophorèse sur gel d'agarose, des protéines *EcRBLL-1* (Pistes 1 et 4), *AaRBLL-1* (pistes 2 et 5) et *AaRBLL-2* (pistes 3 et 6) dans les systèmes bactériens (*E. coli*) et levures (*P. pastoris*).

Figure 24 : Analyse de l'expression des protéines recombinantes sur gel SDS-PAGE à partir d'extraits protéiques issus de surnageant de culture de *P. pastoris* pour *EcRBLL-1* et des fractions protéiques totales d'*E. coli* pour *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*.

Figure 25 : Analyse sur gel SDS-PAGE des protéines purifiées sur colonne Nickel (IMAC) des protéines recombinantes.

Figure 26 : Analyse par Western Blot des anticorps générés contre les protéines *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*. (A) Anticorps anti-*EcRBLL-1*.

Figure 27 : Localisation d'*EcRBLL-1* chez *Encephalitozoon cuniculi*.

Figure 28 : Intensité des pixels de l'immunolocalisation d'*EcRBLL-1* chez *Encephalitozoon cuniculi*.

Figure 29 : Localisation d'*AaRBLL-1* chez *Anncaliia algerae*.

Figure 30 : Localisation d'*AaRBLL-2* chez *Anncaliia algerae*.

Figure 31 : Effet cytotoxique des protéines recombinantes et des anticorps sur des fibroblastes humains.

Figure 32 : Activité anti-microsporidienne des anticorps anti-*EcRBLL-1* et des protéines recombinantes rec*EcRBLL-1*.

Figure 33 : Activité anti-microsporidienne de la protéine recombinante rec*AaRBLL-2* et des anticorps anti-*AaRBLL-1* et anti-*AaRBLL-2*.

Figure 34 : Analyse sur gel SDS-PAGE des protéines purifiées sur colonnes de Nickel (IMAC) des protéines recombinantes.

Figure 35 : Analyse par Western Blot des anticorps générés contre les protéines candidates.

Figure 36 : Résultats préliminaires de localisation d'*EcSWP9*; *EcSWP12* et *EcSWP26* chez *Encephalitozoon cuniculi*.

Figure 37 : Validation des couples d'amorces par électrophorèse sur gel d'agarose.

Figure 38 : Résultats des PCR sur colonies pour le criblage des pPICZ α -A recombinants.

Figure 39 : Analyse sur gel SDS-PAGE des premiers essais de production de protéines sélectionnées par approche surfomics.

Figure 40 : Visualisation en FISH des foyers infectieux au niveau de cellules infectées par *Encephalitozoon cuniculi*.

Figure 41 : Localisation de PM couplé à un fluorochrome au niveau des cellules HFF et des frottis de spores d'*Encephalitozoon cuniculi*.

Figure 42 : Nombre moyen de spores de *Nosema ceranae* par abdomen d'abeille.

Figure 43 : Effet des polysaccharides sur la survie d'abeilles infectées par *Nosema ceranae*.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Espèces de microsporidies infectant l'Homme.

Tableau 2 : Protéines de la paroi des spores identifiées chez les microsporidies.

Tableau 3 : Protéines du tube polaire PTP1 à PTP5 chez les microsporidies.

Tableau 4 : Récapitulatifs des informations nécessaires à la construction des vecteurs d'expressions.

Tableau 5 : Analyse de la structure et de la fonction des protéines RBLL obtenues avec l'outil Phyre2.

Tableau 6 : Récapitulatif des protéines sélectionnées par approche surfomics et *in silico*.

Tableau 7 : Protéines sélectionnées par approche bio-informatique suite aux résultats obtenus par spectrométrie de masse. Les échantillons protéiques analysés par spectrométrie de masse proviennent du décapage de la surface des spores d'*A. algerae*

Tableau 8 : Récapitulatif des polysaccharides utilisés dans le criblage de nouvelles molécules à activité anti-microsporidienne.

Introduction

Introduction

L'adhésion des pathogènes aux cellules-hôtes est une étape essentielle dans le processus d'infection permettant aux pathogènes d'envahir les tissus pour leur développement et la dissémination. L'adhésion est considérée comme un facteur de virulence important et représente une cible thérapeutique pour les virus, bactéries et parasites (Bhella, 2015; Hayman et al., 2005; Peterson, 1996).

Les microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires, hautement spécialisés et constituent un modèle d'interaction hôte-parasite minimaliste (Texier et al., 2010). Le phylum des microsporidies, faisant partie du règne fongique, comprend plus de 1500 espèces, capables d'infecter à la fois les vertébrés et les invertébrés ayant un impact au niveau économique, vétérinaire et médical. Les microsporidioses touchant l'Homme ont suscité de l'intérêt avec la pandémie du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), et ont été ajoutés dans la liste des pathogènes prioritaires de l'institut américain des allergies et maladies infectieuses (NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases) (Texier et al., 2010). À ce jour, 14 espèces sont connues pour infecter l'Homme. *Enterocytozoon bieneusi* est la microsporidie la plus fréquemment retrouvée chez l'Homme et est la plus répandue chez les personnes séropositives (Thellier and Breton, 2008). Ces parasites ont également un impact économique majeur dans les élevages d'animaux avec la nosérose en apiculture (avec les espèces *Nosema apis* et *Nosema ceranae*), en sériciculture (*Nosema bombycis*), en aquaculture (*Loma salmonae* pour les salmonidés, ou *Thelohania* spp. pour les crevettes) (Kent et al., 2014). À titre d'exemple, *N. ceranae* est considérée comme l'une des multiples causes de pertes massives de colonies de l'abeille européenne *Apis mellifera* observées en Europe et aux États-Unis (Higes et al., 2007). Les microsporidies possèdent un mécanisme d'invasion particulier, le tube polaire présent dans la spore qui représente la forme de résistance et de dissémination de ces parasites. Ce tube permet l'injection du sporoplasme infectieux (contenu sporal) directement dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Le processus d'infection des microsporidies peut être précédé par une étape d'adhésion de la spore à sa cellule-hôte. Un certain nombre de protéines de la paroi et du tube polaire ont été identifiées chez diverses espèces microsporidiennes. À ce jour, seules quelques protéines ont démontré un rôle important dans le processus d'infection notamment la protéine

de la paroi (NbSWP26, SWP : Spore Wall Protein) de *N. bombycis*, parasite du vers à soie (*Bombyx mori*), ainsi qu'une Ricin-B-lectin, NbRBL. NbSWP26 possède un domaine de liaison à l'héparine (HBM) et est impliqué dans l'adhésion de la spore aux cellules de *B. mori* (Li et al., 2009). La protéine NbRBL possède la capacité d'augmenter l'adhésion des spores aux cellules de *B. mori*. Un traitement des cellules-hôtes avec l'anticorps anti-NbRBL a eu un effet négatif sur l'invasion des spores et l'infection des cellules-hôtes démontrant l'importance du rôle de cette protéine dans l'adhésion et l'infection des cellules (Liu et al., 2016).

L'étape d'adhésion des spores à l'hôte semble médiée par les glycosaminoglycanes (GAGs) à la surface des cellules. En effet, une étude menée chez *Encephalitozoon intestinalis*, une espèce microsporidienne infectant les cellules de l'épithélium intestinal chez l'Homme, a montré que l'adhésion des spores aux cellules-hôtes implique des glycanes sulfatés. Des glycanes sulfatés exogènes peuvent ainsi réduire jusqu'à 88% l'adhésion des spores et par conséquent le taux d'infection (Hayman et al., 2005). De plus, une étude menée par Roussel et al., (2015) a démontré le potentiel d'un polysaccharide produit par la micro-algue *Porphyridium marinum* (PM), à réduire d'une part la croissance *in vitro* de la microsporidie *Encephalitozoon cuniculi*, parasite de mammifères, et d'autre part la mortalité et la charge parasitaire d'abeilles infectées par *N. ceranae*. Actuellement, le seul traitement pour contrôler la microsporidiose, la fumagilline, peut échouer (Huang et al., 2013) et n'est plus disponible pour traiter les microsporidioses humaines et animales. Il est donc essentiel de proposer de nouvelles stratégies pour prévenir et contrôler les microsporidioses.

L'objectif de cette thèse a donc été dans un premier temps d'identifier et de caractériser des protéines de surface et du tube polaire impliqués dans le processus d'adhésion de deux microsporidies, *Anncaliia algerae*, parasite de l'Homme et du moustique et *Encephalitozoon cuniculi*. Pour cela, deux approches ont été envisagées : une approche surfomics et une approche *in silico*. L'approche surfomics a eu pour but d'isoler des protéines de surfaces de spores par diverses méthodes (biotinylation, décapage par voies chimique ou enzymatique) et de les identifier par une analyse en spectrométrie de masse. L'approche *in silico* a été menée via l'utilisation d'outils bio-informatiques avec pour objectif de prédire des protéines candidates potentiellement localisées à la surface de la spore. Ces deux approches complémentaires ont eu pour but la sélection de protéines candidates qui ont été produites et à partir desquelles des anticorps ont été produits. Afin de valider la localisation des protéines d'intérêt à la surface des spores, une approche par immunofluorescence a été adoptée. Enfin,

le rôle potentiel de ces protéines dans les processus d'adhésion et d'infection a été confirmé par la mise en place de tests fonctionnels d'inhibition sur cellules.

Dans un second temps, l'objectif de ma thèse a été d'initier une étude visant à décrypter le mécanisme d'action d'un polysaccharide provenant d'une micro-algue rouge contre les infections microsporidiennes. Cette étude fait suite au projet SUPOBEE financé par l'Agence Nationale de la Recherche et effectué au sein du laboratoire (ANR-12-EMMA-0030) qui a démontré le potentiel anti-microsporidien de l'hétéroxylane issu de *P. marinum*, à la fois *in vitro*, par la diminution de la croissance d'*E. cuniculi* et *in vivo*, par la diminution de la mortalité et de la charge parasitaire chez les abeilles infectées par *N. ceranae* (Roussel et al., 2015). Pour répondre à cet objectif, le couplage d'un fluorochrome au PM a été réalisé et a permis de mettre en évidence son interaction potentielle avec les cellules-hôtes. De plus et dans le but d'avoir suffisamment de produits pour les expérimentations envisagées notamment pour récupérer les interagants du polysaccharide de *P. marinum*, une production de polysaccharide en photobioréacteur a été réalisée. En parallèle, un criblage d'analogues de GAGs a été effectué sur une autre espèce de microsporidie, *N. ceranae*, afin d'identifier de nouveaux polysaccharides actifs et ainsi envisager des combinaisons de molécules pouvant s'avérer plus efficaces dans l'inhibition de l'adhésion et de l'infection

Étude bibliographique

Étude bibliographique

I. L'adhésion, une étape indispensable aux pathogènes intracellulaires

Les organismes pathogènes sont présents au sein de toutes les niches écologiques et incluent une grande diversité d'organismes tels que des bactéries, des eucaryotes unicellulaires, pluricellulaires et des virus. Parmi eux, les parasites intracellulaires constituent un groupe important, se caractérisant notamment par la nécessité de pénétrer dans les cellules-hôtes pour croître et se développer (Sibley, 2004). Ils peuvent être considérés comme des parasites intracellulaires facultatifs ou obligatoires (Casadevall, 2008). Leur cycle d'infection se déroule en plusieurs étapes dont la première est représentée par l'adhésion du pathogène à la surface de sa cellule-hôte par des interactions de type ligand-récepteur. Suite à cette étape, le parasite pénètre dans la cellule par l'intermédiaire de différentes stratégies notamment par endocytose, par fusion membranaire ou par des structures spécifiques comme le tube polaire chez les microsporidies ou encore par mécanisme actif chez les Apicomplexes (Franzen, 2004; Nans et al., 2015; Sibley, 2011). Le parasite internalisé subit alors des étapes de multiplication et de différenciation pour finalement sortir de la cellule par bourgeonnement ou par lyse cellulaire.

Il n'existe pas de définition pour un pathogène intracellulaire, car le terme intracellulaire est relativement vague quand il est considéré dans le contexte de vie de microorganismes. Intracellulaire signifie « à l'intérieur d'une cellule », mais quand ce qualificatif est appliqué à des pathogènes, on est rapidement confronté à de nombreuses ambiguïtés. Par exemple, la plupart, voire la majorité, des pathogènes intracellulaires doivent passer une partie de leur cycle dans l'espace extracellulaire avant l'entrée ou après la sortie de la cellule. Un cas illustratif de ceci est l'agent pathogène intracellulaire obligatoire *Ehrlichia chaffeensis*, responsable d'erlichioses, maladies transmises par la morsure de tique, pouvant être retrouvé hors de la cellule-hôte (Casadevall, 2008; Li and Winslow, 2003). Par conséquent, sauf pour les agents pathogènes qui sont transférés verticalement lors de la réplication de la cellule-hôte, le terme intracellulaire réfère à une phase du cycle du pathogène.

Il existe un continuum entre les pathogènes intracellulaires obligatoires et les pathogènes intracellulaires non obligatoires, et, tous deux possèdent une étape clé dans leur processus d'infection : l'adhésion.

Les virus sont des pathogènes intracellulaires obligatoires, ils sont pourtant souvent considérés comme une classe différente de microorganismes et ne sont généralement pas regroupés avec les autres pathogènes intracellulaires. En général, les microorganismes sont considérés comme des pathogènes intracellulaires lorsque leur cycle dans l'hôte comprend la résidence et/ou la réplication à l'intérieur des cellules de l'hôte (Casadevall, 2008). Par exemple, les bactéries encapsulées comme *Streptococcus pneumoniae* sont généralement considérées comme des pathogènes extracellulaires, alors que ces bactéries sont retrouvées à l'intérieur de polynucléaires neutrophiles. De la même façon, *Staphylococcus aureus* n'est pas considéré comme un pathogène intracellulaire mais cette bactérie peut survivre et se répliquer à l'intérieur de plusieurs types cellulaires (Casadevall, 2008; Qazi et al., 2004).

Les microorganismes intracellulaires sont responsables de maladies chez les animaux et l'Homme, par exemple la toxoplasmose, le paludisme ou encore la leishmaniose (Sibley, 2004). Parmi les pathogènes intracellulaires facultatifs on retrouve les bactéries comme *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, ou encore *Neisseria meningitidis*, capables de se développer à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules-hôtes. Les parasites intracellulaires obligatoires, restreints à un développement intracellulaire et à l'utilisation des ressources de leurs cellules-hôtes infectant l'Homme sont notamment *Chlamydia* et *Rickettsia* chez les bactéries, certains protozoaires comme *Plasmodium* et *Toxoplasma* et des champignons comme les microsporidies (Khan et al., 2012). La compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la reconnaissance, l'adhésion et la pénétration des parasites dans les cellules-hôtes demeure fondamentale, notamment pour le développement de nouvelles stratégies prophylactiques ou thérapeutiques.

1.1. Voies d'entrée des parasites intracellulaires

Les parasites intracellulaires obligatoires utilisent des stratégies diverses pour infecter leurs cellules-hôtes, qui peuvent impliquer la voie phagocytaire de la cellule-hôte, un mode de pénétration active ou l'intervention des vésicules lysosomiales (Sibley, 2011). L'internalisation du parasite par phagocytose est un mode d'action adopté par certaines bactéries telles que les Rickettsies et les Chlamydiae (Nans et al., 2015; Sahni et al., 2013) ainsi que par le protozoaire *Leishmania* (Forestier et al., 2014, 2011; Rittig and Bogdan, 2000). La phagocytose est conditionnée par des interactions spécifiques du parasite avec des récepteurs à la surface de la cellule-hôte, par exemple le récepteur du complément 3 (CR3) et fragment Fc et les

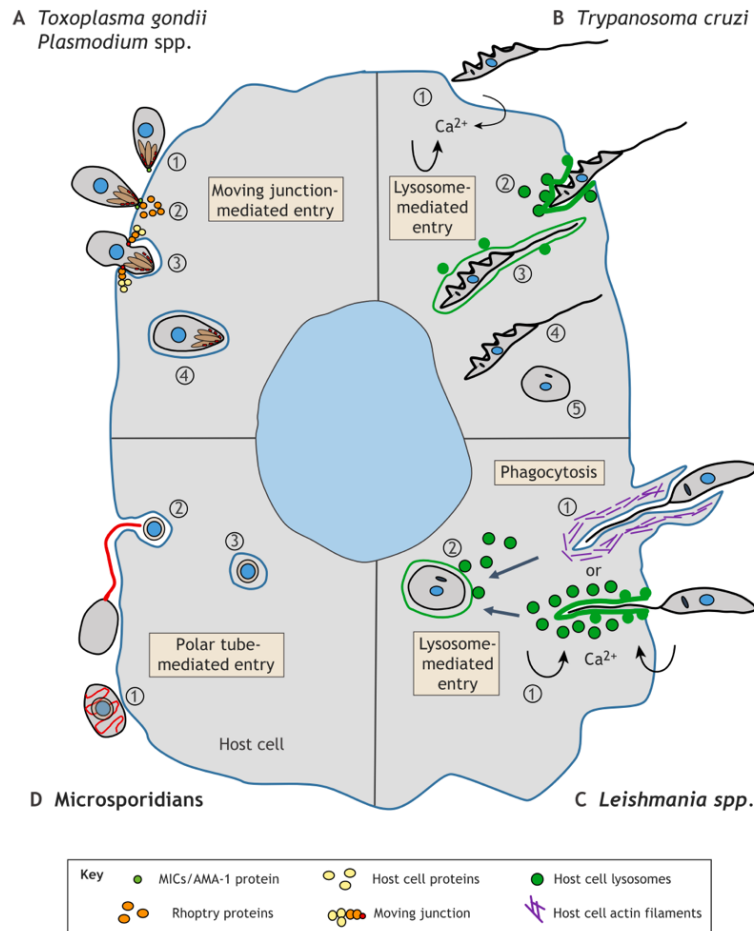


Figure 1: Aperçu des mécanismes d'entrées utilisés par les apicomplexes, les kinétoplastides et les microsporidies.

(A) (1) Les apicomplexes comme *Toxoplasma gondii* et les espèces de *Plasmodium* interagissent d'abord faiblement avec la membrane plasmique de l'hôte par l'intermédiaire de protéines à ancrage GPI. En même temps, l'interaction des protéines sécrétées par les micronèmes (MIC) conduit à la réorientation du parasite. (2) Le pôle apical du parasite est face à la membrane de l'hôte, les protéines sécrétées par les rhoptries interagissent avec les protéines de l'hôte et (3) forment la jonction mobile qui fournit la force nécessaire pour propulser le parasite dans le cytoplasme de l'hôte. Au sein des cellules, les parasites résident dans une vacuole et évitent ainsi la fusion lysosomale. (B) *Trypanosoma cruzi* envahit l'hôte en induisant à la fois un afflux de Ca^{2+} extracellulaire par le biais de lésions créées par l'entrée du parasite et la libération de Ca^{2+} intracellulaire. (2) Ceci permet le recrutement de lysosomes de l'hôte qui vont fusionner avec la membrane plasmique créant ainsi une vacuole lysosomale. (3) À l'intérieur de l'hôte, la vacuole continue de fusionner avec les lysosomes permettant (4) au parasite de s'échapper dans le cytosol où ils vont se répliquer. (C) Les espèces de *Leishmania* sont capturées par les phagocytes soit par (1) phagocytose médiée par l'actine, soit (2) par des cellules non phagocytaires par un recrutement des lysosomes dépendant du Ca^{2+} . Ce processus semble être le même que l'infection par *T. cruzi*, ce qui indique que les mécanismes sous-jacents sont conservés dans ces kinétoplastides. Après l'invasion, les espèces de *Leishmania* se développent dans des vacuoles acides qui fusionnent avec les lysosomes de l'hôte. (D) Les microsporidies peuvent infecter les cellules-hôtes par l'adhésion de la spore à la paroi suivi de l'extrusion du tube polaire pouvant former une invagination dans la membrane de l'hôte libérant ainsi le sporoplasme. Le cycle parasitaire peut ainsi débuter au sein du cytoplasme de l'hôte (Horta et al., 2020).

opsonines chez *Leishmania* (Zhang and Kima, 2016). *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*, responsables respectivement de la toxoplasmose et du paludisme, appartenant au large groupe des Apicomplexes (Portes et al., 2020; Sibley, 2011) envahissent la cellule-hôte de façon active. Ce mode de pénétration actif et unique dépend de la mobilité du parasite par un mouvement de glissement connu sous le nom de *gliding* et est généré par l'action d'un moteur appartenant à la famille des myosines. Ce moteur est retrouvé sous la forme d'un complexe appelé glidéosome dans la membrane plasmique du parasite. La sécrétion séquentielle de protéines notamment d'adhésines issues des micronèmes et des rhoptries, est une étape importante dans l'invasion de ces parasites (Pino and Soldati-Favre, 2011; Sibley, 2004). La libération de ces protéines par les parasites conduit ainsi à des modifications de la fluidité membranaire de la cellule-hôte et à des remaniements qui permettront la progression et l'internalisation du parasite au sein d'une vacuole parasitophore (**Figure 1**) (Alberts et al., 2002; Charron and Sibley, 2004; Horta et al., 2020; Portes et al., 2020).

Une stratégie d'invasion dépendante des lysosomes est utilisée par le protozoaire *Trypanosoma cruzi*, agent infectieux à l'origine de la maladie de Chagas. Suite à la liaison aux intégrines $\beta 1$ présente à la surface des cellules-hôtes, le parasite induit une augmentation locale de la concentration calcique dans le cytoplasme de la cellule, conduisant au recrutement des lysosomes au site de liaison du parasite. La fusion des lysosomes avec la membrane plasmique permet l'internalisation du parasite par l'intermédiaire d'une vacuole issue entièrement de la membrane lysosomale (**Figure 1**) (Alberts et al., 2002; Horta et al., 2020). L'adhésion initiale est souvent spécifiée et médiée par un phénomène de reconnaissance de type ligand-récepteur, impliquant souvent des glycanes ou des glycoprotéines de surface ciblés par les pathogènes.

I.2. Rôles des glycanes présents à la surface des cellules-hôtes et protéines parasitaires impliquées dans l'adhésion

La phase d'adhésion du parasite à sa cellule-hôte met en jeu des composants de surface qui sont souvent des glycoconjugués. Un répertoire important et complexe de glycanes recouvre en effet, la surface de toutes les cellules constitutives des organismes vivants. Comme la plupart des classes majeures de macromolécules biologiques, les rôles des glycanes sont relativement variés et peuvent être impliqués dans le développement, la croissance, le

fonctionnement ou la survie des organismes (Varki, 2017). Il existe de nombreuses façons de classer les rôles biologiques des glycanes, en fonction notamment du type de glycanes ou encore du type de protéines interagissant avec ces glycanes. Une classification simple et large sépare les fonctions des glycanes en quatre catégories quelque peu distinctes : (i) les rôles structurels et modulateurs notamment dans l'organisation membranaire, (ii) la reconnaissance extrinsèque (inter-espèce) comme par l'intermédiaire des adhésines des pathogènes, (iii) la reconnaissance intrinsèque (intra-espèce), provoquant par exemple, le déclenchement de l'endocytose ou de la phagocytose et enfin (iv) le mimétisme moléculaire des glycanes de l'hôte caractérisé par l'évolution des pathogènes afin de se doter de glycanes proches de ceux de l'hôte (Varki, 2017). Toutes ces catégories peuvent également inclure les glycanes se liant aux protéines (Varki, 2017). Sur le plan structural, les glycanes possèdent la plus grande diversité parmi les quatre grandes classes de macromolécules du vivant (acides nucléiques, protéines, lipides et glucides) (Marth, 2008). Les glycanes sont des polymères d'unités monosaccharidiques, qui sont assemblés pour former des oligosaccharides ou polysaccharides. Typiquement, le terme oligosaccharide fait référence à tout glycanes contenant un petit nombre de résidus monosaccharidiques (2-20) associés par des liaisons glycosidiques. Le terme polysaccharide quant à lui est utilisé pour désigner un polymère linéaire ou ramifié constitué d'un grand nombre de monosaccharides comme la cellulose. Le terme de glycoconjugué est souvent utilisé pour décrire une macromolécule formée de monosaccharides liés de manière covalente à des protéines ou des lipides, associés ou en partie intégrés à la membrane plasmique, ou sous forme libre extracellulaire tels que les glycosaminoglycanes (GAGs) et les mucines, des protéines fortement glycosylées, entrant dans la composition du mucus (Voynow and Rubin, 2009). Des modifications peuvent être apportées au niveau des groupements hydroxyles par ajout de phosphate, sulfate ou acétyle ester par exemple, donnant lieu à un phénomène connu sous le nom de micro-hétérogénéité (Cohen and Varki, 2010; Esko and Sharon, 2009). D'un point de vue fonctionnel, la signification de la micro-hétérogénéité reste incertaine. Il est possible qu'il s'agisse d'une façon de générer de la diversité, destinée, entre autres, à diversifier les fonctions de reconnaissance et/ou à échapper aux microorganismes se liant avec une spécificité élevée qu'à certaines structures de glycanes (Esko and Sharon, 2009). Une étude en 2018 a montré que cette micro-hétérogénéité régule les interactions « protéines-médicaments ». Ces résultats peuvent aider la pharmacocinétique des protéines plasmiques, dont beaucoup sont des cibles médicamenteuses et dont les glycosylations peuvent être

modifiées dans divers états pathologiques et modifier les interactions avec les médicaments (Wu et al., 2018), ce qui peut être le cas pour les interactions avec les pathogènes.

Les processus d'adhésion entre hôtes et pathogènes mettent en jeu des interactions entre des protéines et des glycanes (ou des glycoprotéines) ou encore glycanes présents à la surface des deux partenaires. L'étude de ces interactions et la caractérisation des acteurs moléculaires notamment protéiques mis en jeu sont essentielles à la compréhension du développement du pathogène.

De nombreux protozoaires, bactéries ou virus expriment des protéines de surface pour lesquelles des interactions avec des glycoconjugués spécifiques (notamment l'héparane sulfate) présents à la surface des cellules-hôtes ont été montrées (Norkin, 1995; Rostand and Esko, 1997). Les bactéries *Listeria monocytogenes* (Alvarez-Domínguez et al., 1997; Pizarro-Cerdá et al., 2012) et *Mycobacterium* spp. (Menozzi et al., 2006; Raze et al., 2018) synthétisent des protéines de surface, ActA (Actin assembly-inducing protein) et HBHA (Heparin-Binding HemAgglutinin) respectivement, se liant à l'héparine permettant l'adhésion aux cellules épithéliales. Les parasites eucaryotes comme *Trypanosoma cruzi* (Bambino-Medeiros et al., 2011; Oliveira et al., 2008), *Plasmodium* spp. (Armistead et al., 2011; Garrido et al., 2017), *Toxoplasma* (Dzierszynski et al., 2000; Lekutis et al., 2001; Macêdo et al., 2013) et encore *Leishmania* spp. (Maciej-Hulme et al., 2018; Merida-de-Barros et al., 2018) utilisent l'héparane sulfate pour l'adhésion aux cellules-hôtes.

Une étude récente a montré que les protéoglycanes à héparane sulfate chez *Trypanosoma cruzi* se lient aux kinases FAK (Focal Adhesion Kinase), des protéines ubiquitaires, responsables de l'activation de la voie de signalisation impliquée dans la migration cellulaire, régulant ainsi l'entrée du parasite dans les cellules-hôtes (Melo et al., 2020).

Chez *Plasmodium falciparum*, des protéines de la famille des « Duffy binding-like » (DBL) (Adams et al., 2001; Hodder et al., 2012), des protéines RBL (Reticulocytes binding-like) (Tham et al., 2012) et des protéines PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) ont montré leur implication dans l'adhésion aux cellules-hôtes. Les DBL se trouvent dans les micronèmes (organites caractéristiques du phylum des Apicomplexes) et reconnaissent les glycophorines A, B et C localisées à la surface des érythrocytes. Les protéines de cette famille dont EBA-175 (Erythrocyte-Binding Antigen), EBA-140, EBA-181 et EBL-1 (Erythrocyte-Binding Ligand) sont des protéines membranaires glycosylées (Kobayashi et al., 2013; Koch et al., 2017). Les protéines de la famille des RBL avec PfRh1 (*P. falciparum* reticulocyte binding protein-like

homologue 1), PfRh2a, PfRh2b, PfRh3, PfRh4 et PfRh5, possèdent quant à elles, une région N-terminale qui se lie aux basigines des érythrocytes (Kobayashi et al., 2013). Les glycophorines sont des sialoglycoprotéines et les basigines, hautement glycosylées, possèdent des domaines « Immunoglobulin-like » impliquées dans de nombreuses fonctions dont la reconnaissance cellule-cellule (Jaskiewicz et al., 2019; Kobayashi et al., 2013).

La famille des PfEMP1 joue un rôle dans l'adhésion par l'intermédiaire de nombreux récepteurs tels que les CD36 (glycoprotéine plaquettaire), l'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), l'EPCR (Endothelial Protein C Receptor), la protéine cellulaire gC1qR et le CSA (Oncofoetal Chondroïtine Sulfate), mais peut également se lier aux Immunoglobulines G (Lopez-Perez et al., 2020).

Le stade tachyzoïte de *Toxoplasma* est recouvert d'une famille de protéines ancrées aux glycosylphosphatidylinositol (GPI) composée de protéines SAG1 (Surface Antigen 1), SAG2 et SAG3 notamment, qui participeraient à l'invasion cellulaire par le parasite (Dzierszinski et al., 2000; Lekutis et al., 2001; Macêdo et al., 2013). En effet, ces protéines sont importantes dans l'attachement aux cellules-hôtes et sont liées à la réponse immunitaire afin de réguler la virulence du parasite puisque la survie du parasite dépend en fin de compte de la survie de l'hôte (Lekutis et al., 2001). SAG3 possède également une séquence consensus ressemblant au motif de Cardin-Weintraub, motif de liaison à l'héparine permettant ainsi la liaison aux cellules (Jacquet et al., 2001). Une autre protéine, MIC2, a été localisée au niveau des micronèmes, et possède un facteur de von Willebrand (vWF). vWF est une glycoprotéine multimérique présente dans le plasma sanguin (Carruthers et al., 1999) et dans de nombreuses protéines du plasma tels que les facteurs du complément B, C2, CR3 et CR4. Les protéines possédant vWF participent à de nombreux phénomènes biologiques comme l'adhésion cellulaire et la transduction du signal (Carruthers et al., 2000, 1999). Ainsi, les protéines localisées au niveau des micronèmes (comme MIC2) sont capables de se lier aux cellules-hôtes, fonctionnant comme des adhésines (Cérède et al., 2002; Soldati et al., 2001). Les MICs et particulièrement MIC3 et MIC8, sont composés de domaines structuraux qui sont morphologiquement et fonctionnellement conservés au niveau moléculaire (Cérède et al., 2002; Huynh et al., 2003). Certains de ces domaines présentent une homologie avec des adhésines connues chez des protéines eucaryotes et notamment un domaine « lectin like » (Cérède et al., 2002; Soldati et al., 2001).

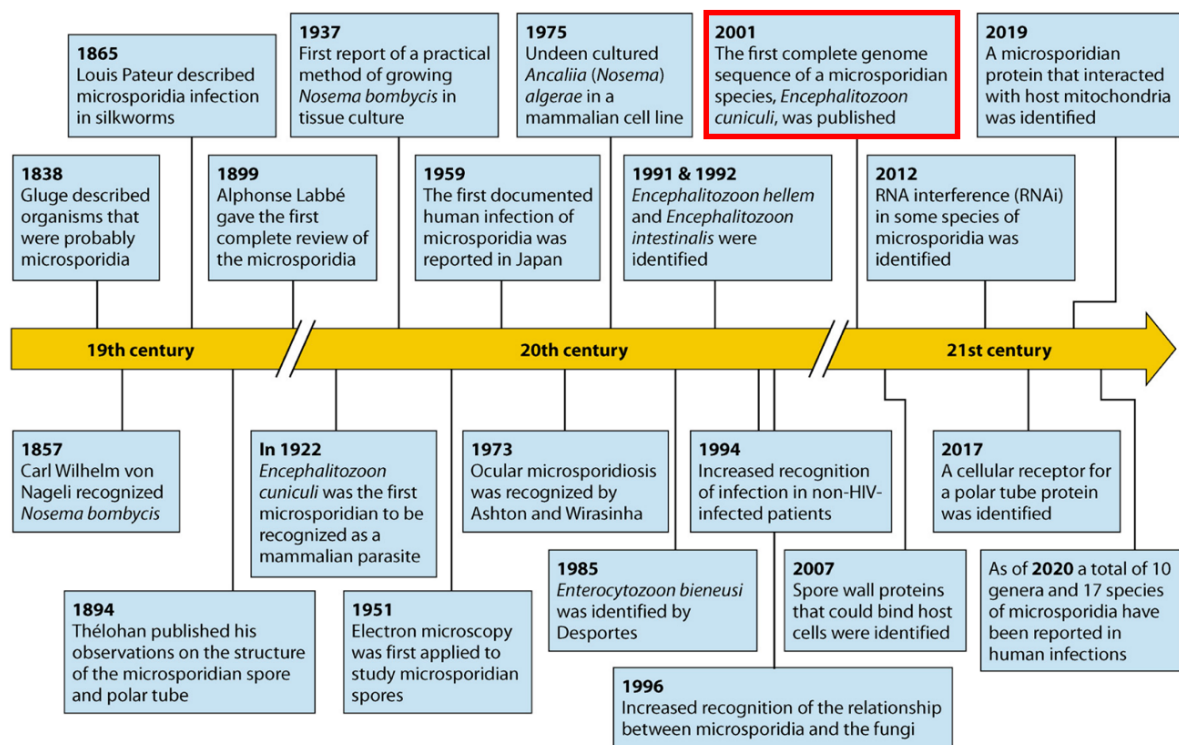


Figure 2 : Frise chronologique représentant les principales des découvertes concernant les microsporidies (Han et al., 2021). Le séquençage du génome d'*Encephalitozoon cuniculi* (encadré rouge) a été réalisé par l'équipe anciennement appelée Parasitologie Moléculaire et Cellulaire en 2001 (Katinka et al., 2001).

La protéine gp63, est une enzyme présente à la surface des cellules de *Leishmania* et attachée par un ancrage GPI. Cette protéine joue un rôle lors de l'infection des macrophages de l'hôte (Isnard et al., 2012; Liu and Uzonna, 2012). Certains récepteurs de gp63 du pathogène ont pu être identifiés, notamment le récepteur du complément 1 (CR1), présent sur la quasi-totalité des cellules phagocytaires (monocytes sanguins, macrophages, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles) mais également sur des cellules non phagocytaires comme les globules rouges et les lymphocytes B. Le récepteur du complément 3 (CR3 OU Mac-1), un récepteur à la surface des cellules humaines, retrouvé notamment au niveau des neutrophiles ou des macrophages, joue également un rôle dans l'adhésion (Kane and Mosser, 2000; Liu and Uzonna, 2012). Enfin, concernant les microsporidies, l'étape d'adhésion est essentielle pour leur survie dans la mesure où ce sont des parasites intracellulaires obligatoires. Cependant, il existe peu d'études portant sur les mécanismes d'entrée et la caractérisation des interactions moléculaires mises en jeu chez les microsporidies, mais il apparaît que les glycanes jouent un rôle important dans l'adhésion des spores aux cellules-hôtes (Han et al., 2017; Hayman et al., 2005; Liu et al., 2016; Roussel et al., 2015; Southern et al., 2007).

II. Les microsporidies

L'étude des microsporidies débuta à la fin du XIX^e siècle quand l'industrie du ver à soie fut ravagée par la pébrine, maladie touchant le ver à soie *Bombyx mori* (**Figure 2**). Le nom de pébrine, gâtine, ou encore maladie des corpuscules a été donné du fait de la présence de petites taches noires, de taille variée, semblables à des grains de poivre (*pebre* en provençal) sur la peau des vers malades et par la présence de corpuscules à l'intérieur des organes des vers à soie (Pasteur, 1870). Afin d'enrayer l'épidémie et de limiter la propagation de l'agent infectieux, Pasteur proposa, une méthode dite de « grainage cellulaire » qui consistait à isoler les œufs de *Bombyx mori* malades des œufs sains (Pasteur, 1870). C'est bien avant, en 1857, que l'agent infectieux, un champignon microscopique, nommé *Nosema bombycis*, responsable de la pébrine fut pour la première fois mis en évidence par le botaniste suisse Karl Wilhelm Von Nägeli. Nägeli considéra *Nosema* comme un membre des champignons schizomycètes, qui à l'époque, était un groupe « fourre-tout » composé de levures et bactéries.

En 1882, les microsporidies furent reconsidérées comme un groupe distinct d'organismes unicellulaires quand Balbiani créa l'Ordre des Microsporidies suite aux travaux sur *Nosema*

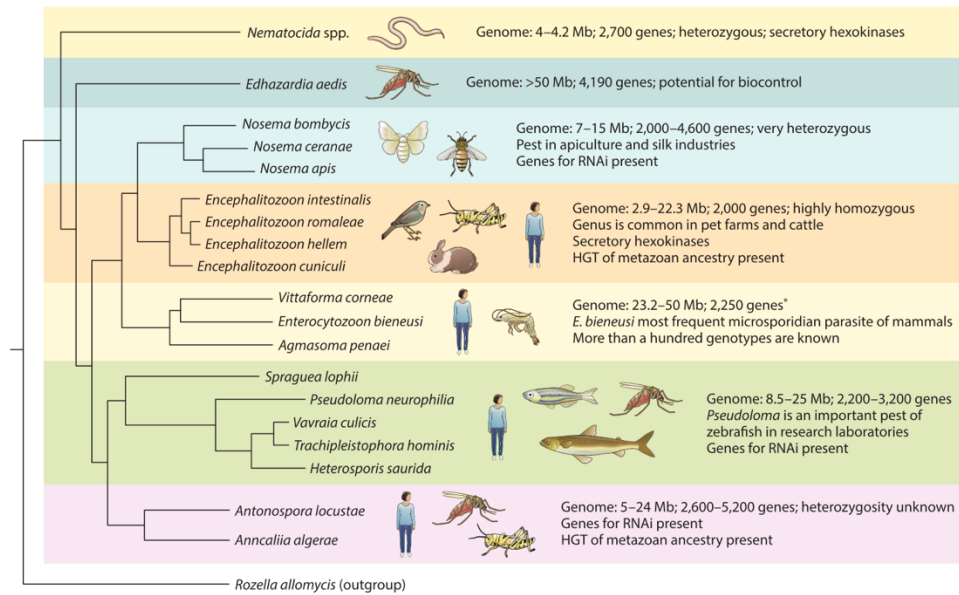


Figure 3 : Phylogénie des diverses espèces de microsporidies dont les génomes ont été séquencés ainsi que leurs principales caractéristiques. Le logiciel PhyloBayes a été utilisé afin de reconstruire cet arbre phylogénétique en se basant sur l’alignement de 19 gènes codant pour des protéines orthologues. *Rozella allomycis*, un champignon appartenant au phylum des *Cryptomycota* a été utilisé en tant que groupe externe. Les génomes de *Pseudoloma neurophilia*, *Agmasoma penaei*, et d’*Heterosporis saurida* n’ont pas été publiés. Les données de *Vittaforma corneae*, *Vavraia culicis* et *Edhazardia aedis* ont été obtenus à partir du projet de séquençage comparatif des microsporidies, Broad Institute of Harvard et du MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). * Nombre de gènes basé seulement sur *V. corneae*. Abréviations: HGT : Transfert Horizontal de Gènes ; RNAi : ARN interférence (d’après Corradi, 2015).

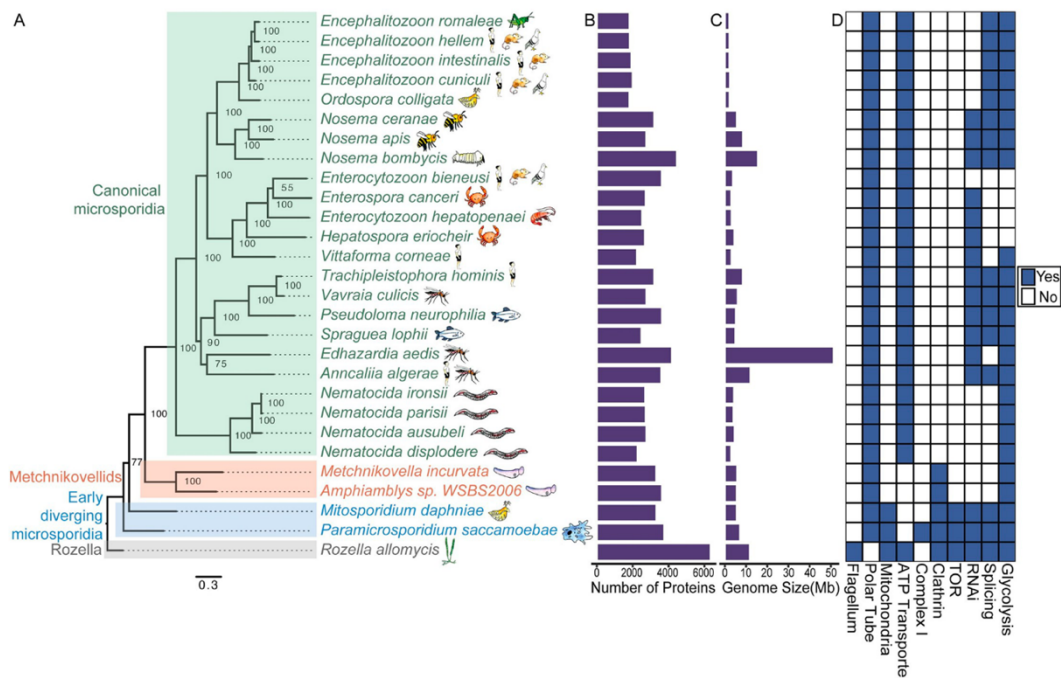


Figure 4 : Phylogénie, hôtes et caractéristiques d’espèces microsporidiennes. (A) Arbre phylogénétique de microsporidies dont le génome a été séquencé entièrement et les espèces apparentées. (B) Comparaison du contenu protéique de chaque espèce. (C) Comparaison de la taille du génome pour chaque espèce. (D) Caractéristiques morphologiques et moléculaires de chaque espèce. TOR, cible de la rapamycine (D’après Wadi et Reinke, 2020).

bombycis (Balbiani, 1882). L'unique structure et les caractères biologiques des microsporidies ont justifié leur positionnement dans un phylum qui leur était propre nommé « Microspora Sprague, 1977 » ou « Microsporidia Balbiani 1882 » (Balbiani, 1882). Aujourd'hui, les microsporidies sont connues comme étant un groupe de parasites extrêmement divers. Chez l'Homme, les microsporidies sont considérées comme des pathogènes émergents depuis la pandémie du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), et leur ajout à la liste des pathogènes émergents de l'Institut Américain des allergies et maladies infectieuses (NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases) (Texier et al., 2010). L'intérêt porté à ces parasites dans le domaine vétérinaire est lié à l'impact économique majeur de nombreuses microsporidioses sur des élevages en apiculture, en sériciculture et en aquaculture. Les microsporidies, très répandues dans la nature, comprennent plus de 1400 espèces réparties en plus de 200 genres (Cali et al., 2017) et possèdent un large spectre d'hôtes allant des protistes (dont certaines microsporidies sont des hyperparasites) aux vertébrés incluant l'Homme (Stentiford et al., 2016) (**Figure 3**). Les microsporidies sont connues pour leurs caractéristiques atypiques comparées aux autres eucaryotes. Elles possèdent un appareil de Golgi singulier, non structuré en dictyosomes (Beznoussenko et al., 2007), sont dépourvues de peroxyosomes et sont dotés de reliques mitochondriales appelées mitosomes, incapables de produire de l'ATP mais impliqués dans la biosynthèse des centres Fer-Soufre essentiels pour de nombreuses protéines (Galindo et al., 2018). Les ribosomes de microsporidies sont similaires à ceux des procaryotes (70S) composés d'ARN ribosomiaux (ARNr) 16S et 23S. Cependant, l'ARNr 23S a la particularité d'être fusionné à un ARNr 5,8S eucaryotique (Vossbrinck et al., 1987; Vossbrinck and Woese, 1986). Les génomes des microsporidies ont suscité beaucoup d'intérêt depuis que les premières analyses génomiques ont montré une taille réduite et une compaction de ces génomes comparés aux autres eucaryotes, reflétant une réelle dépendance vis-à-vis de leur hôte pour leur survie (Keeling and Fast, 2002; Nakjang et al., 2013). En effet, la taille des génomes de microsporidies peut varier de 2,18 Mb pour *Encephalitozoon hellem* (Swiss), parasite de mammifères, à 51,35 Mb pour *Edhazardia aedis*, parasite de moustique (Han et al., 2021). Les analyses des séquences génomiques ont révélé une perte importante de familles de protéines présentes chez d'autres eucaryotes, réduisant approximativement à 800 le nombre de protéines conservées (**Figure 4**) (Wadi and Reinke, 2020). Les protéines conservées assurent des fonctions essentielles au niveau des processus cellulaires fondamentaux comme la réplication de l'ADN, la transcription et la traduction (Galindo et al., 2018; Mikhailov et al.,

Tableau 1 : Espèces de microsporidies infectant l'Homme (d'après Han et Weiss, 2017).

Espèces	Synonyme(s)	Lieu d'infection commun chez l'Homme	Autres hôtes mammifères	Hôtes non-mammifères décrits	Manifestation clinique
<i>Anncaliia algerae</i>	<i>Brachiola algerae</i>	Yeux		Moustiques	Myosite, kératoconjonctivite
	<i>Nosema algerae</i>	Muscle			
<i>Anncaliia connori</i>	<i>Brachiola connori</i>	Systémique			Maladie disséminée
	<i>Nosema connori</i>				
<i>Anncaliia vesicularum</i>	<i>Brachiola vesicularum</i>	Muscle			Myosite
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	<i>Nosema cuniculi</i>	Systémique	Large gamme d'hôtes	Oiseaux	Hépatite, encéphalite, péritonite, urétrite, prostatite, néphrite, sinusite, kératoconjonctivite, cystite, diarrhée, infection disséminée
<i>Encephalitozoon hellem</i>		Yeux	Chauve-souris	Oiseaux	Kératoconjonctivite, sinusite, pneumopathie, néphrite, prostatite, urétrite, cystite, diarrhée, infection disséminée
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	<i>Septata intestinalis</i>	Petit intestin	Large gamme d'hôtes	Oies	Diarrhée, perforation intestinale, néphrite, kératoconjonctivite, infection disséminée
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>		Petit intestin ; tractus biliaire	Large gamme d'hôtes	Oiseaux	Diarrhée, malabsorption avec syndrome de dépérissement, rhinite, bronchite
<i>Microsporidium africanum</i>		Yeux			Kératite stromale
<i>Microsporidium ceylonensis</i>		Yeux			Kératite stromale
<i>Microsporidium CU (Endoreticulatus-like)</i>		Muscle			Myosite
<i>Nosema oculorum</i>		Yeux			Kératite stromale
<i>Pleistophora ronneafiei</i>		Muscle		<u>Poissons*</u>	Myosite
<i>Trachipleistophora anthropoptera</i>		Yeux / Systémique		<u>Insectes*</u>	Encéphalite, kératite, infection disséminée
<i>Trachipleistophora hominis</i>		Muscle / Systémique		<u>Moustiques*</u>	Myosite, kératoconjonctivite, sinusite, encéphalite
<i>Tubulinosema acridophagus</i>		Muscle / Systémique		<u>Mouches des fruits*</u>	Myosite, infection disséminée
<i>Vittaforma coneae</i>	<i>Nosema corneum</i>	Yeux / Tractus urinaire			Kératoconjonctivite, infection urinaire

*Hôte(s) putatif(s) basé(s) sur la phylogénie ou les relations d'hôte d'autres espèces du même genre

2016; Nakjang et al., 2013; Wadi and Reinke, 2020). Les protéines non conservées incluent quant à elles des enzymes métaboliques, des voies de régulations et des protéines impliquées dans le transport vésiculaire comme les protéines TOR (Target of Rapamycin) impliquées dans les processus cellulaires (synthèse protéique, biogenèse des ribosomes, etc.) et les clathrines, protéines essentielles dans la formation de vésicules (Galindo et al., 2018; Mikhailov et al., 2016; Shertz et al., 2010; Wadi and Reinke, 2020).

II.1. Les microsporidioses humaines

Les premières infections par les microsporidies responsables d'encéphalites ont été décrites en 1959. Depuis, le nombre d'espèces de microsporidies causant des infections humaines n'a cessé d'augmenter (**Tableau 1**). Chez les personnes immunodéprimées comme celles ayant subi des transplantations d'organes ou de moelle osseuse ou encore touchées par le VIH, les microsporidioses sont un problème majeur. La plupart des infections par les microsporidies se font via le tractus gastro-intestinal et sont la résultante d'une infection hydrique ou par des aliments contenant des spores microsporidiennes (Didier and Weiss, 2011; Ghoshal et al., 2015). Cependant, d'autres voies de transmission ont été décrites, par exemple le contact direct avec des plaies ouvertes, les yeux et les muqueuses génitales (Didier and Weiss, 2011). Les microsporidioses peuvent provoquer des infections gastro-intestinales ou respiratoires, des hépatites, encéphalites, myopathies ou encore des infections disséminées. Les infections chez les mammifères immunocompétents sont souvent chroniques et asymptomatiques alors que chez les hôtes immunodéprimés, les infections peuvent être létales (Texier et al., 2010). De nombreux cas de diarrhées et d'émaciations chroniques associées aux infections microsporidiennes chez les patients touchés par le VIH ont été largement reportés. Dans 70% des cas de personnes immunodéprimées, la recherche de microsporidies s'est avérée positive (Coyle et al., 1996; Han and Weiss, 2018; Van Gool et al., 1995; Weber et al., 1994). Les genres les plus connus comme étant à l'origine d'infections humaines sont *Enterocytozoon* et *Encephalitozoon*. *Enterocytozoon bienewisi* a été la première microsporidie décrite responsable de diarrhées chez les patients touchés par le VIH (Desportes et al., 1985; Visvesvara, 2002). *Encephalitozoon intestinalis* a tout d'abord été identifié chez les patients porteurs du VIH souffrant de diarrhées et est considérée comme étant la deuxième espèce la plus répandue infectant l'Homme (Cali et al., 1993; Orenstein et al., 1992). *Encephalitozoon cuniculi* a été quant à elle, la première espèce microsporidienne de mammifères, isolée et

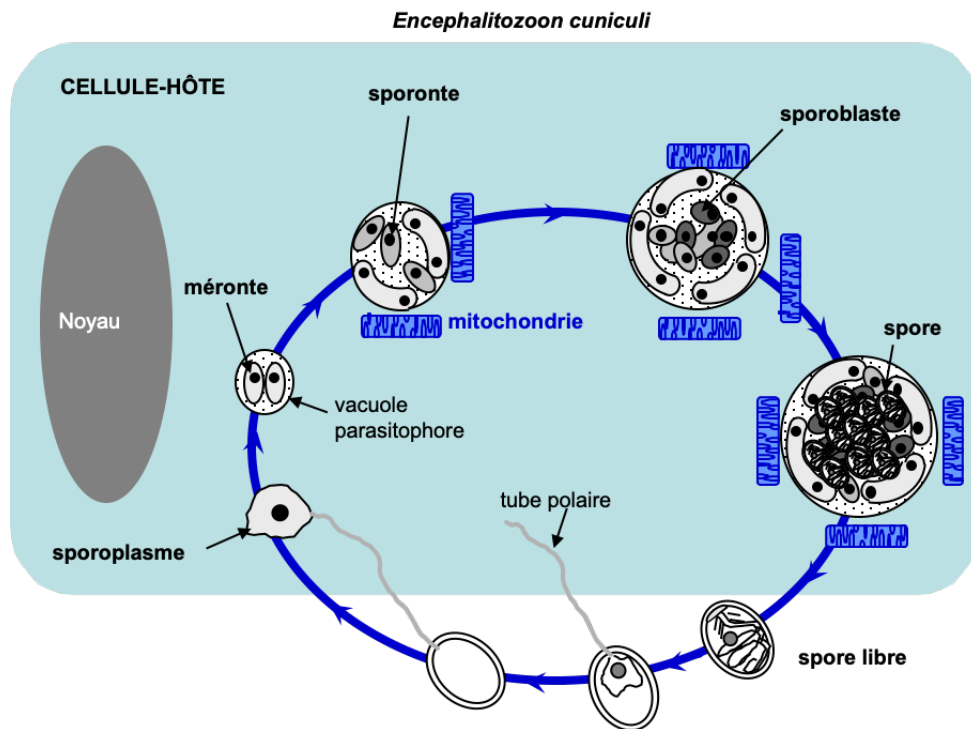


Figure 5 : Cycle de développement d'*Encephalitozoon cuniculi*. Après extrusion du tube polaire, le sporoplasme se retrouve au sein du cytoplasme de la cellule-hôte. Un nouveau cycle de développement peut débuter avec la phase de multiplication (mérogonie) suivie de la phase de différenciation (sporogonie) conduisant ainsi à la formation de spores à l'intérieur d'une vacuole parasitophore. Cette vacuole est entourée par les mitochondries de la cellule-hôte. Les spores sont libérées en fin de cycle (D'après Texier et al., 2010).

cultivée *in vitro* à long terme (Shadduck, 1969; Visvesvara, 2002). *Encephalitozoon hellem* a été identifiée pour la première fois à partir d'échantillons conjonctivaux de patients porteurs de VIH pouvant provoquer des infections systémiques chez l'Homme (Didier et al., 1991; Visvesvara et al., 1994; Weber et al., 1993). De plus, les trois espèces d'*Encephalitozoon* infectant l'Homme sont cultivables *in vitro*, et sont des espèces pour lesquelles il existe des modèles rongeurs (Han and Weiss, 2018). D'autres espèces de microsporidies ont également été signalées, moins fréquemment, dans des infections humaines. *Vittaforma corneae* a été identifiée pour la première fois chez un individu non porteur du VIH et est responsable de kératites (Font et al., 2000; Sharma et al., 2011). *Anncaliia algerae*, parasite de moustiques est à l'origine de myosites chez les immunodéprimés (Cali et al., 2010; Field et al., 2012; Han and Weiss, 2018; Visvesvara, 2002). Les espèces *Trachipleistophora* (*T. hominis* et *T. anthropothera*) dont les hôtes naturels sont les insectes ont été également impliquées dans des myosites et kératites chez les immunodéprimés (Vávra et al., 2011).

II.2. Cycle de vie des microsporidies

De manière générale, le cycle de vie des microsporidies est divisé en trois phases de développement : la phase environnementale avec la spore infectieuse responsable de la dissémination, la phase proliférative aussi connue sous le nom de mérogonie et enfin la phase de sporogonie, stade de maturation de la spore infectieuse et environnementale. La phase infectieuse peut être divisée en deux parties : les facteurs qui affectent la survie des spores dans l'environnement extracellulaire et les facteurs environnementaux pour l'activation des spores (Cali and Takvorian, 2014). La mérogonie ainsi que la sporogonie ont lieu à l'intérieur des cellules-hôtes infectées (**Figure 5**). Il est important de noter que la plupart des microsporidies infectent le cytoplasme des cellules hôtes, cependant le genre *Nucleospora*, (El Alaoui et al., 2006), *Enterospora* (Palenzuela et al., 2014), et *Desmozoon* (Herrero et al., 2020), parasites de poissons, infectent le nucléoplasme de leurs hôtes et certains se développent à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme.

L'extrusion brutale du tube polaire permet l'inoculation et le transfert du sporoplasme (contenu sporal) dans le cytoplasme de la cellule-hôte (Franzen, 2004). Le sporoplasme libéré, limité par une membrane provenant du polaroplaste, représente l'entité infectieuse de la spore (Weidner et al., 1984). Suite à l'inoculation du sporoplasme dans la cellule-hôte, le parasite se différencie en méronite, au cours du stade de prolifération (ou mérogonie). Les méronites

possèdent une large région nucléaire avec un ou deux noyaux (diplocaryon) selon les espèces et sont caractérisés par une forme arrondie, limitée par une membrane unique. Suite à la mérogonie survient une phase de maturation appelée, sporogonie (Bigliardi and Sacchi, 2001; Franzen, 2005). La phase de sporogonie implique essentiellement le passage de mérontes en sporontes, cellules qui produiront ensuite les sporoblastes. Le passage de mérontes à sporontes est caractérisé par l'épaississement de la membrane cellulaire. Une fois la membrane des sporontes formée, les sporontes se divisent par fission binaire en sporoblastes. Les sporoblastes sont la résultante de la dernière division cellulaire du développement intracellulaire. Les sporoblastes subissent des modifications morphologiques comme la formation de l'appareil d'extrusion composé notamment du tube polaire, du disque d'ancrage et de la vacuole postérieure. Les sporoblastes diminuent ensuite de volume, prennent un aspect crénelé et leur cytoplasme devient de plus en plus dense aux électrons, en liaison avec l'accroissement du nombre de ribosomes et de citernes du réticulum endoplasmique (Cali and Takvorian, 2014). Le cycle se termine par la différenciation des sporoblastes en spores (Bigliardi and Sacchi, 2001; Franzen, 2005). Les spores ainsi formées peuvent alors soit éjecter leur tube polaire au sein de leur cellule-hôte et infecter les cellules voisines, soit être libérées de la cellule par lyse cellulaire permettant leur dissémination (Bigliardi and Sacchi, 2001; Franzen, 2005). Les mérontes peuvent se développer au contact direct du cytoplasme de la cellule-hôte (*Nosema*, *Enterocytozoon*), au sein d'une vacuole parasitophore (*Encephalitozoon*), entourée d'une couche amorphe sécrétée par le parasite (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Thelohania*) ou entourée par le réticulum endoplasmique de l'hôte (*Endoreticulatis*, *Vittaforma*) (Bigliardi and Sacchi, 2001). La clé de la réussite de survie des microsporidies repose sur la diversité et la flexibilité de leurs stratégies de transmission et cycle de développement. Les voies de transmission des microsporidies peuvent varier en fonction des espèces. Par exemple, *Nosema apis* est transmise horizontalement (transmission d'un individu à un autre) à son abeille-hôte *Apis mellifera* (de Graaf et al., 1994; Dunn and Smith, 2001). *A contrario*, *Nosema granulosis*, est maintenue dans son hôte crustacé, *Gammarus duebeni*, uniquement par transmission verticale (transmission à la descendance) (Dunn and Smith, 2001; Terry et al., 1999). En parallèle, *Amblyospora connecticus* a un cycle de vie relativement complexe avec une alternance d'hôtes, le moustique (*Aedes cantator*) et le copépode (*Acanthocyclops vernalis*) et se sert de la transmission verticale et horizontale pour survivre (Becnel and Andreadis, 1999; Dunn and Smith, 2001).

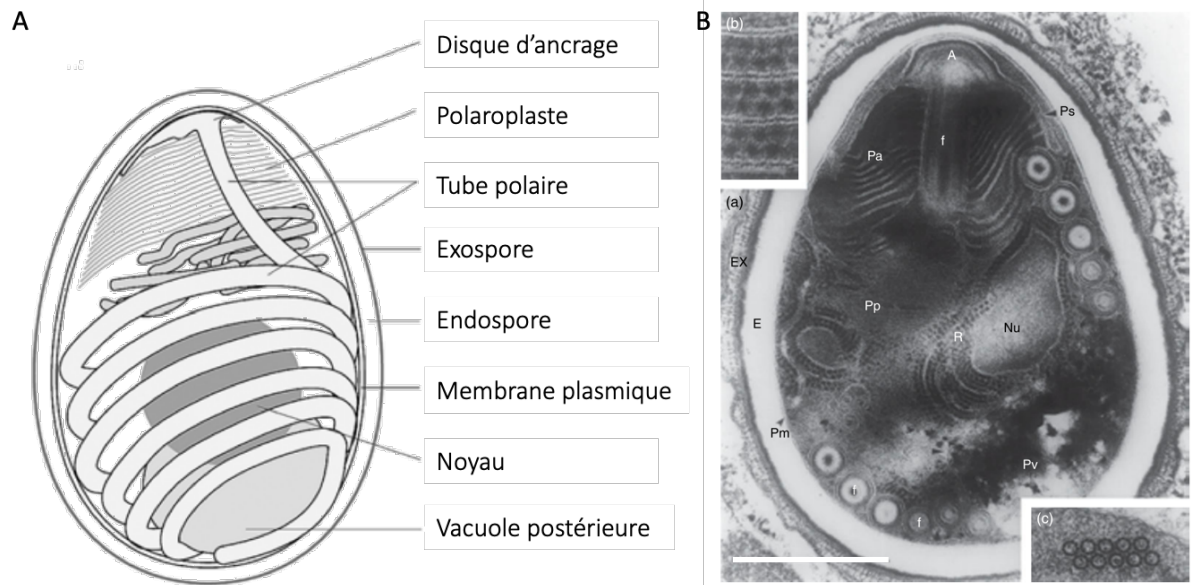


Figure 6 : Représentation d'une spore de microsporidie. (A) Représentation schématique de la spore :

La paroi de la spore est composée de 3 couches : l'exospore qui est dense aux électrons ; l'endospore, une couche épaisse, claire aux électrons et la membrane plasmique. L'appareil d'extrusion unique connu sous le nom de tube polaire est embobiné à l'intérieur de la spore et se termine au niveau du disque d'ancrage. Le nombre de bobines dépend de l'espèce de microsporidie. La spore renferme également le polaroplaste, le contenu cytoplasmique, le(s) noyau(x) et la vacuole postérieure (D'après Franzen, 2005).

(B) Photographie en microscopie électronique à transmission de l'ultrastructure d'une spore mature.

(a) Coupe longitudinale d'une spore exposant les principales caractéristiques de la spore.

(b) Les polyribosomes attachés à la membrane (*Napamichum dispersus* (parasite de larve de moucheron)).

(c) Polyribosomes disposés de manière circulaire (*Hamiltosporidium magnivora*, parasite de daphnies).

A, Disque d'ancrage; E, Endospore; EX, exospore; f, tube polaire; Nu, Noyau; Pa, Polaroplaste antérieur; Pm, membrane plasmique; Pp, polaroplaste postérieur; Ps, sac polaire; Pv, vacuole postérieure; R, polyribosomes. Échelle = 0,5 μm (a) ; 100 nm (b, c). (D'après Vávra et Larsson, 2014).

II.3. Ultrastructure de la spore

Le développement microsporidien débute et se termine par le stade sporal. Les microsporidies peuvent survivre en dehors de leurs hôtes pendant de nombreuses années sous forme de spores dormantes. Les spores microsporidiennes sont généralement petites, ovales ou pyriformes dont la taille peut varier de 1 à 12 μm . Les microsporidies infectant les mammifères font généralement 1 à 4 μm de longueur (Han et al., 2020; Vávra and Larsson, 2014). La clé de cette survie est liée à la présence d'une paroi épaisse et rigide procurant une protection vis-à-vis des agressions extérieures. La membrane plasmique englobe le contenu de la spore à savoir l'appareil d'extrusion, le sporoplasme et la vacuole postérieure (**Figure 6 (A) et (B)**). La paroi de la spore est constituée de telle sorte à résister à des pressions osmotiques au cours de la germination, mais rompt au niveau du capuchon polaire permettant la dévagination du tube polaire. La rupture a lieu au pôle apical de la spore où la paroi de la spore est plus fine créant la sortie du tube polaire. La paroi est formée de deux couches externes à la membrane plasmique, l'exospore et l'endospore.

L'exospore représente la couche supérieure de la spore. C'est une couche épaisse, dense aux électrons et uniforme tout autour de la spore. Son épaisseur et sa structure varient en fonction des microsporidies, pouvant être composées d'une couche d'environ 10 nm fine, dense et non stratifiée à une structure multicouche d'environ 200 nm d'épaisseur (Vávra and Larsson, 2014). Par exemple, chez le genre *Encephalitozoon*, l'exospore a été décrite comme une couche homogène, mais une résolution plus performante en microscopie électronique a démontré la présence de trois couches de structure et de densité électronique différentes.

La structure de l'exospore mérite plus d'attention, car elle peut être utilisée pour l'identification taxonomique des espèces. En effet, la présence d'une exospore structurée en multicouches a été un déterminant dans la différenciation de *Nosema locustae* d'autres espèces de *Nosema* et par la création d'un nouveau genre *Antonospora*, maintenant connu sous le nom de *Paranosema* (Slamovits et al., 2004). L'exospore est composée de protéines dont un certain nombre ont été caractérisées et seraient spécifiques aux microsporidies (Vávra and Lukeš, 2013).

L'endospore est claire aux électrons d'où son apparence de couche déstructurée localisée sous l'exospore. Cette couche pouvant atteindre 100 nm d'épaisseur, est uniforme autour de la spore sauf au niveau du pôle apical où son épaisseur peut être diminuée de moitié voire moins.

L'endospore est composée de chitine, qui permet la détection des microsporidies par marqueurs fluorescents tels que le Calcofluor-white ou le rouge congo (Vávra et al., 1993).

L'endospore est formée tardivement au cours de la maturation de la spore et cette couche se développe jusqu'à ce que la spore soit complètement mature. Cette formation tardive de l'endospore est probablement expliquée par son rôle dans la fermeture de la spore, la séparant du cytoplasme de l'hôte dont le parasite dépend métaboliquement jusqu'à sa sortie de la cellule-hôte (Vávra and Larsson, 2014).

La surface interne de l'endospore est tapissée par la membrane plasmique. Cette membrane délimite le contenu cytoplasmique de la spore de la paroi et est souvent considérée comme faisant partie de celle-ci, car elle est toujours présente lors de la dévagination de la spore. Une nouvelle membrane, considérée comme dérivée du polaroplaste, se forme autour du sporoplasme quand celui-ci est extrudé de la spore (Vávra and Larsson, 2014).

Malgré une structure uniforme et basique du tube polaire, certaines caractéristiques varient en fonction des microsporidies participant donc à la caractérisation de chaque espèce. L'analyse du tube polaire se fait sur des spores matures. En effet, le tube polaire continue de croître, de s'enrouler, jusqu'à ce que la spore soit complètement mature. De ce fait, le nombre d'enroulements, l'arrangement, l'angle d'inclinaison ainsi que la largeur du tube polaire au sein de la spore permettent de différencier et de caractériser les espèces microsporidiennes (Vávra and Larsson, 2014). Le tube polaire forme 6 à 10 tours de spire en double rangée pour les genres *Enterocytozoon* et *Anncaliia* et 5 à 11 bobines en rangée simple pour les genres *Encephalitozoon*, *Trachipleistophora* et *Vittaforma*. Le tube polaire est également formé de couches concentriques de densité et d'épaisseur différentes. Le tube polaire est enveloppé dans une membrane et le cœur du tube est composé d'un matériel dense aux électrons (Bigliardi and Sacchi, 2001; Vávra and Larsson, 2014). Les protéines principales constitutives du tube polaire ont été isolées et décrites chez *Encephalitozoon* (Delbac et al., 1998; Keohane et al., 1998). La microscopie électronique a permis de révéler la présence d'actine au niveau du tube polaire (Bigliardi et al., 1999) qui se termine au niveau du disque d'ancrage localisé au pôle apical. À cet endroit de la spore, la paroi est plus fine, et est le lieu de sortie du tube polaire lors de la rupture de la paroi au moment de la dévagination (Bigliardi and Sacchi, 2001; Vávra and Larsson, 2014). Une portion du tube polaire est entourée du polaroplaste lamellaire représenté par un amas de membranes, disposé à la perpendiculaire du tube. Le polaroplaste lamellaire est précédé par le polaroplaste vésiculaire au centre de la spore, composé de

structures tubulaires. Ces membranes sont riches en carbohydrates et sont en continuité de la membrane du tube polaire (Bigliardi and Sacchi, 2001).

Le reste de la spore est occupé par le cytoplasme et le ou les noyaux. En effet, certaines espèces de microsporidies possèdent un seul noyau comme *Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora* et *Encephalitozoon* et d'autres en possèdent deux, étroitement apposés et fonctionnant comme une seule unité appelée diplokaryon, comme *Nosema*, *Anncaliia* ou *Thelohania* (Bronnvall and Larsson, 1995; Didier et al., 1998).

II.4. Diagnostic et traitements des microsporidioses

II.4.1. Diagnostic

Initialement le diagnostic de microsporidiose était établi par des analyses en microscopie électronique à transmission afin d'identifier les caractéristiques ultra-structurales spécifiques à chaque espèce tels que le nombre de tours de spire du tube polaire, la taille et la forme de la spore, la structure de l'exospore (Procop, 2007; Vávra and Larsson, 2014).

La microscopie optique est utilisée pour l'identification des spores dans les selles, les urines ou les biopsies de tissus. Cette méthode est souvent associée à des fluorochromes tels que le Calcofluor-white et l'Uvitex 2B, marqueurs spécifiques de la chitine (Van Gool et al., 1993; Vávra et al., 1993; Weber et al., 1993). Cependant, ces techniques ne permettent pas de déterminer l'espèce observée et peuvent croiser avec d'autres champignons. Une recherche par immunofluorescence grâce à des anticorps spécifiques d'une espèce peut être réalisée. En effet, un certain nombre d'anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre les *E. bienewisi*, *E. cuniculi*, *E. hellem* et *E. intestinalis* ont été développés. Ces anticorps sont pour la plupart dirigés contre la paroi ou le tube polaire des microsporidies (Ghosh and Weiss, 2009; Mo and Drancourt, 2004).

Afin d'identifier l'espèce, l'amplification par PCR des gènes codant l'ARNr 16S est utilisée, les amplicons étant ensuite séquencés (Fedorko et al., 1995; Ghosh and Weiss, 2009; Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996). Il existe également des amorces spécifiques à certaines espèces et d'autres plus génériques permettant de détecter les microsporidies (Ghosh and Weiss, 2009).

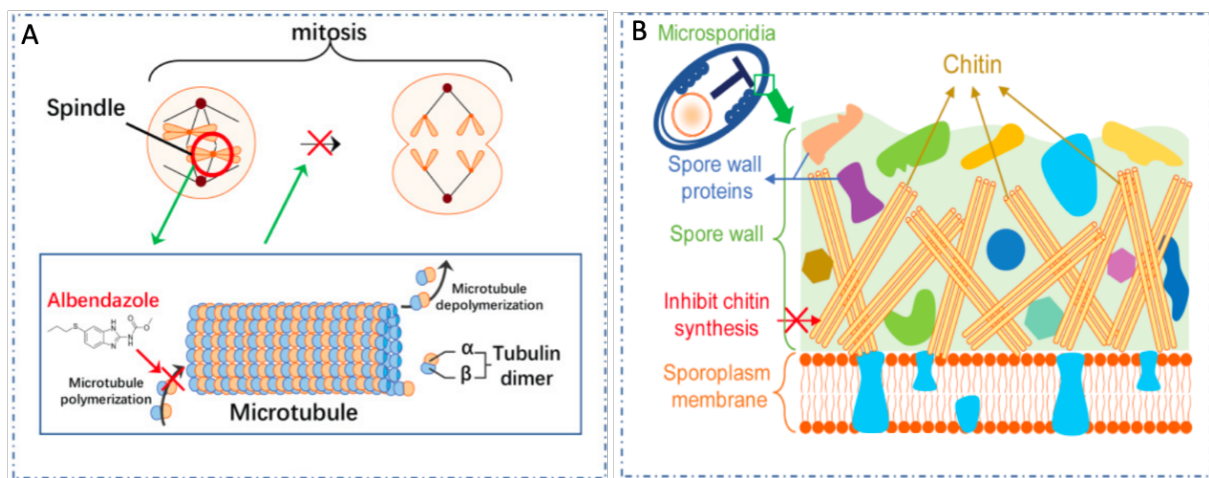


Figure 7 : Représentation schématique de cibles thérapeutiques de microsporidies et leurs modes d'actions. (A) L'abendazole inhibe la polymérisation des tubulines empêchant la formation de microtubules bloquant la formation de fuseaux intranucléaires au cours de la mitose. **(B)** Inhibiteurs de chitinase comme la nikkomycine et la polyoxine qui sont des analogues du substrat de la synthèse de la chitine, l'UDP-N-acétylglucosamine, provoquant des dommages cellulaires chez la spore. (D'après Han et Weiss, 2018).

II.4.2. Traitements

Les microsporidies, infectant l'Homme notamment, sont devenus des pathogènes émergents importants, en raison notamment de l'augmentation de l'utilisation d'agents immunomodulateurs dans le traitement de certaines maladies. Ces pathogènes provoquent cependant des infections aussi bien chez des individus immunocompétents et immunodéficients (Han and Weiss, 2018). Il existe à ce jour, principalement, deux molécules utilisées contre les microsporidioses : l'albendazole ciblant les microtubules et la fumagilline agissant sur la méthionine aminopeptidase de type 2 (MetAP2).

- L'albendazole :

Les microtubules sont caractéristiques des cellules eucaryotes et jouent un rôle critique notamment dans la formation des fuseaux mitotiques et du cytosquelette (Han and Weiss, 2018). Les microtubules sont formés par la polymérisation de tubulines, une protéine dimérique composée d' α -tubuline et de β -tubuline (Katiyar et al., 1994). Les benzimidazoles sont des composés organiques aromatiques, inhibiteurs de la polymérisation des microtubules en se liant aux tubulines et en perturbant l'association des sous-unités de tubuline (Davidse, 1986; Lacey, 1990) (**Figure 7A**). Dans la famille des benzimidazoles, on retrouve notamment l'albendazole, le cambendazole ou encore le fenbendazole. Ces composés possèdent diverses propriétés biologiques dont des propriétés anti-fongique, anti-cancéreuse, anti-helminthique et anti-virale (Tunçbilek et al., 2009; Zhou et al., 2016). Les benzimidazoles font également partis des molécules les plus utilisées contre les microsporidioses. Les benzimidazoles agissent en bloquant la formation de fuseaux intra-nucléaires, seul site connu de formation de microtubules chez les microsporidies, empêchant par conséquent la ségrégation des chromosomes et la division ultérieure du cytoplasme (Costa and Weiss, 2000; Han and Weiss, 2018). L'analyse des séquences de β -tubulines de microsporidies a mis en évidence des résidus d'acides aminés, responsables de la sensibilité aux benzimidazoles et présents chez de nombreuses microsporidies notamment les Encephalitozoonidae et *A. algerae*. Cependant, d'autres microsporidies comme *E. bienewisi* et *V. corneae* ont des séquences de β -tubuline avec des résidus associés à des résistances aux benzimidazoles, rendant ces microsporidies insensibles à l'albendazole (Han and Weiss, 2018).

- La fumagilline :

La fumagilline est utilisée pour le traitement contre les microsporidioses notamment chez le saumon et les abeilles infectées par *Loma salmonae* et *Nosema apis* respectivement. La fumagilline s'est avérée efficace pour le traitement des infections gastro-intestinales provoquées par *E. bienewisi* chez les patients atteints du SIDA et chez les patients ayant subi diverses transplantations d'organes. Cependant, la fumagilline peut causer une thrombocytopénie réversible chez l'Homme (Han et al., 2021). Les microsporidies, contrairement à la plupart des eucaryotes, ne possèdent que la méthionine aminopeptidase de type 2 (MetAP2) (Han et al., 2021), enzyme responsable de la maturation des protéines par clivage de la méthionine N-terminale (Hu et al., 2006). La fumagilline et ses analogues possèdent des activités *in vitro* et *in vivo* contre la famille d'*Encephalitozoonidae* et *Vittaforma corneae*, en se liant et en inhibant de manière irréversible la MetAP2 (Alvarado et al., 2009; Han et al., 2021). De plus, une étude a permis de mettre en évidence la structure cristalline de la MetAP2 d'*E. cuniculi* afin de fournir des données supplémentaires qui pourraient faciliter le développement d'inhibiteurs plus sélectifs de la MetAP2 pour le traitement des microsporidioses (Alvarado et al., 2009).

Plusieurs nouvelles approches thérapeutiques potentielles pour le traitement des microsporidioses ont été décrites notamment :

- Les polyamines synthétiques :

Les polyamines sont des composés organiques ubiquistes de faible poids moléculaire, lesquels agissent comme cofacteurs notamment dans la synthèse de petites molécules se liant entre autres à l'ADN et la chromatine, les rendant nécessaires à la division cellulaire (Bacchi et al., 2004; Nowotarski et al., 2013). Les ribosomes des microsporidies contiennent des polyamines (principalement de la spermine et spermidine) qui par leur liaison au ARNr, aident au maintien de la structure compacte des ribosomes (Han and Weiss, 2018). Une étude sur le métabolisme des polyamines au sein des spores d'*E. cuniculi* a montré que l'utilisation d'analogues de polyamines en tant que traitement contre les microsporidioses pourrait être envisagée (Bacchi et al., 2003).

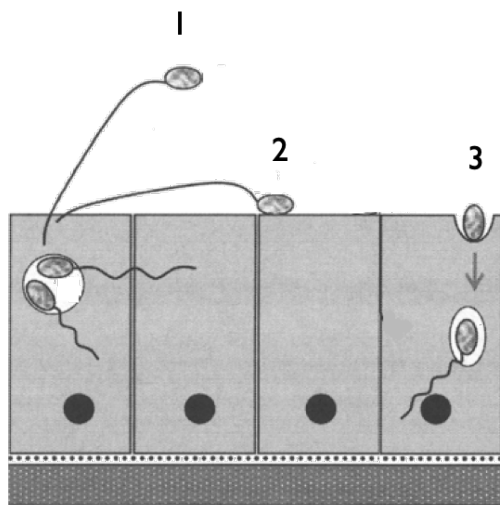


Figure 8 : Modèles hypothétiques d'invasion cellulaire par les microsporidies. (1) Le tube polaire extrudé perce la membrane de la cellule-hôte et injecte le sporoplasme dans la cellule. (2) Suite à l'adhésion de la spore à la membrane de la cellule-hôte, le tube polaire est extrudé, provoquant une phagocytose induite du sporoplasme dans l'hôte au sein d'une vacuole parasitophore. (3) La spore est directement phagocytée dans la cellule, et échappe à la digestion grâce à l'extrusion du tube polaire hors du phagosome (D'après Delbac et Polonais, 2008).

- Les inhibiteurs de la germination des spores :

Le processus de germination des spores dépend du calcium, pour cela, les inhibiteurs de la calmoduline (protéine capable de s'associer aux ions calciums) (trifluopérazine et chlorpromazine) et les antagonistes du calcium (vérapamil et lanthane) ont tous deux empêché la germination des spores de *Spraguea lophii* (Han et al., 2021; Pleshinger and Weidner, 1985). Il a été démontré que la nifédipine (antagoniste du calcium) inhibe la germination des spores d'*E. intestinalis* et *E. hellem* (Han et al., 2021).

- Les inhibiteurs de synthèse de chitine :

La chitine fait partie intégrante de la paroi de la spore et joue un rôle important dans le maintien de la structure cellulaire de la spore, au cours du processus d'infection et dans la survie de la spore dans le milieu extracellulaire (Bhat et al., 2009; Chioralia et al., 1997; Han and Weiss, 2018). La chitine est synthétisée par une chitine synthase associée à la membrane plasmique. Les inhibiteurs de synthèse de chitine les plus connus sont la nikkomycine et la polyoxine, qui sont des analogues du substrat de synthèse de la chitine (Free, 2013; Han and Weiss, 2018; Ruiz-Herrera and San-Blas, 2003) (**Figure 7B**). Des études ont montré que la nikkomycine inhibe la réplication *in vitro* d'*E. cuniculi* et *E. hellem* et peut induire des dommages cellulaires au niveau de la spore (Bigliardi and Sacchi, 2001; Han and Weiss, 2018; Sobottka et al., 2002). La polyoxine quant à elle, présente une inhibition plus importante que la nikkomycine contre la prolifération *in vitro* d'*E. hellem* (Han and Weiss, 2018; Sobottka et al., 2002).

III. Les mécanismes d'invasion des cellules par les microsporidies

Les microsporidies infectent les cellules grâce à un processus d'invasion unique et très spécialisé mettant en jeu la paroi de la spore, le tube polaire et le sporoplasme. L'infection par les microsporidies semble se produire de trois manières : (i) le tube polaire perce la membrane de la cellule-hôte et inocule le sporoplasme, (ii) la spore adhère à l'hôte et le tube extrudé va percer la cellule-hôte et (iii) la spore est phagocytée directement dans la cellule, et échappera à la digestion grâce à l'extrusion du tube polaire hors du phagosome (**Figure 8**) (Delbac and Polonais, 2008; Franzen, 2005).

Le processus du déploiement du tube est connu sous le nom de germination. De manière alternative, la spore peut être phagocytée par l'hôte suivi d'une germination intracellulaire causant l'infection.

L'événement de la germination résultant au transfert du sporoplasme infectieux au sein d'un hôte potentiel fait suite à une série d'événements complexes (Leitch et al., 1993; Leitch and Ceballos, 2008). Ces événements peuvent être chimiques et/ou physiques ayant une conséquence sur la perméabilité de la spore et résultant en l'éversion du tube polaire. Le sporoplasme transite ensuite à travers le tube polaire de la spore vers le cytoplasme de la cellule-hôte. Par conséquent, le sporoplasme du parasite peut entrer dans la cellule-hôte sans interaction avec la membrane plasmique de l'hôte et débiter son développement intracellulaire.

III.1. Activation de la spore et extrusion du tube polaire

Les facteurs nécessaires à la première activation déclenchant l'extrusion du tube polaire varient en fonction de l'organisme étudié. Une étude approfondie de l'environnement chimique dans lequel les spores d'*A. algerae* germent notamment chez leurs hôtes moustiques a démontré une corrélation entre les variations environnementales du tube digestif ainsi que la stimulation, l'activation et l'extrusion des spores dans l'intestin du moustique (Jaronski, 1979). Il a été conclu que les spores répondent à un ou plusieurs stimuli (pH, concentrations en ions, osmolarité, enzymes digestives et potentiel redox) et que les ions potassium et sodium sont des éléments majeurs dans la germination de la spore (Jaronski, 1979). Il a également été démontré que la germination des spores implique une variation dans la concentration en ions calcium accompagnée d'une variation de pH. En effet, des études menées sur la germination des spores d'*E. hellem*, ont établi que l'élimination d'ions calcium de la solution de germination entraîne une diminution du taux de germination des spores suggérant ainsi que la vacuole parasitophore au sein de laquelle *E. hellem* se développe, maintient une concentration en calcium relativement faible empêchant la germination des spores (Leitch et al., 1995). Il est donc avancé que lors de la mort cellulaire accompagnée de la rupture de la cellule, les niveaux en calcium augmentent drastiquement stimulant la germination. Cette variation de la concentration en calcium a également été étudiée au sein de la spore au cours de la germination. Chez *Spraguea lophii*, un influx d'ion calcium provenant notamment de la paroi de la spore a été mis en évidence (Cali and Takvorian, 2014; Pleshinger and Weidner, 1985).

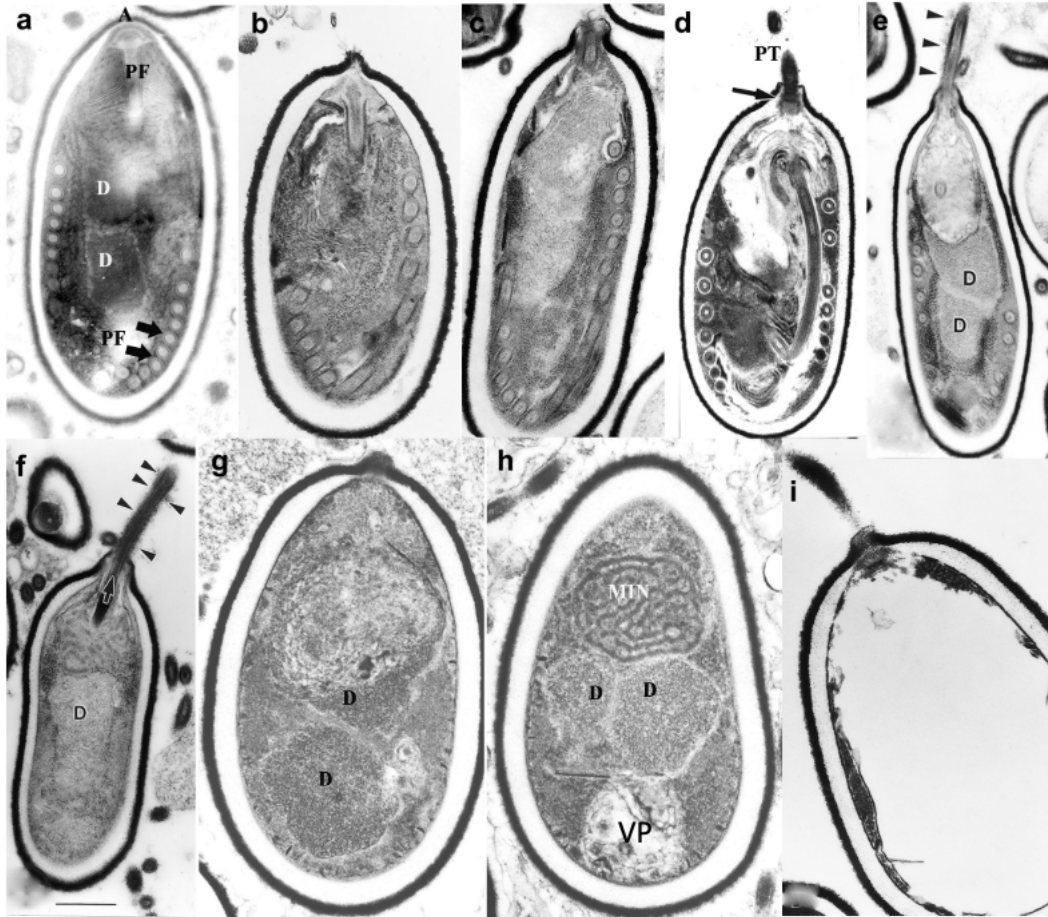


Figure 9 : Germination des spores microsporidiennes. Les spores d'*Anncaliia algerae*, incubées dans une solution de germination et préparées pour observation par microscopie électronique à transmission. Cette suite d'images illustre les événements qui ont lieu au cours du processus de germination. **(a)** Spore typique d'*A. algerae* composée d'un filament polaire (PF), disque d'ancrage (A), de deux noyaux (D); **(b)** épaissement de la paroi de la spore; **(c)** rupture de la paroi de la spore et expansion du polaroplaste; **(d)** éversion précoce et translocation du tube polaire (PT); **(e)** la majorité du tube polaire est extrudé, les structures nucléaires et cytoplasmiques sont toujours présente au sein de la spore; **(f)** le tube est complètement sorti de la spore mais le sporoplasme est toujours présent; **(g)** « canaux membranaires » de la spore visibles directement sous l'endospore; **(h)** vacuole postérieure (VP), diplocaryon (D), et le sporoplasme (MIN), les dernières structures quittant la spore; et **(i)** la spore vide avec le tube polaire toujours attaché (Cali et Takvorian, 2014).

Chez *A. algerae*, les ions monovalents (Na^+ , K^+) semblent initier une série d'évènements qui résultent en une augmentation de la pression hydrostatique intrasporale. L'activité de ces ions est augmentée en présence d'ion chlorure et un pH alcalin entre 8 et 10. L'influx de ces cations monovalents dans la spore est soupçonné de redistribuer le calcium à l'intérieur de la spore et déclencher son activation (Cali and Takvorian, 2014; Frixione et al., 1994). De plus, un lien a été établi entre le rôle de ces ions et la présence de tréhalase, clivant le tréhalose en glucose et en métabolites. L'augmentation très rapide de la concentration en solutés est donc supposée augmenter la pression hydrostatique intrasporale prodiguant la force nécessaire pour provoquer la germination et l'extrusion du tube polaire (Cali and Takvorian, 2014; Undeen and Vander Meer, 1994). Le flux d'eau à travers la bicouche lipidique étant limité, il a été démontré que les microsporidies possèdent des aquaporines (AQP) notamment par l'utilisation de sels de mercures, inhibiteurs de la germination des spores d'*A. algerae*, en bloquant les AQP. Ces canaux transmembranaires facilitent l'osmose et seraient un mécanisme permettant un apport rapide en eau dans la spore activée (Frixione et al., 1997; Yang et al., 2000). De plus, l'identification d'une séquence d'aquaporine-like dans le génome d'*E. cuniculi* (*EcAQP*) (Katinka et al., 2001) ainsi que le clonage et l'expression de cette séquence *EcAQP* dans des oocytes de *Xenopus laevis* les ont rendus complètement perméables à l'eau, démontrant donc l'existence de ces AQP chez les microsporidies (Cali and Takvorian, 2014; Ghosh et al., 2006).

L'effet du pH sur la germination de la spore à quant à lui était lié à l'amorçage de la germination des spores d'*Ameson michaelis*, parasite du crabe bleu, à pH 10 (Cali and Takvorian, 2014; Weidner, 1972), alors que *Glugea hertwigi*, parasite de poissons et *E. hellem* répondent à un pH de 9,0 (Cali and Takvorian, 2014; Leitch et al., 1995). D'autres organismes par exemple, *Vavraia culicis*, parasite de moustiques, requiert un pH neutre ou acide pour activer la germination de la spore (Cali and Takvorian, 2014; Undeen, 1983).

Une spore « activée » subit une suite de changements au niveau du contenu sporal et de la paroi au moment de l'extrusion du tube polaire (**Figure 9**). Le premier changement consiste en un renflement du pôle apical de la spore accompagné par un rétrécissement de l'endospore dans cette région. Le complexe d'attachement apical du tube polaire, les membranes associées et le tube polaire lui-même sont tous réorientés lors de l'activation de la spore.

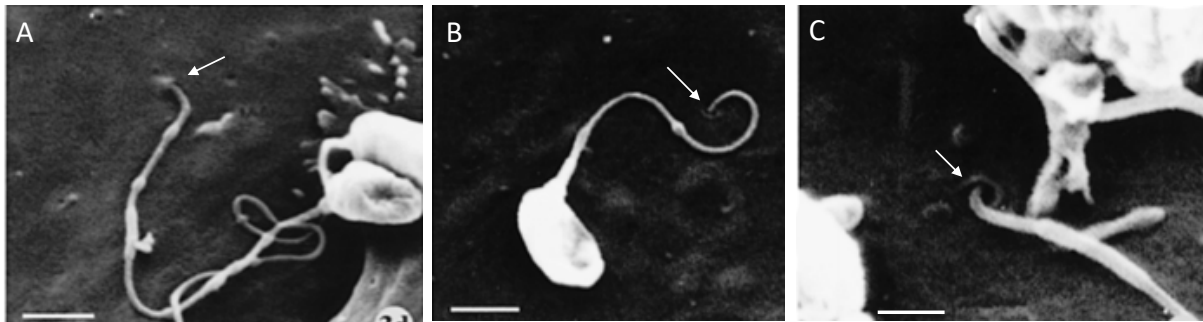


Figure 10 : Microscopie électronique à balayage de spores d'*Encephalitozoon intestinalis*. (A) Début du processus d'invagination (échelle = 1 μ m). **(B)** et **(C)** A la limite de la zone de contact du tube polaire avec la surface de la cellule-hôte, le gonflement de la membrane et le début du tunnel d'invagination ainsi que l'invagination du tube peuvent être vus (échelle B = 1 μ m et C= 0,5 μ m). (Adapté de Schottelius et al., 2000).

Au commencement de l'éversion du tube polaire, un certain nombre d'évènements ont lieu très rapidement : le pôle apical de la spore rompt, le tube polaire commence à émerger et le polaroplaste lamellaire se gonfle et comble pratiquement les deux tiers de la spore.

Le tube polaire est une structure très intrigante et source d'attention depuis de nombreuses années. En effet, bien que la description du tube polaire et du processus de germination date d'une centaine d'années (Thélohan, 1894), le mécanisme de pénétration du tube polaire dans la cellule-hôte n'est toujours pas entièrement compris. Le tube polaire est très étroit environ 0,1 μm à 0,2 μm de diamètre, et est extrudé avec une force considérable. Le tube polaire extrudé peut mesurer entre 50 μm et 500 μm , potentiellement 100 fois la taille d'une spore. L'extrémité du tube polaire peut se déplacer dans le milieu de culture à une vitesse excédant 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ (Frixione et al., 1992). Le sporoplasme passe à travers le tube polaire très rapidement se retrouvant à l'extrémité du tube après seulement 15 à 500 ms (Frixione et al., 1992). La membrane du sporoplasme est laissée dans la spore vide (Franzen, 2004; Weidner et al., 1984) mais le sporoplasme injecté est enveloppé dans une nouvelle membrane dérivée du polaroplaste (Franzen, 2004; Weidner et al., 1994). Immédiatement après l'extrusion du tube polaire, le sporoplasme est connecté à l'extrémité du tube, mais après, quelques secondes, il se détache de celui-ci (Franzen, 2004; Weidner, 1972).

III.2. Invasion de la cellule

L'hypothèse qui prévalait était que le tube polaire était capable de percer la membrane plasmique de l'hôte telle une aiguille, injectant le sporoplasme dans le cytoplasme de l'hôte. Cependant, des études récentes ont démontré que le tube polaire pénètre les cellules grâce à un processus phagocytaire (Franzen, 2005; Schottelius et al., 2000). La phagocytose du tube polaire est notamment observable sur des clichés de microscopie électronique à transmission pour les espèces d'*Encephalitozoon* (**Figure 10**). De plus, Bigliardi et ses collaborateurs ont observé des évènements similaires avec *E. hellem* dans des fibroblastes pulmonaires bovins où les tubes polaires dévagent leur contenu dans les cellules-hôtes (Bigliardi and Sacchi, 2001). Une autre méthode d'entrée possible notamment par *E. intestinalis*, a été proposée par Foucault et Drancourt dans des cellules et implique : (i) une interaction spécifique entre le pôle postérieur de la spore et la membrane de la cellule (ii) l'extrusion du tube polaire (iii) suivi d'une phagocytose induite du sporoplasme au sein d'une vacuole (Couzinet et al., 2000; Foucault and Drancourt, 2000; Franzen, 2005; Franzen et al., 2005). Le mécanisme d'entrée par phagocytose

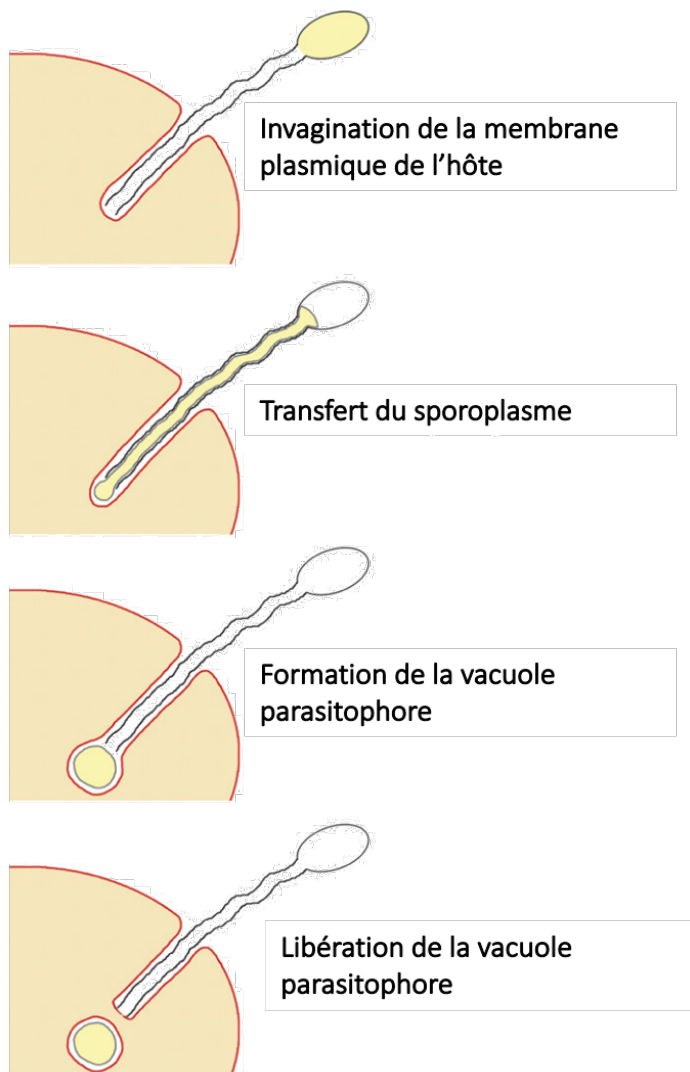


Figure 11 : Modèle d'invagination lors de l'invasion d'*Encephalitozoon cuniculi*. Contrairement au modèle conventionnel d'invasion des microsporidies, la membrane plasmique de la cellule-hôte n'est pas percée par les microsporidies mais forme une vacuole parasitophore (D'après Bohne et al., 2011).

a été inhibé par l'utilisation de cytochalasine D suggérant que le processus phagocytaire des spores est actine dépendante. Suite à cette pénétration, les phagosomes contenant les spores subissent une maturation en lysosomes (Couzinet et al., 2000), qui vont rapidement digérer les spores. Certaines spores peuvent cependant échapper à la digestion et infecter le cytoplasme d'une cellule voisine suite à la germination du tube polaire. Tous ces procédés d'invasion restent des modèles hypothétiques et demeurent délicats à valider expérimentalement en raison de la difficulté à différencier un tube polaire extrudé dans une cellule, d'une cellule endocytant une spore dévaginée (Couzinet et al., 2000; Foucault and Drancourt, 2000; Franzen, 2005; Franzen et al., 2005).

La plupart des espèces microsporidiennes se développent directement dans le cytoplasme des cellules-hôtes sans barrières particulières. Cependant, certaines espèces notamment du genre *Encephalitozoon* se développent au sein d'un compartiment délimité par une membrane, connue sous le nom de vacuole parasitophore (VP) (Bohne et al., 2011). Des études de l'ultrastructure de foyers infectieux ont montré que les stades précoces de développement d'*Encephalitozoon* spp. sont entourés d'une membrane adhérente, la VP, et qu'elle aurait pour origine la membrane plasmique de la cellule, invaginée suite à l'extrusion du tube polaire (Foucault and Drancourt, 2000; Franzen, 2005). Cette hypothèse insinue alors que le mode d'invasion cellulaire d'*Encephalitozoon* spp. serait différent des autres espèces de microsporidies (Franzen, 2005). L'origine de la VP chez *E. cuniculi* a été étudiée grâce à des sondes lipidiques fluorescentes, lesquelles s'intègrent dans la bicouche lipidique de la cellule et les phospholipides de la membrane plasmique de l'hôte (Rönnebäumer et al., 2008). L'incorporation de ces sondes lipidiques fluorescentes a permis de démontrer que les phospholipides de la VP en formation proviennent de la cellule-hôte et ne sont donc pas d'origine parasitaire (Bohne et al., 2011; Rönnebäumer et al., 2008; Scanlon et al., 2004).

Curieusement, les images obtenues par microscopie ont révélé que peu de temps avant la formation de la VP, une invagination de la membrane plasmique de l'hôte est visible au point de contact du tube polaire ((Rönnebäumer et al., 2008). Cette invagination a lieu dans la première seconde après la germination de la spore et reste stable quelques secondes, même après la formation de la VP. En se basant sur la cinétique d'invagination de la membrane plasmique et par conséquent, la formation de la vacuole parasitophore, Bohne *et al.*, ont proposé un mode d'invasion alternatif pour *E. cuniculi* (**Figure 11**). Selon ce modèle d'invagination, l'extrémité du tube polaire ne perce pas la membrane plasmique de l'hôte, mais

vient repousser la membrane à l'intérieur de la cellule formant donc une invagination en forme de canal. Une fois le sporoplasme relargué au sein de cette invagination, une partie de la membrane va se détacher pour former la VP (Bohne et al., 2011).

III.3. Caractérisation de la vacuole parasitophore

Les pathogènes intracellulaires se multipliant dans des vacuoles parasitophores ont développé des stratégies sophistiquées pour éviter la digestion lysosomale. Un aspect important du devenir de la VP concerne sa localisation exacte au sein du réseau vésiculaire de la cellule-hôte. De nombreux pathogènes réussissent à interférer avec les capacités de fusion de leur vacuole (Bohne et al., 2011; Hackstadt, 2000). En effet, la VP d'*E. cuniculi* ne possède pas les marqueurs cellulaires de la voie endocytaire et du réticulum endoplasmique tout au long du cycle de développement intracellulaire (Bohne et al., 2011; Fasshauer et al., 2005). De plus, le récepteur de la transferrine comme marqueurs d'endosome notamment est également absent de la VP (Fasshauer et al., 2005). Ces caractéristiques sont très similaires à la VP de *Toxoplasma gondii*, qui, par l'absence de marqueurs protéiques de la membrane plasmique de l'hôte, échappe à la digestion lysosomale (Bohne et al., 2011).

Cette vacuole parasitophore forme l'interface entre le pathogène et la cellule-hôte et est cruciale pour toute interaction, en particulier pour les transports membranaires et les échanges de métabolites. En effet, il n'est pas inhabituel pour les microorganismes occupant une niche intracellulaire au sein d'une vacuole de restructurer de nombreux organites autour de cette vacuole (Scanlon et al., 2004). Il a été démontré que la paroi de VP chez les microsporidies est étroitement liée aux mitochondries de l'hôte (Scanlon et al., 2004), un phénomène également observable chez *Toxoplasma gondii* (Hackstadt, 2000). Les protéines VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) aussi connues comme des porines mitochondriales sont principalement exprimées dans la membrane mitochondriale externe. Au cours de l'infection avec *E. cuniculi*, les VDAC localisées aux points de contact entre la VP et les mitochondries de l'hôte ont été démontrées comme étant impliquées dans le piégeage d'ATP directement à partir de l'hôte (Hacker et al., 2014; Han et al., 2019). Seules les espèces du genre *Encephalitozoon* se développent à l'intérieur d'une vacuole parasitophore.

III.4. Impact de l'invasion chez l'hôte

Le parasitisme est un type d'interaction biologique entre des organismes d'espèces différentes dans lequel le parasite profite aux dépens de l'hôte. Les cellules-hôtes ont développé des mécanismes de défense pour résister à l'invasion et la réplication des pathogènes. La réponse naturelle d'une cellule infectée est de déclencher notamment son apoptose afin d'empêcher la multiplication et la dissémination du parasite (Martín-Hernández et al., 2018; Nelson et al., 2008). Réciproquement, l'envahisseur doit trouver une façon d'y échapper pour pouvoir se reproduire (James and Green, 2004; Martín-Hernández et al., 2018). Certains parasites intracellulaires sont capables de reprogrammer leurs hôtes pour créer une niche favorable, en se servant de la machinerie cellulaire pour acquérir les ressources nécessaires (Gupta, 2005; Martín-Hernández et al., 2018). La mise en œuvre de ces mécanismes de défense et la capacité des agents pathogènes à atténuer leur effet sur l'hôte sont finalement médiées par des changements dans les niveaux et les activités des protéines clés.

Une étude a montré que les microsporidies sont capables de manipuler le métabolisme de l'hôte pour progresser tout au long du cycle de développement, non seulement en modifiant l'expression des gènes apoptotiques, mais aussi d'autres voies importantes impliquées dans le cycle cellulaire de l'hôte (Martín-Hernández et al., 2018). En effet, lors de cette étude, une expression génique quantitative a été réalisée ainsi que des observations cytologiques pour déterminer comment *Nosema apis* et *Nosema ceranae*, parasites d'abeilles, manipulent leur hôte au niveau moléculaire (Martín-Hernández et al., 2018). Des coupes de tissus d'abeilles non infectées traitées avec le cycloheximide, un puissant inducteur intrinsèque de l'apoptose, ont montré un niveau d'apoptose plus important que sur des abeilles infectées par les microsporidies. Cette étude démontre que les microsporidies inhibent clairement l'apoptose induite par le cycloheximide, réaction également observée chez des macrophages infectés par *Leishmania donovani* (Donovan et al., 2009; Martín-Hernández et al., 2018). Cette inhibition de l'apoptose est cohérente avec les modifications observées lors de l'étude de l'expression de gènes liés à l'apoptose. L'infection avec ces deux espèces de microsporidies augmente l'expression de deux gènes (*buffy* et *BIRC5*) ayant des fonctions importantes dans la programmation de la mort cellulaire. Par conséquent, chez les abeilles mellifères, la surexpression de ces gènes est associée à une réduction du nombre de cellules qui entrent en apoptose dans les tissus infectés (Martín-Hernández et al., 2018).

L'infection par les microsporidies peut également impacter le métabolisme de l'hôte. Les abeilles infectées par ce parasite démontrent des niveaux de consommation en sucrose plus élevé comparé à des abeilles non infectées (Mayack and Naug, 2009). De plus, les crevettes infectées par *Enterocytozoon hepatopenaei* ont des niveaux plus faibles de certains métabolites notamment les carbohydrates, les lipides et les nucléotides (Ning et al., 2019). Les vers à soie infectés par *N. bombycis* ont des niveaux d'ATP et de protéines plus faibles, en revanche, le niveau de nombreux lipides n'est pas impacté (Li et al., 2018). De nombreuses voies métaboliques ont aussi été démontrées comme étant transcriptionnellement régulées à la hausse (comme les gènes impliqués dans la réplication de l'ADN ou le métabolisme des carbohydrates) suite à une infection par les microsporidies et ce, chez de nombreux hôtes notamment les abeilles, les vers à soie, les crabes, les moustiques et les mammifères (Desjardins et al., 2015; Ding et al., 2018; Holt et al., 2013; Ma et al., 2013; Pan et al., 2018; Tamim El Jarkass and Reinke, 2020; Watson et al., 2015).

IV. Identification de protéines impliquées dans l'adhésion chez les microsporidies

IV.1. Protéines de surface (SWP) et sécrétées

L'interaction entre les microsporidies et leurs cellules-hôtes est fortement influencée par la paroi de la spore, principalement par les protéines qui la composent. Il est donc nécessaire de comprendre la formation de cette paroi et la fonction des protéines qui la constituent.

La paroi microsporidienne est formée de trois couches : l'exospore, dense aux électrons et riche en protéines, l'endospore, claires aux électrons et une membrane plasmique sous-jacente (Han et al., 2020; Vávra and Larsson, 2014). Cette paroi maintient la structure de la spore et protège l'organisme des conditions environnementales (Han et al., 2020; Shaddock and Polley, 1978). Il a été démontré que la paroi contient de la chitine ainsi que des protéines (Spore Wall Protein, SWP) (Vávra and Larsson, 2014). En plus de protéger la spore de l'environnement, les composants de la paroi interagissent également avec l'environnement et l'hôte et sont impliqués dans le processus d'activation de la germination du tube polaire (Yang et al., 2018). Les SWP localisés au niveau de l'exospore sont en contact direct avec la cellule-hôte et l'environnement et peuvent être impliqués dans le processus de liaisons aux cellules. Selon plusieurs études portant sur la composition de la paroi de la spore, de nombreuses SWP sont

**Tableau 2 : Protéines de la paroi des spores identifiées chez les microsporidies.
(D'après Han et al., 2020).**

Espèces	Protéines	Localisation subcellulaire	Domaines	Poids moléculaire (kDa)	Acides aminés / ID GenBank	Références
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	EcSWP1 ^a	Exospore	-	45,9	450 aa ECU10_1660	Bohne et al., 2000
	EcEnP1 ^b	Endospore	HBM ^c	40,6	357 aa ECU01_0820	Peuvel-Fanget et al., 2006
	EcEnP2/EcSWP3	Endospore	Transmembranaire	22,5	221 aa ECU01_1270	Peuvel-Fanget et al., 2006 ; Xu et al., 2006
	EcCDA ^d	Endospore et membrane plasmique	Glycoside hydrolase et déacétylase	28,1	254 aa ECU11_0510	Brosson et al., 2005
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	EISWP1	Exospore	-	41,5	388 aa AF355750.1	Hayman et al., 2001
	EISWP2	Exospore	-	107,2	1002 aa AF355749.1	Hayman et al., 2001
	EiEnP1	Exospore, endospore	HBM	39,1	348 aa EF539266	Southern et al., 2007
<i>Encephalitozoon hellem</i>	EhSWP1a	Exospore	-	54,9	509 aa FJ870923	Polonais et al., 2010
	EhSWP1b	Exospore	-	57,9	533 aa FJ870924	Polonais et al., 2010
<i>Nosema bombycis</i>	NbSWP5	Endospore et tube polaire	-	20,3	186 aa EF683105	Li et al., 2012
	NbSWP7	Exospore et endospore	-	32,8	287 aa EOB13707.1	Yang et al., 2015
	NbSWP9	Exospore, endospore et tube polaire	Hélice transmembranaire (TMHMM)	42,8	367 aa EOB13793.1	Yang et al., 2015
	NbSWP11	Exospore et endospore	Domaine DnaJ	52,3	446 aa EF683111	Yang et al., 2014
	NbSWP12	Exospore et endospore	Domaine BAR-2	26,6	228 aa EF683112	Chen et al., 2013
	NbSWP16	Exospore	HBM	44,0	221 aa EOB14338	Wang et al., 2015
	NbSWP25	Endospore	HBM	30,7	268 aa EF683102	Wu et al., 2009
	NbSWP26	Exospore, endospore et membrane plasmique	HBM	25,7	223 aa EU677842	Li et al. 2009
	NbSWP30	Endospore	-	32,1	278 aa EF683101	Wu et al., 2008
	NbSWP32	Exospore	-	37,4	316 aa EF683103	Wu et al., 2008
	EOB14572	Endospore et tube polaire	4 répétitions en tandem	37,0	316 aa NBO_24g0018	Wang et al., 2017
<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i>	EhSWP1	Exospore et endospore	HBM, BAR-2	27,0	228 aa MG015710	Jaroenlak et al. 2018
<i>Antonospora locustae</i>	AlocSWP2	Exospore et endospore	GPI ^e , HBM	25,0	222 aa KX255658	Chen et al., 2017

^aEcSWP1: Protéine de la paroi ; ^bEcEnP1: Protéine de l'endospore ; ^cHBM: Motifs de liaison à l'héparine ; ^dEcCDA: Chitine déacétylase ; ^eGPI: Glycosylphosphatidylinositol

présentes à la fois au niveau de l'exospore et de l'endospore (**Tableau 2**) (Han et al., 2020). L'identification de ces SWP a tout d'abord été effectuée pour le genre *Encephalitozoon* avec notamment *E. cuniculi* (Ec), *E. hellem* (Eh) et *E. intestinalis* (Ei) pouvant infecter l'Homme et d'autres hôtes mammifères, et *N. bombycis* (Nb), parasite du ver à soie (Yang et al., 2018). De nombreuses SWP ont été identifiées dans le genre *Encephalitozoon* dont EcSWP1, EiSWP2, EhSWP1a et EhSWP1b localisées au niveau de l'exospore et EcEnP1, EiEnP1, EcEnP2, EcSWP3 et EcCDA retrouvées dans l'endospore (Bohne et al., 2000; Brosseau et al., 2005; Hayman et al., 2001; Peuvél-Fanget et al., 2006; Southern et al., 2007; Xu et al., 2006).

Les homologues de ces SWP ont été retrouvés chez la plupart des membres du genre *Encephalitozoon* mais aussi chez d'autres espèces de microsporidies grâce à la disponibilité des données génomiques (Weiss et al., 2014). On retrouve notamment la SWP2 d'*Antonospora locustae* (AlocSWP2) et la SWP1 d'*Enterocytozoon hepatopenaei* (EHSWP1) (Chen et al., 2017; Han et al., 2020; Jaroenlak et al., 2018).

Les microsporidies du genre *Encephalitozoon*, particulièrement *E. cuniculi* et *E. intestinalis*, adhèrent à la surface des cellules-hôtes *in vitro*, étape préalable à l'infection des cellules-hôtes (Hayman et al., 2005; Southern et al., 2006). Plusieurs protéines parasitaires seraient impliquées dans ce processus. Cependant, une seule protéine, EnP1, a été montrée comme jouant un rôle dans l'adhésion (Southern et al., 2007). EnP1 est une protéine d'environ 41 kDa, riche en cystéine et supposée être impliquée dans l'assemblage de la paroi sporale par des ponts disulfures (Peuvél-Fanget et al., 2006). EnP1 ne serait pas limitée seulement à l'endospore mais est également trouvée au niveau du disque d'ancrage et à la surface de l'exospore d'*E. intestinalis* et *E. cuniculi* (**Figure 12**) (Southern et al., 2007). De plus, EnP1 a été démontrée comme étant un ligand permettant l'adhésion de la spore aux cellules-hôtes. En effet, EnP1 contient un motif de liaison à l'héparine et l'utilisation d'une protéine EnP1 recombinante d'*E. cuniculi* est capable de bloquer l'adhésion des spores aux cellules-hôtes *in vitro*. L'élimination du motif de liaison à l'héparine élimine toute adhésion, démontrant donc l'importance de ce motif connu pour être responsable d'interaction protéines-glycanes (Southern et al., 2007).

Des analyses protéomiques chez *N. bombycis* ont permis d'identifier quatorze protéines hypothétiques de la paroi (Wu et al., 2008). L'observation par microscopie électronique de ces SWPs a permis de montrer que NbSWP5, NbSWP16 et NbSWP32 sont localisées au niveau de l'exospore et que NbSWP25, NbSWP30 et EOB14572 sont retrouvées dans l'endospore (Li et

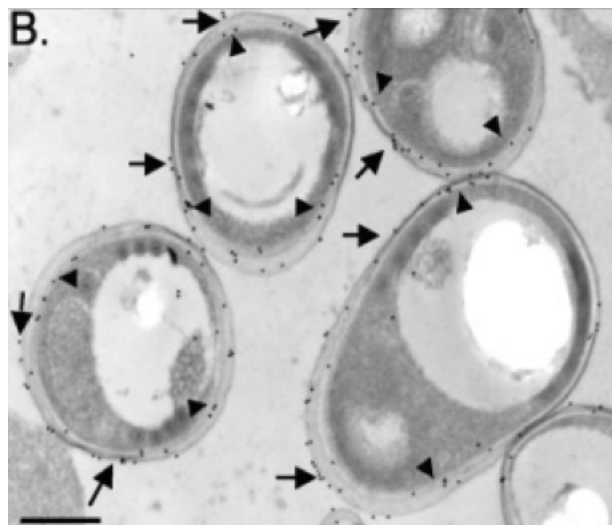


Figure 12 : Mise en évidence d'EnP1 par immunomicroscopie électronique sur des spores d'*Encephalitozoon cuniculi*. Flèche = exospore ; pointes de flèches = endospore. Échelle : 500 nm (Southern et al., 2007)

al., 2009, 2012; Wang et al., 2017, 2015; Wu et al., 2009). NbSWP7 et NbSWP9 sont présents à la fois dans la paroi et dans le tube polaire (Yang et al., 2017, 2015). NbSWP12 est localisé à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la paroi (Chen et al., 2013). NbSWP26 est largement exprimée au sein de l'endospore et peu distribuée au niveau de l'exospore de spores matures (Li et al., 2009). En revanche, seule NbSWP16 a été démontré comme ayant un rôle dans l'adhésion de la spore. En effet, l'utilisation de l'anticorps anti-NbSWP16 diminue d'au moins 20% l'adhésion des spores aux cellules-hôtes (Wang et al., 2015).

L'adhésion des spores de microsporidies peut être médiée par divers types d'interaction. En effet, une étude a démontré que les intégrines à la surface des cellules sont impliquées dans les processus d'adhésion et d'infection d'*E. intestinalis* (Leonard and Hayman, 2017). L'analyse du génome d'*E. intestinalis* a démontré que de nombreuses protéines hypothétiques ont été prédites comme possédant une séquence RGD (arginine- glycine- acide aspartique), motif de liaison impliqué dans l'interaction des protéines de la matrice extracellulaire avec les intégrines de l'hôte. Chez *N. bombycis*, il a été montré que NbSWP26 peut interagir avec la protéine « turtle-like » (BmTLP) du ver à soie *B. mori* (Zhu et al., 2013). La BmTLP est une protéine de la superfamille des immunoglobulines (IgSF). Les membres d'IgSF incluent notamment des molécules impliquées dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes des vertébrés, des molécules co-stimulatrices du système immunitaire et des récepteurs de cytokines (Zhu et al., 2013). Cette interaction entre NbSWP26 et les BmTLP suggèrent qu'elles peuvent agir comme un récepteur facilitant l'infection des cellules du ver à soie (Zhu et al., 2013). Ainsi, plusieurs SWPs pouvant interagir avec les cellules-hôtes en se liant à des motifs de liaison à l'héparine (HBM) et aux GAGs sulfatés à la surface de la cellule-hôte ont été identifiés chez *N. bombycis*, les espèces d'*Encephalitozoon* et *A. locustae* (**Tableau 2**) (Han et al., 2020). De plus, l'utilisation de glycanes sulfatés exogènes notamment l'héparine, les chondroïtines sulfates A et C, la mucine et le dextrane sulfate en tant que compétiteurs, montre que la microsporidie *E. intestinalis* se lie à des GAGs à la surface des cellules-hôtes (Hayman et al., 2005). Une étude plus récente (Roussel et al., 2015) a évalué le potentiel anti-microsporidien de biopolymères sulfatés naturels produits par des macro et micro-algues. Ces polysaccharides sulfatés testés dont ceux produits par *Porphyridium marinum*, ont montré une activité anti-microsporidienne *in vitro* contre *E. cuniculi*. Ils ont permis également de réduire de manière significative la charge parasitaire et d'améliorer la survie des abeilles infectées par *N. ceranae*. Les polysaccharides sulfatés seraient donc des candidats potentiels pour inhiber

l'adhésion des spores microsporidiennes aux cellules-hôtes et par conséquent limiter l'infection des cellules (Roussel et al., 2015).

Chez quelques espèces microsporidiennes comme *S. lophii* et *N. bombycis*, des protéines contenant un domaine Ricin-B Lectin (RBL) ont été identifiées et leur implication dans les processus d'infection a été suggérée ou démontrée (Campbell et al., 2013; Liu et al., 2016). La ricine est une lectine formée d'une chaîne A et une chaîne B liée par un pont disulfure (Cummings and Schnaar, 2017). La chaîne B est une lectine qui se lie aux cellules par l'interaction avec des glycolipides et glycoprotéines, en particulier avec les galactoses par liaison β ou des glycanes composées de *N*-acétylgalactosamine retrouvés à la surface des cellules (Olsnes, 2004; Sandvig, 2000). Le rôle de NbRBL dans les processus d'adhésion et d'infection a été démontré suite à l'incubation des anticorps anti-NbRBL avec les spores de *N. bombycis* et les cellules-hôtes. Les résultats ont montré une diminution significative de l'infectivité des spores associée à une diminution de l'adhésion des spores aux cellules-hôtes (Liu et al., 2016).

Les lectines sont des protéines biologiquement actives isolées de plantes, de micro-organismes ou encore de l'Homme. Leur capacité à se lier spécifiquement à différents types de carbohydrates, ainsi que leur présence ubiquitaire suggèrent leur importance dans de nombreux processus cellulaires tels que l'apoptose, la prolifération et l'adhésion aux cellules (Varki et al., 2009). Par exemple, la bactérie *Bordetella pertussis*, responsable de maladies infectieuses respiratoires hautement contagieuses, possède une hémagglutinine filamenteuse favorisant une forte adhésion de la bactérie aux cellules-hôtes (Prasad et al., 1993; Romero et al., 2014; Tuomanen et al., 1988). L'attachement des mérozoïtes de *P. falciparum* aux érythrocytes, conduisant à l'invasion, est médié par une adhésine du parasite connue sous le nom d'EBA-175 (Esko and Sharon, 2009; Tham et al., 2012). En ce qui concerne les virus, le virus de l'influenza possède également une hémagglutinine impliquée dans la liaison aux acides sialiques à la surface des cellules. L'endocytose est un pré-requis pour la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale suivie de l'entrée du virus dans la cellule (Esko and Sharon, 2009; Rogers and Paulson, 1983; Thompson et al., 2020).

IV.2. Protéines du tube polaire (PTP)

Toutes les microsporidies possèdent un appareil d'invasion unique et très spécialisé composé d'un tube polaire, qui s'embobine à l'intérieur de la spore et se connecte au disque d'ancrage

Tableau 3 : Protéines du tube polaire PTP1 à PTP5 chez les microsporidies (d'après Han et al., 2020).

Espèces	PTP1	PTP2	PTP3	PTP4	PTP5
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	395 aa ECU06_0250	277 aa ECU06_0240	1256 aa ECU11_1440	276 aa ECU07_1090	251 aa ECU7_1080
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	371 aa Eint_060150	275 aa Eint_060140	1256 aa Eint_111330	279 aa Eint_071050	252 aa Eint_071040
<i>Encephalitozoon hellem</i>	453 aa 413 (EhATCC) EH06_060170	272 aa EH06_060160	1284 aa EH06_111330	278 aa EH06_071080	251 aa EH06_071070
<i>Encephalitozoon romalae</i>	380 aa EROM_060160	274 aa EROM_060150	1254 aa EROM_111330	280 aa EROM_071050	251 aa EROM_071040
<i>Antonosporea locustae</i>	355 aa ORF1050*	287 aa ORF1048* 568 aa (PTP2b) ORF1712* 599 aa (PTP2c) ORF1329*	Séquence partielle	381 aa ORF969*	242 aa ORF968*
<i>Paranosema grylli</i>	351 aa	287 aa	Séquence partielle	381 aa	Séquence partielle
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	nd	283 aa EBI_26400	1219 aa EBI_22552	nd	nd
<i>Trachipleistophora hominis</i>	nd	291 aa THOM_1756	1518 aa THOM_1479	Séquence partielle THOM_1575	259 aa THOM_1161
<i>Nosema ceranae</i>	456 aa NCER_101591	275 aa NCER_101590	1414 aa NCER_100083	208 aa NCER_100526	268 aa NCER_100527
<i>Nosema bombycis</i> **	409 aa NBO_7g0016	277 aa AEK69415	1370 aa AEF33802	222 aa ACJZ01000169 (3927-4595)	271 aa ACJZ01002324 (213-1028)
<i>Anncalia algerae</i>	407 aa KIOABA33YN06FM1	3 séquences partielles	1203 aa KIOAPB23YG12FM1	254 aa KIOANB26YM04FM1	240 aa KIOAGA10AA09FM1
<i>Vittaforma cornae</i>	nd	293 aa VICG_01748	Séquence partielle VICG_01948	254 aa VICG_01195	204 aa VICG_01807
<i>Vavraia culicis floridensis</i>	nd	291 aa VCUG_00650	1864 aa VCUG_02017	372 aa VCUG_02471	356 aa VCUG_02366
<i>Edhazardia aedis</i>	nd	307 aa EDEG_00335	1447 aa EDEG_03869 1284 aa EDEG_03429	465 aa EDEG_03857	252 aa EDEG_03856
<i>Nosema parisii</i>	nd	251 aa NEQG_02488	1177 aa NEQG_00122	nd	nd
<i>Octosporea bayeri</i>	nd	nd	Séquence partielle ACSZ010190	Séquence partielle ACSZ01005588	212 aa ACSZ01000826

nd, non déterminé, probablement due à l'importante divergence de séquence ou d'un assemblage de séquence incomplète. Pour PTP1, il existe également des différences dans le nombre d'acides aminés selon les souches d'*E. cuniculi* et *E. hellem* (Peuvel et al., 2000). **A. locustae* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_007674295.1/. ***Nosema bombycis* (les séquences annotées de *Nosema bombycis* and *Nosema antheraeae* ont été déposés dans Genbank avec les numéros d'accèsion suivant : ACJZ01000001- ACJZ01003558). *O. bayeri* du Broad Institute (<https://microsporidiadb.org/micro/>; <https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/microsporidia-genome-sequencing>).

au pôle antérieur de la spore (Han et al., 2020; Takvorian and Cali, 1986; Vávra and Larsson, 2014). Lors d'une stimulation environnementale appropriée, le tube polaire est rapidement extrudé de la spore and joue le rôle de conduit pour le passage du sporoplasme au sein de la cellule (Frixione et al., 1992; Han et al., 2020). Des études menées sur la composition du tube polaire ont abouti à l'identification de 5 protéines du tube polaire (PTP) distinctes (Weiss et al., 2014). Ces études ont été réalisées sur de nombreuses espèces d'*Encephalitozoon* mais les données génomiques indiquent que ces 5 PTPs sont également retrouvées chez *A. locustae*, *T. hominis* et *A. algerae* (**Tableau 3**). Dans le but d'effectuer des analyses protéomiques, des préparations enrichies en protéines du tube polaire ont été produites par l'utilisation de différentes concentrations de 2-mercaptoéthanol (2-ME) ou de dithiothreitol (DTT) (Han et al., 2020; Keohane et al., 1996). Par cette approche, la protéine du tube polaire 1 (PTP1) a été isolée pour la première fois grâce à un prétraitement d'une solution de spores avec du SDS, de l'urée et des billes de verres afin d'éliminer la plupart des protéines, une solution de DTT a ensuite été utilisée pour solubiliser les protéines du tube. Ceci a été suivi d'une purification supplémentaire des PTPs solubilisées par le DTT par l'utilisation de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Han et al., 2020; Keohane et al., 1996). PTP1 est une protéine de 37 kDa, riche en proline et en cystéine, lui conférant sa haute résistance à la traction et son élasticité. Ces propriétés jouent probablement un rôle dans l'extrusion du tube polaire et le passage du sporoplasme (Delbac et al., 2001; Keohane et al., 1998, 1996). PTP1 possède un site putatif d'attachement aux GAGs aux positions 313-316 facilitant la liaison du tube polaire à la surface de l'hôte au cours de l'infection (Bouzahzah et al., 2010; Bouzahzah and Weiss, 2010; Han et al., 2020; Xu et al., 2004, 2003). De façon intéressante, PTP1 s'est avérée être assez divergente chez les microsporidies, en particulier la région centrale répétitive qui diffère significativement entre les espèces d'*Encephalitozoon* (Han et al., 2020). Les régions N et C terminales sont plus conservées et en particulier la composition en cystéine, confirmant donc la capacité du DTT et d'autres agents réducteurs à solubiliser le tube polaire (Han et al., 2020). Quatre autres protéines du tube polaire (PTP2 à PTP5) ont été identifiées et caractérisées grâce notamment à des approches de protéomique. Cependant, les données protéomiques démontrent qu'il existerait d'autres protéines constitutives du tube polaire (Bouzahzah et al., 2010; Han et al., 2017, 2020; Peuvel et al., 2002; Weiss et al., 2014). PTP2 est une protéine, riche en lysine, de 30 kDa possédant un motif RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) connu pour être impliqué dans les interactions protéine-protéine (Delbac et al., 2001).

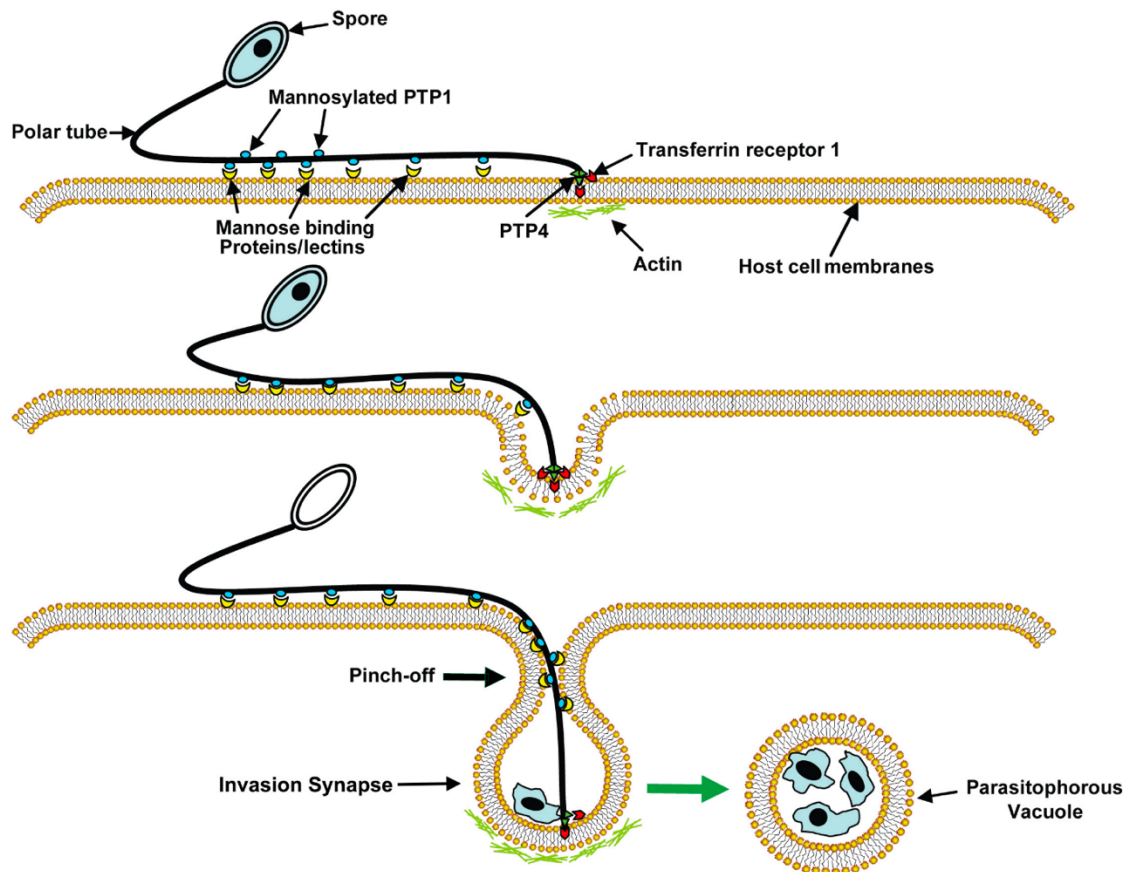


Figure 13 : Modèle d'invasion de microsporidie. La protéine du tube polaire 1 (PTP1) interagit avec les protéines liant le mannose (MBPs) à la surface de l'hôte en permettant l'adhésion du tube polaire (TP) à la surface de l'hôte. Cette liaison permet au tube polaire de former une synapse d'invasion en poussant dans la membrane de l'hôte. Les interactions de PTP1 (et éventuellement PTP4) avec la membrane de l'hôte au sein de la synapse d'invasion forment un microenvironnement protégeant le sporoplasme extrudé. Les épitopes de la protéine du tube polaire 4 (PTP4) à l'extrémité du tube polaire interagissent avec le récepteur de la transferrine 1 (TfR1) ou d'autres protéines localisées à la surface de la cellule-hôte, déclenchant des événements de signalisation tels que l'endocytose médiée par la clathrine et l'implication de l'actine de l'hôte lors de la formation de la vacuole parasitophore. (D'après Han et al., 2017).

Il est important de noter que PTP2 est localisée sur le même locus chromosomique que PTP1. La protéine PTP2 est quant à elle plus conservée chez les autres espèces de microsporidies notamment au niveau de son poids moléculaire, son point isoélectrique basique, sa composition importante en résidus lysine et cystéine, et ce, en comparaison avec la conservation de PTP1 (Delbac et al., 2001). PTP3 est une protéine de plus grande taille (135 kDa) et est solubilisée en présence de SDS sans l'ajout d'agents réducteurs, ce qui indique que cette protéine ne présente pas de ponts disulfures. Il a également été suggéré que la PTP3 serait une protéine d'échafaudage qui jouerait un rôle important dans la formation du tube polaire par interaction avec d'autres PTP (Bouzahzah et al., 2010; Peuvel et al., 2002). Lorsque des agents de cross-linking sont utilisés, un complexe formé de PTP1, PTP2 et PTP3 est obtenu, indiquant que ces protéines interagissent bien ensemble (Bouzahzah et al., 2010; Han et al., 2020; Peuvel et al., 2002). Similairement au positionnement de PTP1 et PTP2 sur le même locus chromosomique, les gènes PTP4 et PTP5 sont également regroupés au sein de nombreux génomes de microsporidies (Weiss et al., 2014). Han et collaborateurs ont identifié le récepteur protéique de PTP4 comme étant la glycoprotéine, transferrine 1 (TfR1). Il a été démontré que PTP4 interagit avec TfR1 au sein de la synapse d'invasion et que la perturbation de l'association de PTP4 et TfR1 diminue la capacité d'*E. hellem* d'envahir son hôte mammifère (**Figure 13**) (Han et al., 2017). Lorsque le sporoplasme est présent à l'extrémité du tube polaire, il est pensé que les PTP sont capables d'interagir avec les protéines du sporoplasme au cours du processus d'invasion. Ce concept est soutenu par la récente identification de la protéine du sporoplasme SSP1 chez *E. hellem* où son interaction avec la PTP4 a été démontrée (Han et al., 2019).

L'ensemble de ces données montre l'importance des protéines présentes à l'interface entre le parasite et l'hôte, notamment en ce qui concerne l'adhésion. Ce processus chez les microsporidies requiert de nombreuses protéines qui interviennent dans l'adhésion soit du tube polaire, soit de la surface de la spore. Néanmoins, les différentes études ont montré que l'adhésion de ces structures est médiée par différents acteurs moléculaires et ne sont pas à ce jour tous identifiés. Il est ainsi nécessaire de rechercher les autres protéines microsporidiennes pouvant intervenir dans ce processus d'adhésion, ce qui constitue le premier objectif de cette thèse.

Pour décrypter les processus d'adhésion entre un hôte et son parasite, il est souvent nécessaire d'utiliser des composés capables de réduire voir d'inhiber l'adhésion des parasites. Parmi les composés ayant ce type d'activité, les glycanes ont été utilisés pour bloquer l'adhésion de

nombreux pathogènes. En effet, ces glycanes exogènes peuvent mimer des structures qui sont présentes à la surface soit du parasite, soit de l'hôte et ainsi bloquer l'adhésion par compétition.

V. Utilisation de glycanes comme agents bloquant l'invasion

De nombreuses études ont suggéré que les polysaccharides d'origine microbienne notamment, possèdent des propriétés anti-infectieuses en bloquant l'adhésion des pathogènes. Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de rédiger un chapitre du livre « Handbook of Microalgae-Based Processes and Products ». Ce livre fournit un aperçu de tous les aspects liés à la production à l'utilisation et à la commercialisation des microalgues. Le chapitre auquel j'ai participé « Bioactive polysaccharides from microalgae » décrit notamment les activités anti-virales, anti-bactériennes et anti-fongiques des polysaccharides. Les paragraphes suivants sont issus de ce chapitre.

V.1. Activité antivirale d'exopolysaccharides (EPS)

Les infections virales sont un problème mondial menaçant la santé humaine et animale. Depuis quelques années maintenant, de nombreuses maladies virales sont apparues ou commencent à réapparaître principalement en raison notamment d'une augmentation de la résistance aux médicaments et de l'évolution des virus. La nature de l'agent viral rend la recherche d'agents antiviraux particulièrement difficile. En effet, ces formes de vie simple dépendent entièrement du système métabolique et de l'énergie de la cellule-hôte. Ainsi, les antiviraux doivent donc d'une part inhiber le virus dans la cellule-hôte et d'autre part n'avoir aucun impact sur le métabolisme de l'hôte. De nombreux antiviraux provoquent de nombreux effets secondaires (Poole and Kimberlin, 2017), rendant la recherche et découverte de nouveaux composés thérapeutiques, essentielle. Les polysaccharides (PS) sont des macromolécules naturelles qui participent à de nombreux processus biologiques notamment l'adhésion cellulaire, la communication cellulaire, la réponse immunitaire et aux infections par les bactéries, parasites et virus (Dwek, 1995). Les études sur l'effet antiviral de polysaccharides marins sont de plus en plus nombreuses, car ils possèdent une toxicité très faible et agissent probablement par un mécanisme en plusieurs étapes, ce qui implique une pression de sélection plus faible pour l'émergence de souches résistantes (Damonte et al., 2012; Witvrouw and De Clercq, 1997; Yu et al., 2018). En général, les PS agissent avec le même mécanisme pour des

virus enveloppés. Des interactions ioniques entre les groupes anioniques du PS et les acides aminés basiques des glycoprotéines forment un complexe, empêchant l'adsorption virale (Raposo et al., 2014).

Le naviculane par exemple a été isolé de la diatomée *Navicula directa*. Ce PS sulfaté possède un large spectre antiviral contre les virus enveloppés tels que les virus de l'herpès simplex de type 1 et 2 (HSV), le virus de l'influenza et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Lee et al., 2006). Il est connu que les infections par les HSV ou le virus de la grippe débutent par leur liaison aux carbohydrates comme l'héparane sulfate ou les résidus sialylés retrouvés à la surface des cellules-hôtes. Le naviculane interfère avec les stades précoces de la réplication virale tels que la liaison virale et la pénétration dans la cellule-hôte. Le naviculane interfère également au niveau de la fusion cellulaire entre la glycoprotéine 160 du VIH et la glycoprotéine CD4 exprimée à la surface des lymphocytes T CD4+ (Lee et al., 2006). *Arthrospora platensis* produit un PS sulfaté, le calcium de spirulane, qui a démontré son activité antivirale (Hayashi et al., 1996; Lee et al., 2001). Ce PS inhibe la réplication de nombreux virus enveloppés comme le virus herpès simplex (HSV) de type 1, le cytomégalovirus humain, le virus de la rougeole, des oreillons ou encore le VIH, et ce, en inhibant la pénétration des virus dans les cellules-hôtes (Hayashi et al., 1996; Reichert et al., 2017).

Une autre étude a exploré l'activité de l'exopolysaccharide (EPS) issu de l'algue *Porphyridium purpureum* et de *A. platensis* sur le virus de la vaccine (variole de la vache). Il a été démontré que ces PS inhibent la liaison des virus aux cellules. Un effet antiviral plus important a été observé lorsque le traitement antiviral ainsi que l'infection ont lieu en même temps (Radonić et al., 2010). L'utilisation d'un PS sulfaté issu d'espèces de *Porphyridium* montre une activité virale importante contre le HSV de type 1 et 2 ainsi que le virus responsable de la varicelle (VZV) (Huheihel et al., 2002). Cette étude montre que l'EPS de *Porphyridium* empêche le déroulement de certaines étapes du cycle de vie de HSV. Une forte interaction entre les particules HSV-1 et le PS est probablement responsable de l'inhibition significative de l'infection virale. Cette étude suggère également que l'EPS de *Porphyridium* a un mode d'action pléiotropique au cours du cycle d'infection du HSV et probablement du VZV. Une autre étude montre que les EPS issus de microalgues rouges d'espèces de *Porphyridium* comme *Porphyridium aeruginum*, et *Rhodella reticulata* exhibent une activité antivirale contre la réplication et la transformation maligne de deux rétrovirus : le virus du Sarcome Murin (Moloney) et le virus de la leucémie murine (Talyshinsky et al., 2002). Un traitement avec les EPS avant ou au moment de l'infection, donne

lieu à une activité inhibitrice plus importante. Une partie de l'effet inhibiteur des EPS vient de la capacité à bloquer certains récepteurs viraux, et donc interférer avec la pénétration du virus dans l'hôte. Cependant, la réversibilité de l'inhibition suggère que l'activité antivirale a lieu à un certain moment après l'intégration provirale. L'EPS des espèces de *Porphyridium* semble également posséder un mode d'action pléiotropique tout au long du cycle d'infection du virus du Sarcome Murin. De plus, un traitement avec des molécules possédant un effet pléiotropique est moins susceptible d'entraîner le développement de mutants résistants (Huheihel et al., 2002; Talyshinsky et al., 2002).

V.2. Activité antibactérienne d'EPS

Le potentiel des EPS en tant agents antibactériens a été mis en évidence suite à un criblage à grande échelle de microalgues marines. Le mécanisme antibactérien des EPS reste incertain, mais peut impliquer des interactions avec la paroi cellulaire bactérienne et la membrane cytoplasmique, conduisant à une augmentation de la perméabilité de la membrane, à la perte de protéines et à la liaison avec l'ADN bactérien (dos Santos Amorim et al., 2012; He et al., 2010; Pierre et al., 2011). L'affinité de certaines espèces bactériennes pour les glycoconjugués sulfatés à la surface des cellules-hôtes évoque l'action potentielle des EPS sulfatés des microalgues comme agents bloquant l'adhésion (Höök, 1984; Ofek et al., 1978). La réalité n'est, cependant pas si évidente, comme cela a pu être observé avec certains EPS sulfatés d'espèces appartenant aux genres *Tetraselmis*, de *Neochloris oleobundans* et *Phaeodactylum tricornutum* où leur utilisation a permis d'inhiber de 50% l'attachement d'*Helicobacter pylori* aux cellules HeLa, alors que des EPS d'autres espèces de microalgues, notamment *Chlorella capsulata* ou des espèces de *Isochrysis* ont une action opposée sur l'adhésion (Guzman-Murillo and Ascencio, 2000). Cette action opposée des EPS sulfatés indique que d'autres facteurs tels que la structure et la composition peuvent jouer un rôle important dans l'activité anti-bactérienne. Les espèces du genre *Porphyridium* ont été étudiées intensément pour la production d'EPS sulfatés (Arad and Levy-Ontman, 2010). Il a été démontré qu'un galactane sulfaté, obtenu à partir d'une souche israélienne de *P. cruentum*, inhibait nettement la croissance de *Salmonella enteritidis*, avec une réduction de 81%, tandis que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* étaient moins sensibles à ce PS (Raposo et al., 2014). Ces différentes activités pourraient être attribuées à la structure et à la composition de la paroi cellulaire bactérienne, à l'absence d'une

structure unique dans les bactéries ou aux modifications potentielles induites par les bactéries au niveau de la structure chimique des PS (Michael et al., 2002).

L'activité biologique des EPS sur les infections bactériennes est très documentée notamment pour ceux issus de macroalgues comme le fucoïdane et la laminarine. En effet, ces molécules ont démontré jouer un rôle important dans l'inhibition de la croissance de *S. aureus* et d'*E. coli* ou pour empêcher l'adhésion du biofilm de *H. pylori* dans la muqueuse gastrique (Shannon and Abu-Ghannam, 2016). En revanche, l'activité antibactérienne d'EPS issu de microalgues ou de cyanobactéries a été moins explorée.

V.3. Activités antifongiques d'EPS

La quantité limitée de molécules antifongiques associée à leur forte toxicité et l'émergence de mécanismes de résistance poussent les chercheurs à trouver de nouvelles molécules plus fiables (Scorzoni et al., 2017). Les espèces de *Tetraselmis* sont connues pour produire un PS soluble dans l'eau. Ces molécules ont montré des activités antifongiques de par leur capacité à diminuer la croissance de *Candida albicans* et *Penicillium italicum*, deux champignons impliqués respectivement dans des maladies humaines et végétales (Amna Kashif et al., 2018). En effet, la croissance de *C. albicans* a été diminuée de 70 à 80%. Les activités antifongiques d'EPS ont aussi été démontrées chez les microsporidies. Le potentiel de onze EPS sulfatés, dont certains, provenant de microalgues a été testé afin d'évaluer leur activité antimicrosporidienne. Deux PS, issus de *Porphyridium* ont montré une activité antiparasitaire d'environ 95% *in vitro* sur le développement d'*E. cuniculi* (Roussel et al., 2015). Le traitement d'abeilles infectées par *N. ceranae* avec l'EPS de *P. marinum* a permis de réduire la mortalité et la charge parasitaire d'environ 34 % lors d'expérience en laboratoire (Roussel et al., 2015). Ces résultats suggèrent donc que les polysaccharides sulfatés issus de microalgues pourraient être utilisés comme traitement contre les microsporidioses et nécessitent d'étudier de manière plus approfondie comment ces PS pourraient agir sur les microsporidies, ce qui a constitué le 2^{ème} objectif de cette thèse.

VI. Objectifs de la thèse

Malgré le nombre d'études se consacrant à l'identification de protéines impliquées dans le processus d'adhésion des microsporidies à leurs cellules-hôtes, seules quelques protéines

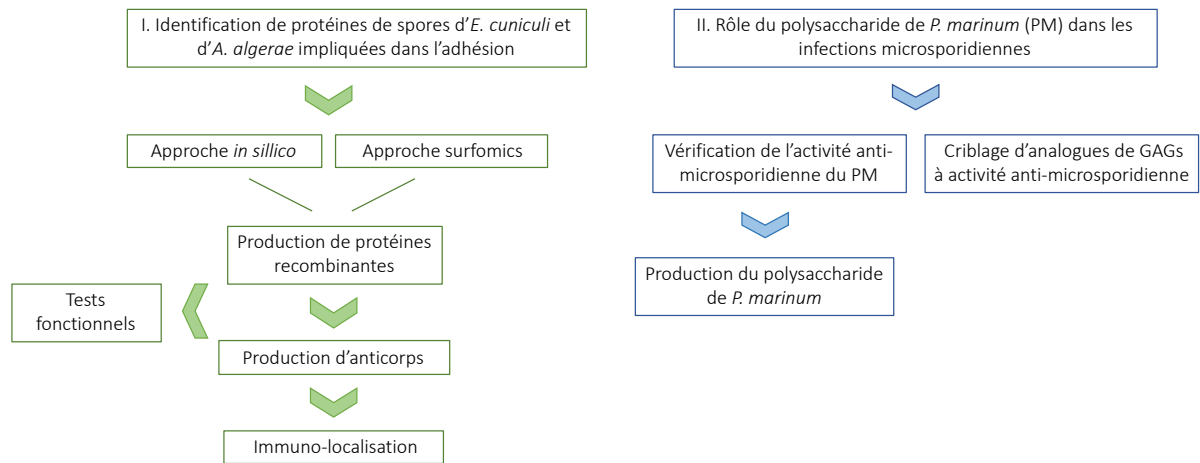


Figure 14 : Design expérimental de la thèse.

parasitaires ont montré leur implication comme jouant un rôle dans l'adhésion aux cellules-hôtes (Han et al., 2020, 2017; Southern et al., 2007). Cependant, les essais d'inhibition effectués n'ont pas permis de bloquer complètement l'adhésion et par conséquent l'infection des cellules (Southern et al., 2007), ce qui laisse penser que d'autres acteurs moléculaires sont impliqués, dont la recherche a constitué le 1^{er} objectif de ma thèse (**Figure 14**). En effet, le but premier de cette thèse a été d'identifier et de caractériser des protéines de surface et du tube polaire de spores microsporidiennes impliquées dans l'adhésion aux cellules-hôtes. Pour cela, deux approches ont été envisagées : une approche « surfomics » et une approche *in silico*. L'approche surfomics a eu pour objectif la purification des protéines de surfaces de la spore et leur caractérisation par une analyse en spectrométrie de masse. Pour cela, différentes approches méthodologiques, incluant la biotinylation des protéines de surfaces et le décapage des spores par voies chimique ou enzymatique, ont été mises en œuvre. En complément à l'étude de surfomics, une approche *in silico*, via l'utilisation d'outils bio-informatiques, a été menée dans le but d'identifier des candidats potentiels de surface sur la base de la prédiction de critères tels que la présence d'un peptide signal, de domaines de liaisons aux glycanes, et une localisation extracellulaire. Ces deux approches ont abouti à la sélection de protéines candidates, à partir desquelles des tests fonctionnels devaient permettre d'établir leur rôle dans le processus d'adhésion/infection. Préalablement à ces tests, il était nécessaire de valider par des approches d'immunolocalisation la localisation à la surface des spores des protéines sélectionnées. Dans ce but, la production de protéines recombinantes et l'obtention d'anticorps spécifiques de ces protéines constituaient un pré-requis nécessaire à notre étude. Enfin, le rôle potentiel de ces protéines dans les processus d'infection a été étudié avec la mise en place de tests fonctionnels quantitatifs de l'infection. Cette approche fonctionnelle a eu pour objectif d'identifier et de quantifier l'effet neutralisant que pouvaient avoir les anticorps et les protéines recombinantes lors d'expérimentations d'infection.

Les expérimentations liées à ce premier objectif ont été réalisées sur deux modèles d'études : *E. cuniculi* et *A. algerae*. Ces modèles d'études ont été choisis, car leur culture est maîtrisée, leur génome sont disponibles et enfin, car il existe des données expérimentales sur chacune des espèces notamment concernant la mise en évidence de protéines de paroi ou du tube polaire ou encore leurs implications dans les processus d'infection. Les microsporidies du genre *Encephalitozoon* sont des parasites des vertébrés dont trois espèces sont souvent détectées chez l'Homme : *E. intestinalis*, *E. cuniculi* et *E. hellem* (Bohne et al., 2011). *E. cuniculi* fut la

première microsporidie dont le génome a été complètement séquencé, la rendant un modèle d'étude intéressante (Katinka et al., 2001). *E. cuniculi* possède une taille de génome extrêmement réduite. La séquence du génome prédit environ 2000 gènes codant des protéines (Katinka et al., 2001; Keeling and Slamovits, 2004) et une taille de génome de 2,9 Mb, plus petit que de nombreux génomes bactériens. Les cultures d'*E. cuniculi* peuvent se faire sur des fibroblastes comme des HFF (fibroblastes de prépuces humains), des MRC-5 (fibroblastes embryonnaires humains) ou encore des RK13 (cellules épithéliales de rein de lapin). Ces types cellulaires peuvent être utilisés pour récolter les spores et pour effectuer des expériences telles que des tests d'invasion. La culture d'*E. cuniculi* dans ces lignées cellulaires a permis notamment l'étude de leur cycle de vie, leur métabolisme et leur pathogénicité (Han et al., 2018). Des anticorps totaux anti-*E. cuniculi* sont disponibles permettant ainsi la réalisation d'expérimentations de type ELISA ou d'immunofluorescences, de plus des sondes spécifiques se liant aux ARN ribosomiques sont accessibles permettant ainsi de faire des marquages par hybridation *in situ* par fluorescence (FISH).

Anncaliia algerae, d'abord connu sous le nom de *Nosema algerae* puis *Brachiola algerae* avant d'être ajouté au genre *Anncaliia* (Franzen et al., 2006; Vavra and Undeen, 1970) a d'abord été décrite dans une colonie de moustiques *Anopheles stephensi* de laboratoire (Vavra and Undeen, 1970). Cette microsporidie appartient au clade *Anncaliia-Tubulinosema* qui regroupe des espèces possédant une large gamme d'hôtes au sein des arthropodes dont certains tolèrent de fortes températures, la plupart du temps critique pour les microsporidies (Sokolova et al., 2019). De plus, cette microsporidie possède la capacité de se développer dans plusieurs types cellulaires notamment dans les fibroblastes humains, les cellules de reins de lapins (RK13) et les cellules HeLa (lignée cellulaire cancéreuse). Le génome d'*A. algerae* est quant à lui estimé à 23 Mbp (Peyretailade et al., 2011). Un anticorps ciblant la paroi et le tube polaire est disponible permettant de réaliser des marquages fluorescents. De plus, *A. algerae* est doté de la machinerie d'ARN interférence, rendant possible la pratique de génomique fonctionnelle (Huang, 2018).

Les glycanes étant impliqués dans les processus d'adhésion, le 2^{ème} objectif de ma thèse a été d'initier une étude visant à comprendre l'efficacité d'un polysaccharide microalgal contre des infections microsporidiennes. En effet, au cours du projet SUPOBEE financé par l'Agence Nationale de la Recherche et effectué au sein du laboratoire (ANR-12-EMMA-0030), le potentiel anti-microsporidien notamment d'un hétéroxylane issu de *P. marinum* a été

démonstré par la diminution de la croissance *in vitro* d'*E. cuniculi*, et également une diminution de la mortalité et de la charge parasitaire chez les abeilles infectées par *N. ceranae* (Roussel et al., 2015). Afin de mieux comprendre le mode d'action du polysaccharide de *P. marinum* (PM), un couplage fluorescent du PM a été réalisé pour identifier son interaction potentielle avec les cellules-hôtes et/ou les spores d'*E. cuniculi*. Nous avons ensuite réalisé une production de polysaccharides en photobioréacteur afin d'en avoir en quantité suffisante pour les expérimentations envisagées, notamment dans l'optique de récupérer les interactants du polysaccharide de *P. marinum*. En parallèle, un criblage d'analogues de glycosaminoglycanes (GAGs) a été effectué pour bloquer l'adhésion des microsporidies à leurs cellules-hôtes et ainsi fournir d'autres polysaccharides actifs, nous permettant d'envisager des combinaisons de molécules qui peuvent s'avérer plus efficaces dans l'inhibition de l'adhésion et de l'infection. Ce criblage a été réalisé sur *N. ceranae*, parasite de l'abeille domestique. Cette microsporidie a tout d'abord été décrite chez l'abeille asiatique *Apis cerana* et fait désormais partie des agents pathogènes les plus retrouvés chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. Ces microsporidies altèrent l'épithélium intestinal de l'abeille provoquant la nosérose et sont en partie responsables de l'effondrement des colonies (Higes et al., 2013, 2010). Le génome de *N. ceranae* est quant à lui estimé à 8,8 Mbp (Huang et al., 2021). Les cultures de cellules d'abeilles ne sont toutefois pas encore disponibles et le cycle de *N. ceranae* ne peut se réaliser sur d'autres types cellulaires, les expérimentations doivent donc se faire sur des abeilles infectées au laboratoire. L'avantage de ce modèle repose également sur la présence de la machinerie d'ARN interférence (Huang, 2018).

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Identification de protéines de surface de spores d'*E. cuniculi* et *A. algerae*

I.1. Approche *in silico*

I.1.1. Analyses bio-informatiques

La recherche et l'identification de protéines de surfaces ont été entreprises par une approche *in silico*, basée sur le criblage des bases des données protéiques locales et en ligne d'*E. cuniculi* et d'*A. algerae*, et sur l'utilisation d'outils de prédiction de motifs d'adressage cellulaire et de domaines fonctionnels d'interaction. La sélection de protéines avec une localisation potentielle à la surface de la cellule s'est appuyée sur la présence d'un site de clivage prédit (SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)) et/ou la localisation extracellulaire (WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp>)). La prédiction de motifs protéiques (domaines de liaison aux carbohydrates notamment) a été réalisée par l'utilisation du logiciel ExPaSy qui regroupe des outils de prédiction tels qu'Interpro (<http://www.expasy.org/tools/>). La prédiction de structures secondaires et tertiaires des protéines, associées à de la modélisation tridimensionnelle, des protéines sélectionnées a été réalisée avec le logiciel Phyre2 disponible en ligne (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) et l'outil Ezmol (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/>). Ces outils permettaient également d'acquérir des informations/données de fonction.

Afin d'élargir et de compléter l'approche *in silico*, la base de données microsporidiadB (<https://microsporidiadb.org/micro/>) a été exploitée afin de rechercher chez *E. cuniculi* et *A. algerae* des orthologues à des protéines de surfaces, impliquées dans l'adhésion, déjà décrites dans la littérature (Yang et al., 2018; Zhao et al., 2015). Les protéines orthologues identifiées ont été soumises aux mêmes types d'analyses bioinformatiques (logiciels de prédiction) que celles décrites précédemment.

I.2. Approche surfomics

I.2.1. Entretien des cellules-hôtes et des parasites

Des cellules fibroblastiques de prépuce humain (HFF – ATCC SCRC-1041), des fibroblastes embryonnaires humains (MRC-5 Line- ATCC CCL-171) et des cellules de reins de lapin (RK13 – ATCC CCL-37) ont été cultivés dans du milieu minimum essentiel Eagle (MEM, Invitrogen) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen) ; 2 mM de glutamine (Gibco), 2,5 µg.mL⁻¹ d'amphotéricine B (Dutscher), 100 µg.mL⁻¹ de kanamycine (Pan Biotech), 25 µg mL⁻¹ de gentamicine (Gibco) à 37°C, sous atmosphère à 5% de CO₂.

Les spores d'*E. cuniculi* sont maintenues sur des cellules de reins de chien (MDCK- ATCC CCL-34) et les spores d'*A. algerae* sur des cellules de reins de lapins (RK13) dans du milieu MEM supplémenté comme décrit précédemment.

Une fois les cellules à confluence, elles ont été infectées par 5 x 10⁵ spores d'*E. cuniculi* ou d'*A. algerae* dans des flasques 75 cm². Les spores ont été collectées à partir du milieu de culture puis des cycles de lavages dans de l'eau ont été réalisés afin d'éliminer les cellules-hôtes. Les spores sont ensuite conservées dans du tampon phosphate salin (PBS) à 4°C puis comptées sur cellules de Kova avant expérimentation.

I.2.2. Purification / enrichissement des spores

I.2.2.1. Purification sur gradient de Percoll

Une purification des spores a été réalisée sur gradient de Percoll à partir des surnageants de culture pour les deux espèces de microsporidies. Le gradient de Percoll permet de séparer en fonction de leurs densités les différents stades de développement des parasites, soit les mérontes, les sporontes et particulièrement les spores, des cellules-hôtes et débris associés.

Pour *E. cuniculi*, la purification de gradient de Percoll a été précédée d'une filtration sur membrane afin d'éliminer les plus gros débris cellulaires et d'optimiser la séparation par Percoll. Suite à un lavage en PBS 1X, les surnageants de culture ont été soumis à une filtration successive sur des membranes de porosité décroissante, soit 100 µm, 20 µm, 10 µm et 3 µm.

Afin de créer un gradient, des solutions de Percoll 100%, 75%, 50% et 25% diluées dans du PBS 1X ont été préparées. Chaque solution a ensuite été déposée délicatement au fond d'un tube en partant de la solution la plus concentrée. Enfin, la suspension parasitaire provenant de surnageants de culture, a été déposée délicatement au-dessus de la solution de Percoll 25%.

La suspension de spores a ensuite été centrifugée 15 min à 8000 x *g*. La fraction contenant les spores a été récupérée et soumise à trois lavages au PBS 1X afin d'éliminer le Percoll.

I.2.2.2. Purification des spores d'*E. cuniculi* par ultra-centrifugation dans un gradient de sucrose-Percoll

Ce protocole a été adapté de celui de Taupin *et al.*, 2006. Une solution de Percoll 70% dans 0,23 M de sucrose a été réalisée. Puis une suspension parasitaire obtenue à partir de surnageants de culture d'*E. cuniculi* a été déposée à la surface de la solution de séparation. Les gradients ont ensuite été centrifugés à 15 900 rpm pendant 30 min dans un Rotor SW40 Ti Beckman, Swinging Rotor à 4°C. Chaque fraction a été récupérée puis lavée 3 fois dans du PBS 1X afin d'éliminer la solution de séparation.

I.2.2.3. Vérification de la qualité de la purification des surnageants de culture

Afin de déterminer le niveau et la qualité de la purification des spores, les culots obtenus ont été analysés par hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), immunofluorescences et microscopie électronique permettant de mettre en évidence les différents stades de développement des parasites. Les frottis de spores purifiées ont été fixés en paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 min à 4°C pour les marquages FISH et en immunofluorescence. Pour diminuer le bruit de fond induit par le PFA 4%, les spores purifiées ont été incubées avec de la glycine 0,1M pendant 5 min à température ambiante (TA). Après chaque marquage, les échantillons ont été contre-colorés au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) à 100 µg.mL⁻¹ pendant 5 min à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été déposées sur des lames avec 3 µL de liquide montage Prolong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen) puis observées selon les approches décrites ci-dessous.

I.2.2.3.1 Marquage des parasites par hybridation *in situ* par fluorescence

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) permet de mettre en évidence les stades de développement du parasite les plus précoces. En effet, les sondes utilisées ne peuvent pas pénétrer la paroi des spores marquant ainsi les mérontes, sporontes et sporoblastes.

Les frottis de spores ont donc été soumis à une post-fixation en éthanol 50% pendant 15 minutes puis en éthanol 100% pendant 10 minutes. Les échantillons ont ensuite été réhydratés avec du PBS 1X (2 lavages de 15 min), et pré-hybridé dans 3 bains successifs de PBS 1X: tampon d'hybridation (TH) (v/v) (20 mM Tris-HCl pH 7,8 ; 0,9 M NaCl ; 1X solution de Denhardt's (VWR Life Science) et 0,01% SDS) pendant 15 min à température ambiante (TA), TH pendant 15 min à TA puis TH pendant 20 min à 45°C. L'hybridation *in situ* a été effectuée pendant 3 h à 45°C, par l'utilisation d'une sonde spécifique au genre *Anncalia* et *Encephalitozoon* couplé à un marqueur fluorescent, la cyanine 3 (Cy3). Après 4 lavages (TH 30 min à 45°C, suivi de TH, TH/PBS (v/v) et PBS 1X pendant 30 min à TA), les échantillons ont été contre-colorés au DAPI à 100 µg mL⁻¹ pendant 5 min. Les lamelles ont ensuite été déposées sur des lames avec du liquide montage Prolong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen).

1.2.2.3.2. Marquage des parasites à la lectine « Wheat Germ Agglutinin »

La lectine « Wheat Germ Agglutinin » (WGA) est une lectine qui se lie à l'acide sialique et aux résidus *N*-acétylglycosamine marquant la paroi des spores microsporidiennes. Les frottis de spores ont été incubés dans une solution de WGA diluée au 200^{ème} dans du PBS 1X, 10 min, suivi d'un lavage au PBS 1X pendant 10 min.

1.2.2.3.3. Marquage des parasites au Direct Yellow 96

Le Direct Yellow 96 (DY96) permet de visualiser les spores en se liant à la chitine localisée dans la paroi. Les frottis de spores ont été incubés dans une solution de DY96 (Direct Yellow 96) diluée au 1000^{ème} dans une solution de SDS 0,1% sur la nuit à TA.

1.2.2.3.4. Inclusion en résine EPON du culot des spores pour observation par microscopie électronique à transmission

Les échantillons ont été fixés dans un tube Eppendorff de 1,5 ml avec un mélange v/v/v de tampon Cacodylate 0,2 M à pH 7,4 ; glutaraldéhyde 6% et rouge de rhuténium 0,15% pendant 1 h. Après 3 lavages de 10 min en tampon Cacodylate 0.1M, les échantillons ont été soumis à une post-fixation à l'acide osmique 1% en tampon cacodylate 0.1M pendant 1h. La fixation ainsi que la post-fixation permettent d'améliorer le contraste en plus de fixer

l'échantillon observé. Une déshydratation de l'échantillon dans un bain d'alcool de concentration croissante a été réalisée comme suit : 3 bains de 5 min dans de l'alcool 50%, 3 bains de 15 min dans de l'alcool 70% et enfin 3 bains de 20 min dans de l'alcool 100%. La déshydratation facilite la pénétration de l'oxyde de propylène. Trois incubations de 20 min dans un bain d'oxyde de propylène ont été réalisées afin d'améliorer la pénétration de la résine dans l'échantillon. Une infiltration de la résine de l'échantillon a été réalisée dans un bain d'oxyde de propylène et de résine pendant 1 nuit sous hotte, tubes ouverts. La résine non polymérisée est ensuite éliminée par retournement sur papier Whatman. La résine a ensuite été coulée et mise à polymériser pendant 48h à 50°C.

I.2.3. Extraction et purification des protéines de surface des spores

I.2.3.1. Méthode par biotinylation des protéines de surface

À partir de spores purifiées, un culot de 10^9 spores.mL⁻¹ a été repris dans du PBS 1X froid. Les spores ont ensuite été mises en contact avec des concentrations différentes de biotine (Ez-link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin, Thermo Scientific) soit 20 mg.mL⁻¹ ; 15 mg.mL⁻¹ ; 10 mg.mL⁻¹ et 5 mg.mL⁻¹. Les spores ont été incubées avec la biotine pendant 2h à 4°C sur roue agitante. Après une centrifugation de 5 min à 15 000 x g, une solution froide de glycine à 100 mM a été ajoutée à la solution de spores, suivi d'une incubation de 30 min à 4°C sur roue agitante. Cette incubation a été suivie de trois rinçages avec du PBS 1X froid et une centrifugation de 5 min à 15 000 x g entre chaque lavage. Les spores ont ensuite été mises en contact avec de la streptavidine fluorescéine (Vector) à 30 µg.mL⁻¹ pendant 1h à TA sur roue. Afin d'éliminer l'excès de streptavidine fluorescéine, 3 lavages en PBS 1X froid ont été réalisés.

I.2.3.2. Décapage des protéines de surface par trypsination

Suite à deux lavages des spores purifiées en PBS 1X froid, les culots à 10^9 spores.mL⁻¹ ont été resuspendus dans une solution de décapage (20 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl, 10 mM de CaCl₂·6H₂O) contenant la concentration souhaitée de trypsine (0,5 µg.mL⁻¹ ; 1 µg.mL⁻¹ et 5 µg.mL⁻¹) puis incubés à 37°C pendant 30 min, 1h et 2h. Les spores ont ensuite été centrifugées pendant 10 min à 15 000 x g à 4°C. Les surnageants constitués de peptides ainsi que les culots contenant les spores ont été récupérés et stockés à 4°C.

I.2.3.3. Décapage des protéines de surface par SDS chaud

Les spores ont été mises en contact avec une solution de « décapage » composée de SDS 1% ; Tris HCl 300 mM pH 8,8 ; EDTA 100 mM et chauffé à 65°C pendant des temps différents (10 min, 20 min, 30 min et 60 min). Une centrifugation de 10 min à 15 000 x g à 4°C a été réalisée. Les culots de spores ont été repris dans du PBS 1X et stockés à 4°C. Les surnageants contenant les protéines extraites ont été précipités en ajoutant 4 volumes d'acétone à -20°C. Ils ont ensuite été incubés pendant 60 min à -20°C puis centrifugés 10 min à 15 000 x g. Une fois le surnageant éliminé, l'acétone a été évaporée sous une sorbonne pendant 30 min. Les culots séchés ont ensuite été re-suspendus dans du tampon Laemmli 1X (10% glycérol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-Base pH 6,8, 0,0025% bleu de bromophénol, 100 mM DTT) pour extraction des protéines.

Les échantillons protéiques précipités obtenus par décapage au SDS ont ensuite été déposés sur gel de polyacrylamide 12 % (SDS PAGE). Après migration, une révélation du gel par coloration des protéines au SYPRO Ruby a été réalisée comme suit : (i) le gel a été incubé dans une solution de fixation (50% éthanol, 7% acide acétique) pendant 30 min et sous agitation. Cette étape de fixation a été renouvelée 1 fois (ii) la solution de fixation a été remplacée par le SYPRO Ruby Gel puis incubée pendant une nuit, sous agitation et à TA. Enfin, (iii) le gel a été transféré dans un récipient propre puis a été lavé dans une solution de lavage (10 % méthanol, 7% acide acétique) permettant de limiter le bruit de fond. Avant observation sous lumière UV, le gel a été rincé deux fois avec de l'eau ultra pure pendant 5 min.

I.2.3.4. Effets des décapages à la trypsine et au SDS sur l'infectiosité des spores

L'effet des traitements de décapage à la trypsine et au SDS sur l'infectiosité des spores a été vérifié par la réalisation de tests fonctionnels d'infection. Pour cela, des cellules RK13 ont été cultivées sur lamelles de verre. Une fois les cellules à confluence, les spores, obtenues après décapage à la trypsine et au SDS, ont été mises en contact avec les cellules pendant 4 jours. Après la période d'incubation, le milieu de culture MEM a été éliminé et les cellules ont été fixées en méthanol et placées à -20°C pendant minimum 30 min. Puis, afin de mettre en évidence les foyers infectieux, un marquage par hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) a été réalisé comme décrit précédemment (cf. paragraphe I.2.2.3.1)

I.2.4. Analyse en spectrométrie de masse

Les analyses en spectrométrie de masse ont été restreintes aux échantillons obtenus pour *A. algerae* suite au traitement des spores au SDS à 65°C, incluant les conditions SDS 1% 10 min, SDS 1% 60 min et PBS 60 min (Témoin). Les extraits protéiques sélectionnés ont été soumis en prestation à la plateforme « Exploration du métabolisme » localisée à l'INRA de Theix pour l'analyse en spectrométrie de masse.

I.2.4.1. Préparation des échantillons protéiques

Les culots protéiques précipités et repris dans du tampon Laemmli ont été déposés sur un gel polyacrylamide 7,5% pré-coulé (Bio-Rad). Les échantillons ont été concentrés dans le gel de concentration puis les bandes correspondantes à chaque échantillon ont été découpées dans le gel de concentration, placées dans un tube Eppendorf puis congelés jusqu'à analyse par spectrométrie de masse.

La préparation des échantillons pour l'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a été effectuée comme suit. Les bandes protéiques ont été réduites, alkylées et hydrolysées avec 200 ng de trypsine sur la nuit à 37°C comme décrits précédemment (Santos et al., 2019). La digestion a ensuite été arrêtée avec une solution d'acétonitrile (ACN) \geq 99,9%, 0,1% acide formique (FA). Les peptides ont été extraits du gel par sonication puis transférés dans une fiole pour HPLC après avoir été concentrés à 15 μ L dans un concentrateur SpeedVac. Les différentes fractions peptidiques ont été analysées par LC-MS/MS. Brièvement, 2 μ L de mixture de peptides ont été injectés dans le système Ultimate nano HPLC (Thermo-Fisher). Après dessalage sur la colonne chargée, les peptides ont été séparés sur la colonne analytique nano C18 (75 μ m, 15 cm, PepMap, ThermoScientific) via un gradient d'acétonitrile (99,9% ACN, 0.1% FA) de 4 à 35% en 50 min à un débit de 400 nL/min. Les peptides séparés ont été ionisés par la technique d'électrospray et soumis au spectromètre de masse (LTQ Orbitrap Velos, Thermo-Fisher). Le spectromètre de masse a été utilisé en mode « DDA » (Data-Dependant Acquisition), chaque scan complet MS1 (350-4000 m/z, R60000) a été suivi de 20 fragmentations MS/MS CID (Collision-induced Dissociation).

I.2.4.2. Traitements des données de spectrométrie de masse

À l'appui des résultats de spectrométrie de masse, l'ensemble des protéines identifiées grâce au logiciel Mascot, a été transmis sous forme de fichier Excel, répertoriant chaque protéine associée avec leurs identifiants et numéros d'accèsion.

Les séquences protéiques correspondantes à chaque numéro d'accèsion ont été récupérées de la base de données locale d'*A. algerae* souche Undeen. L'ensemble des protéines ont été soumises à une analyse bio-informatique, basée sur la recherche de motif d'adressage, de localisation extracellulaire ou membranaire, et de domaine fonctionnels (notamment des motifs de liaison aux carbohydrates, sites de glycosylations). Les outils de bioanalyse ont été les suivants : Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>), NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) et NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

I.3. Production de protéines recombinantes chez *Escherichia coli* et chez la levure *Pichia pastoris*

I.3.1. Construction des vecteurs d'expressions et transformation de systèmes hôtes

Les protéines recombinantes ont été produites chez *Pichia pastoris* (souche KMH71) (Invitrogen) ou chez *Escherichia coli* BL21-λDE3 (PROMEGA). Pour cela, les gènes des protéines sélectionnées ont été clonés dans les vecteurs d'expression pET28a (Novagen) et/ou pPICZα-A (Invitrogen) respectivement pour la production chez *E.coli* et *P.pastoris*. Les vecteurs disposent d'une séquence de 6 Histidines (tag His₆) qui sera fusionnée aux protéines recombinantes produites, permettant ainsi leurs purifications sur chromatographie d'affinité aux ions Nickel (IMAC). Dans le cadre de nos constructions plasmidiques, le tag His₆ sera systématiquement fusionné en position C-terminal (C-Ter) des protéines recombinantes produites, et ce quel que soit le vecteur d'expression.

L'ADN génomique (ADNg) d'*A. algerae* et d'*E. cuniculi* a été extrait à l'aide du kit NucleoSpin®Soild (Macherey-Nagel) à partir de 2x10⁸ spores. Les séquences codant pour les protéines obtenues par approche bio-informatique (*AaSWP7*, *AaSWP12*, *EcSWP5*, *EcSWP7*,

Tableau 4 : Récapitulatifs des informations nécessaires à la construction des vecteurs d'expressions.

Le poids moléculaire de chaque protéine a été obtenu via la base de donnée Microsporidiadb ou par l'outil ProtParam d'Expasy (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) à partir de la séquence protéique. La base de donnée Microsporidiadb permet également d'obtenir la taille des gènes. L'outil NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) a été utilisé afin de vérifier si les enzymes de restrictions choisies ne coupent pas la séquence d'intérêt. La température d'hybridation (Tm) des amorces a été calculé avec l'outil NEB Tm Calculator (<https://tcalculator.neb.com/#!/main>).

Nom de la protéine	Espèce microsporidienne	N° d'accession	Poids moléculaire (kDa)	Taille du gène (pb)	Vecteurs	Amorces avec les sites de restrictions	Enzymes de restrictions	Température d'hybridation (°C)
AaSWP7	<i>A. algerae</i>	K10AEA11YB06AHM1	29,28	822	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> CCCTATTGAAATTAGCAATTTATATT -3'	<i>NcoI</i> et <i>XhoI</i>	58
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> AGCTGCAGTTGCTGCTTTTG -3'		60
					ppiczα-A	F-5'- <u>gggcccgg</u> CATGCTATTGAAATTAGCAATTTAT-3'	<i>SacII</i> et <i>XbaI</i>	58
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> GCAGCTGCAGTTGCTGCTTTTG-3'		60
AaSWP12	<i>A. algerae</i>	K10ARB6YG03FM1	27,2	711	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> CCGTTGACATAGGTACAAATATAAA-3'	<i>NcoI</i> et <i>XhoI</i>	58
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> TTTAATTTTTGAATGAGATTCCTT-3'		58
					ppiczα-A	F-5'- <u>ggggaattc</u> ATGGTTGACATAGGTACAAATA-3'	<i>EcoRI</i> et <i>XbaI</i>	58
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> GCTTTAATTTTTGAATGAGATTCCTT-3'		58
EcSWP5	<i>E. cuniculi</i>	ECU07_0400	28,81	627	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> CCAAGTTTAGTACACTCAAGCTG-3'	<i>NcoI</i> et <i>XhoI</i>	58
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> AGCCAGAGACGAGTACTTC-3'		60
					ppiczα-A	F-5'- <u>ggggaattc</u> ATGAAGTTTAGTACACTCAAG C-3'	<i>EcoRI</i> et <i>XbaI</i>	60
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> GCAGCCAGAGACGAGTACTTT C-3'		60
EcSWP7	<i>E. cuniculi</i>	ECU11_1210	33	888	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> CCGAATACAACCTCGGGGGCT-3'	<i>NcoI</i> et <i>XhoI</i>	58
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> GTACTTGCACTCGTCATCGA-3'		60
					ppiczα-A	F-5'- <u>ggggaattc</u> ATGGAATACAACCTCGGGGG-3'	<i>EcoRI</i> et <i>XbaI</i>	60
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> GCCTACTTGCACTCGTCATCGAC-3'		60
EcSWP9	<i>E. cuniculi</i>	ECU07_0530	44,47	1149	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> CCAGAGCAGAAACCAGCAGCG-3'	<i>NcoI</i> et <i>HindIII</i>	60
						R-5'- <u>gggaagctt</u> TGCAGAGATTCTTGACGATCT-3'		60
					ppiczα-A	F-5'- <u>ggggaattc</u> ATGAGAGCAGAAACCAGCAG-3'	<i>EcoRI</i> et <i>XbaI</i>	60
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> GCTGCAGAGATTCTTGACGATCT-3'		60
EcSWP12	<i>E. cuniculi</i>	ECU01_0420	27,36	711	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> CCGATAAGGAAACAGTGAAGGAT-3'	<i>NcoI</i> et <i>HindIII</i>	58
						R-5'- <u>gggaagctt</u> TTTTACCTCCTCCAGTGCTT-3'		58
					ppiczα-A	F-5'- <u>ggggaattc</u> ATGGATAAGGAAACAGTGAAG-3'	<i>EcoRI</i> et <i>SacII</i>	58
						R-5'- <u>gggcccgg</u> GCTTTTACCTCCTCCAGTGCTT -3'		58
EcSWP26	<i>E. cuniculi</i>	ECU05_0590	28,37	756	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> CCGAAAACAGCTATAAGTACTACG-3'	<i>NcoI</i> et <i>XhoI</i>	60
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> CTTCTTAGATCCTATTGTTCT-3'		58
					ppiczα-A	F-5'- <u>gggcccgg</u> CGAAAACAGCTATAAGTACTACG-3'	<i>SacII</i> et <i>XbaI</i>	60
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> GCCTTCTTAGATCCTATTGTTCT-3'		58
EcRBL1-1	<i>E. cuniculi</i>	ECU08_1730	23,40	645	pET28A	F-5'- <u>ggcatgg</u> GGAATTCCTCATTAAACAATAACG-3'	<i>NcoI</i> et <i>XhoI</i>	58
						R-5'- <u>ggctcgaag</u> AACAATGAGACAGTCACTATC-3'		58
					ppiczα-A	F-5'- <u>ggggaattc</u> GAAATTCCTCATTAAACAATAAC-3'	<i>EcoRI</i> et <i>SacII</i>	58
						R-5'- <u>ggctcgaagcccgg</u> TAAACAATGAGACAGTCACTA-3'		55

EcSWP9, *EcSWP12*, *EcSWP26*, *AaRBLL-2*, *EcRBLL-1*) et les protéines identifiées par l'approche surfomics (*AaRBLL-1*, *AaP6BE05*, *AaP13YM*, *AaP696T*, *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP03248*) ont été amplifiées par PCR à partir de 100 ng d'ADNg. Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 50 µL, comprenant le tampon de l'enzyme (Tris-HCl 20 mM pH 8,8, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, MgSO₄ 2mM, Triton 0,1 %, BSA 0,1mg.mL⁻¹), les amorces oligonucléotidiques (500 nM) (**Tableau 4**), les dNTPs (0,2 mM, MP Biomedicals) et 2U de l'ADN polymérase Pfu (Promega). Des sites de restriction ont été ajoutés au niveau des amorces oligonucléotidiques (**Tableau 4**) afin de permettre le clonage des produits d'amplification dans les vecteurs d'expression. Les réactions PCR ont été réalisées dans un thermocycleur ProFlex PCR System (AppliedBiosystems) selon le programme suivant : une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, suivies de 30 cycles incluant 30 secondes à 94°C, 40 secs d'hybridation à la température de fusion (T_m) des amorces (**Tableau 4**) et une élongation à 72°C pendant une durée déterminée selon la taille des gènes, suivi d'une élongation finale de 5 min à 72°C. Les produits d'amplification ont été contrôlés sur un gel d'agarose 1%, TAE 0,5X (20 mM Tris, 0,5 mM d'EDTA, 0,05% acide acétique) puis purifiés avec le kit Qiagen-QIAquick PCR purification kit (Qiagen) suivant les instructions du fournisseur. À l'issue de la purification, les produits de PCR, repris dans 30µL d'eau MilliQ, ont subi des doubles digestions par les enzymes de restrictions correspondant aux sites de restriction ajoutés aux extrémités des amplicons (**Tableau 4**). Les digestions enzymatiques ont été réalisées à 37°C pendant 1h30, dans les tampons spécifiques de chacune des enzymes (PROMEGA), dans un volume final de 100 µL en présence de 20 à 30 U d'enzymes. À l'issue de chacune des doubles digestions, les produits ont été purifiés avec le kit Qiagen-QIAquick PCR purification et les inserts obtenus repris dans 30µL d'eau.

En parallèle de la préparation des inserts, 4 µg de plasmides pET28a et pPICZα-A ont été digérés par les enzymes de restrictions correspondant aux sites de restrictions ajoutés spécifiquement aux extrémités de chaque insert. Le contrôle des digestions a été effectué par analyse sur gel d'agarose 1%. Les conditions réactionnelles des différentes digestions, ainsi que les étapes de purification, ont été identiques à celles décrites pour les inserts.

Les plasmides et les inserts digérés, préalablement dosés au Nanodrop (Thermo Scientific), ont été mis en ligation pendant 16H à 16°C, dans un volume final de 20 µL contenant 400 unités de ligase (T4 DNA ligase, New England Biolabs) et le tampon de l'enzyme (Tris-Hcl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 , ATP 1 mM, DTT 10 mM). Chaque ligation a été réalisée avec 100 ng de plasmide

Tableau 4 (suite)

Nom de la protéine	Espèce microsporidienne	N° d'accension	Poids moléculaire (kDa)	Taille du gène (pb)	Vecteurs	Amorces avec les sites de restrictions	Enzymes de restrictions	Température d'hybridation (°C)
AaRBL1-1	<i>A. algerae</i>	MZ54765	23,45	671	pET28A	F-5'- <u>ggggatcc</u> ATGCTGATATTTTCTTAAGTATC	<i>Bam</i> HI et <i>Xho</i> I	60
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> TTACATTCCCATTGGATTTAAAAACAT		64
					ppiczα-A	F-5'- <u>gggggaattc</u> ATGCTGATATTTTCTTAAGTATC-3'	<i>Eco</i> RI et <i>Xba</i> I	55
						R-5'- <u>gggtctaga</u> CCCATTCCCATTGGATTTAAAAAC-3'		60
AaRBL1-2	<i>A. algerae</i>	MZ547654	20,02	546	pET28A	F-5'- <u>ggggatcc</u> ATGCTGATATTTTCTTAAGTATC-3'	<i>Bam</i> HI et <i>Xho</i> I	55
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> TTACATTCCCATTGGATTTAAAAACAT-3'		59
					ppiczα-A	F-5'- <u>gggggtacc</u> ATGCTGATATTTTCTTAAGTATC-3'	<i>Eco</i> RI et <i>Xba</i> I	55
						R-5'- <u>gggtctaga</u> GTTTACATTCCCATTGGATTTAAAAACAT-3'		62
AaP6BE05	<i>A. algerae</i>	KIOAFA6BE05FM1	22,5	609	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> GGCGCGAAACAGCTAAA-3'	<i>Nco</i> I et <i>Xho</i> I	63
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> TGGTGAATAGAAGCACTC-3'		58
					ppiczα-A	F-5'- <u>gggggaattc</u> CGCGAAACAGCTAAAAGGT-3'	<i>Eco</i> RI et <i>Xba</i> I	60
						R-5'- <u>gggtctaga</u> GCTGGTGAATAGAAGCACTCATT-3'		58
AaP13YM	<i>A. algerae</i>	KIOAPB13YM20FM1	29,29	804	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> GG AGAATAAAGCAAGATAAAAAGGA-3'	<i>Nco</i> I et <i>Xho</i> I	57
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> GAAAAATGTAAGAATACCAAAAAT-3'		55
					ppiczα-A	F-5'- <u>gggggtacc</u> AGAATAAAGCAAGATAAAAAGGA-3'	<i>Eco</i> RI et <i>Xba</i> I	57
						R-5'- <u>gggtctaga</u> GCGAAAAATGTAAGAATACCAAAAAT-3'		60
AaP696T	<i>A. algerae</i>	H311_01696T0	10,27	370	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> GTTTAAATGTTGGAGGTAAAAAG -3'	<i>Nco</i> I et <i>Xho</i> I	60
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> AGAATCCCGCCAGA-3'		59
					ppiczα-A	F-5'- <u>gggggaattc</u> TCATTAATGTTGGAGGTAAAAAG-3'	<i>Nco</i> I et <i>Xho</i> I	58
						R-5'- <u>gggtctaga</u> GCAGAACATCCGCCAGAAGGTG-3'		58
AaP3569T	<i>A. algerae</i>	H311_03569	49,31	1251	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> GGTTTTTCACTCAAGGAAG -3'	<i>Nco</i> I et <i>Xho</i> I	60
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> AGGTGATGGTTATAATGTA-3'		57
					ppiczα-A	F-5'- <u>ggggcattg</u> TGTTTTTATCACTCAAGGAAG-3'	<i>Eco</i> RI et <i>Xba</i> I	60
						R-5'- <u>gggggtacc</u> GCAGGTGATGGTTATAATGTA-3'		61
AaP04039	<i>A. algerae</i>	H311_04039	20,54	555	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> GGGAAAATCCAAAGTTGAC -3'	<i>Nco</i> I et <i>Xho</i> I	61
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> AACCAGTGCTGCTATTG-3'		59
					ppiczα-A	F-5'- <u>gggggaattc</u> AAAGAAAATCCAAAGTTGACT-3'	<i>Eco</i> RI et <i>Xba</i> I	61
						R-5'- <u>gggtctaga</u> GCAACCAGTGCTGCTATTGCTA-3'		59
AaP03248	<i>A. algerae</i>	H312_03248	91,184	2462	pET28A	F-5'- <u>gggcatgg</u> GGATGGATAAAAATAAGGACATT-3'	<i>Nco</i> I et <i>Xho</i> I	57
						R-5'- <u>gggctcgaag</u> TTCTTCTAAAACAACAACATC-3'		55
					ppiczα-A	F-5'- <u>gggggtacc</u> ATGGATAAAAATAAGGACATTGA-3'	<i>Eco</i> RI et <i>Xba</i> I	56
						R-5'- <u>gggtctaga</u> GCTTCTTCTAAAACAACAACATCC-3'		62

digéré et une quantité d'inserts calculée de sorte à respecter un ratio Insert :Plasmide de 3 :1 (rapport des pmoles d'extrémités).

Les bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5 α (Competent cells, Promega) ont été transformées avec les différents produits de ligation selon la méthode de choc thermique (Sambroock et al., 1989). Brièvement, 10 μ L de produit de ligation ont été mélangés à 50 μ L de bactéries compétentes puis laissés dans la glace pendant 30 min. Les tubes ont ensuite été soumis à un choc thermique à 42°C pendant 1 min suivie d'une incubation de 2 min dans la glace. Après avoir ajouté 400 μ L de milieu LB Low Salt (Luria-Bertani) (1% Tryptone ; 0,5% NaCl ; 0,5% d'extrait de levure, pH 7,5) les tubes ont été placés 45 min à 37°C sous agitation. Après une centrifugation de 2 min à 8000 x g, le surnageant a été éliminé et le culot bactérien a été repris dans 100 μ L de milieu LB. 20 μ L et 80 μ L de bactéries ont été étalés sur milieu LB-agar (15 g.L⁻¹) (en boîtes de Pétri) additionné de kanamycine à 30 μ g.mL⁻¹ pour les plasmides pET28a ou de zéocine à 25 μ g.mL⁻¹ (Invitrogen) pour les transformations avec pPICZ α -A. Les géloses ont ensuite été incubées 1 nuit à 37°C.

Le criblage et la sélection de clones bactériens positifs (ayant intégré le plasmide contenant l'insert) ont été réalisés par PCR sur colonies. Pour cela, une partie de la colonie (l'autre partie ayant été sauvegardée en milieu LB, supplémenté de la kanamycine ou la zéocine) a été déposée au fond d'un tube PCR, dans lequel ont été ajoutés 15 μ L de mélange réactionnel de PCR (kit GoTaq G2 Flexi DNA polymerase, PROMEGA). Les amorces oligonucléotidiques utilisées ont été définies pour cibler spécifiquement l'amplification de la région plasmidique située de part et d'autre du site de clonage de l'insert. Les couples d'amorces pET28a-Fwd (5'-TAATACGACTCACTATAGGGG-3') / pET28a-Rev (5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') et AOX-5' (5'-ACAAATAACGGGTTATTGTTT-3') / AOX-3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC3') ont été utilisés pour cribler les clones recombinants respectivement obtenus avec pET28a et pPICZ α -A. Le programme de PCR a été le même que celui utilisé pour l'amplification des inserts, avec pour seuls réajustements une température d'hybridation fixée à 58°C (T_m des amorces) et un temps d'élongation de 2 min 30 sec. Les produits PCR ont ensuite été analysés sur gel d'agarose 1% afin de sélectionner les clones positifs en fonction de la taille des amplicons.

Des minipréparations d'ADN plasmidiques, selon la méthode de lyse alcaline (Sambrook et al. 1989), ont été réalisées à partir des clones positifs sélectionnés et sauvegardés en milieu LB. Pour cela, 4 mL de culture en milieu LB (kanamycine 30 μ g.mL⁻¹ ou zéocine 25 μ g.mL⁻¹) des clones positifs ont été incubés pendant 1 nuit à 37°C, sous agitation. 2 mL de culture

bactérienne ont ensuite été prélevés et centrifugés pendant 2 min à 6000 rpm. Une fois le surnageant éliminé, le culot bactérien a été repris dans 100 μL d'une solution de resuspension (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, pH 7,8). La lyse des bactéries a été induite par l'ajout de 200 μL de tampon de lyse (NaOH 0,2M, SDS 1%), suivi d'une incubation de 5 min à température ambiante. 150 μL d'une solution d'acétate de sodium (3M pH 4,8) ont ensuite été ajoutés pour neutraliser la soude. Après une incubation de 30 min dans la glace, les débris membranaires ont été culottés par centrifugation de 30 min à 14 000 rpm. 500 μL de surnageant contenant l'ADN plasmidique ont été prélevés et l'ADN plasmidique a été précipité par ajout de 1 mL (soit 2 volumes) d'éthanol 100% glacial, pendant 20 min à -20°C . Après une centrifugation de 10 min à 14 000 rpm, le culot d'ADN plasmidique a été repris dans une solution de Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,6 additionnée de RNase à $0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ puis incubé pendant 10 min à 65°C . Les ADN plasmidiques ont ensuite été précipités par ajout de 250 μL d'éthanol 100% glacial puis centrifugés pendant 10 min à 14 000 rpm. Les culots ont été lavés des sels résiduels, avec 500 μL d'éthanol à 70%, puis centrifugés, séchés et finalement repris dans 50 μL d'eau ultra pure. L'ensemble des constructions plasmidiques obtenues a été séquencé en prestation de service (Eurofins Genomics). Le séquençage des plasmides a été effectué avec les amorces spécifiques pET28a Fwd et Rev pour les constructions avec le vecteur pET28a ou AOX-5' et AOX-3' pour pPICZ α -A. La conformité des séquences nucléotidiques des différents gènes clonés a été validée par alignement avec les séquences des gènes disponibles dans les banques de données, via l'outil d'alignement de séquences Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

1.3.2. Expression et purification des protéines recombinantes

1.3.2.1. Système bactérien, *E. coli* BL21 λ DE3

Les constructions plasmidiques (pET28a + insert) validées par le séquençage, ont été transformées par la méthode du choc thermique dans la souche *E. coli* BL21- λ DE3, dédiée à l'expression des protéines recombinantes. L'induction de l'expression de ces protéines s'est déroulée en plusieurs étapes à partir de colonies transformées préalablement sélectionnées. Dans un premier temps, une culture de 200 mL de milieu LB (1% Tryptone ; 1% NaCl ; 0,5% d'extrait de levure, pH 7,5, kanamycine $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a été inoculée avec une pré-culture (overnight) du clone recombinant, puis placée à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une $\text{DO}_{600} \sim 4-6$. L'expression des protéines recombinantes a été ensuite induite par ajout d'isopropyl- β -thio-galactopyranoside 1mM (IPTG) durant 4h à 37°C . À l'issue de cette phase,

les protéines totales des bactéries ont été extraites selon le protocole fourni par le kit de purification par chromatographie IMAC (Kit Ni-IDA 1000 protino, Macherey Nagel). Brièvement, les cultures de 200 mL induites à l'IPTG, ont été centrifugées à 6000 x g pendant 15 min. Le culot bactérien a été resuspendu dans 8 mL de tampon de lyse (LEW 1X, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0) additionné de lysozyme (2mg.mL⁻¹, SIGMA) pour respecter des conditions de lyse non dénaturantes. Après une incubation de 30 min dans la glace, la solution est soniquée dans la glace (5 répétitions de 20 pulses, puissance 80%, sonicateur UP50H Hielscher Technology), puis centrifugée à 10 000 x g pendant 30 min à 4°C afin de culotter les débris membranaires insolubles. La fraction soluble (surnageant) est récupérée puis chargée sur colonne de chromatographie Nickel (Ni-IDA 1000), préalablement équilibrée avec 2mL de Tampon LEW 1X. La colonne a été lavée deux fois avec 2 mL de LEW 1X, puis éluée avec 4 mL de tampon d'éluion (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8,0). Le degré de pureté des protéines recombinantes purifiées a été évalué sur gel SDS-PAGE 15 %, et leur quantification a été réalisée par dosage spectrométrique à 280 nm selon la méthode de Bradford. À l'issue de cela, les protéines purifiées (présentes dans 4 mL) ont subi un dessalage sur colonne AMICON 3kDa (Millipore) et resuspendues dans du sérum physiologique. Lors de ce dessalage, le volume initial de 4 mL a été réduit de sorte à obtenir une concentration protéique finale de 1 µg.mL⁻¹.

Dans le cadre de protéines insolubles, la purification a été réalisée à partir de la fraction insoluble (culot de débris membranaires associées aux protéines insolubles) obtenue à l'issue de la lyse bactérienne au lysozyme et de la centrifugation de 30 min à 4°C. Pour la purification sur colonne, il a été nécessaire de resolubiliser le culot dans un tampon dénaturant (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 8 M Urée, pH 8,0) et d'utiliser un tampon d'éluion dénaturant (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 8 M urée, pH 8,0).

1.3.2.2. Système *Pichia*, KM71H

Les différentes constructions plasmidiques (pPICZα-A + inserts) ont été transformées dans *P. pastoris* KM71 via le kit Easy select *Pichia* kit (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur. Brièvement, les levures ont été rendues chimiquement compétentes par traitement au Polyethylene Glycol (PEG). Les levures compétentes ont été transformées avec 3 µg de plasmide, préalablement linéarisé par l'enzyme ScaI ou PmeI, selon la méthode du choc thermique à 42°C. Les levures transformées ont été sélectionnées sur milieu YPDS-Agar (2%

peptone, 1% extrait de levure, 2% glucose, 1M sorbitol, 2% agar), complété de l'antibiotique zéocine à 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les colonies transformées ont été obtenues à l'issue de 3 à 10 jours d'incubation à 30°C.

L'induction de l'expression et la production des protéines recombinantes ont été réalisées selon le protocole fourni par le kit Easy-Select Pichia kit (Invitrogen). Une culture de 500 mL de milieu BMGY (1% d'extrait de levure ; 2% peptone ; 100 mM de potassium de phosphate, pH 6,0 ; 1,34% YNB (Yeast Nitrogen Base) ; 4×10^{-5} biotine ; 1% glycérol) a été inoculée avec 10 mL de pré-culture (en BMGY) des clones recombinants sélectionnés. À l'issue d'une incubation à 30°C sous agitation pendant 16-20h et d'une DO_{600} atteinte comprise entre 2 et 6, la culture a été centrifugée à 5000 x g pendant 10 min, puis le culot a été resuspendu dans 100 mL de milieu d'induction BMMY (identique au BMGY, à l'exception du glycérol remplacé par le méthanol) en présence de méthanol 0,5% (inducteur de l'expression). La culture a été placée à 30°C sous agitation pendant 72-96h avec ajout de méthanol toutes les 24h.

Concernant l'étape de purification, les protéines recombinantes produites ont été purifiées à partir du surnageant de culture du fait de la sécrétion des protéines recombinantes pour le système *Pichia*. Pour cela, la culture de 100 mL a été centrifugée à 7000 x g pendant 10 min, puis le surnageant a été récupéré puis concentré sur une cellule Amicon 3kDA (Millipore) jusqu'à réduction du volume à 20 mL, permettant de faciliter l'étape de chromatographie IMAC. L'équilibration en sels la solution de 20 mL, nécessaire pour le passage sur colonne de chromatographie, a été effectuée par ajout à la solution de 2,8 mL de tampon LEW 8X. Le protocole de purification a été identique à celui mis en œuvre pour les productions en bactérie, de même que les étapes de contrôle du degré de purification, de dosage et de concentration finale à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

1.4. Production d'anticorps polyclonaux et Western Blot

Des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines recombinantes (*EcSWP7*, *EcSWP12*, *EcSWP9*, *EcSWP26*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*) ont été obtenus après immunisation des souris BALB/C. Toutes les deux semaines, les souris ont reçu des injections intra-péritonéales des fractions purifiées de protéines recombinantes. Ces fractions de 100 μL , soit 100 μg de protéines, ont été préalablement homogénéisées avec de l'adjuvant de Freund (Sigma) complet pour la primo-injection puis incomplet pour les 4 rappels réalisés dans un intervalle de

plusieurs jours. Les sera des souris ont été collectés deux semaines après la dernière injection, puis conservés à -20°C.

La spécificité des anticorps polyclonaux (sera) a été analysée par western blot sur des extraits protéiques de spores d'*E. cuniculi* et *A. algerae*. Ces extraits protéiques ont été préparés à partir de spores en suspension dans du tampon Laemmli 1X, qui ont été soumises à 10 cycles de congélation-décongélation, puis portées à ébullition pendant 15 min. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 2 min à 14 000 x *g*. Les protéines ont ensuite été séparées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 12%, transférées sur membrane polyvinylidenedifluoride (PVDF, Immobilon®P^{5Q}) en présence de tampon de transfert (Tris-Base 48 mM ; Glycine 39 mM ; SDS 0,0375% ; Méthanol 20%). Les membranes ont été saturées avec du PBS 1X-régilait 5% sur la nuit à 4°C, puis incubées avec les anticorps polyclonaux (sera), dilués au 200^{ème} dans du PBS-Triton 0,1% pendant 2 h à 37°C. L'anticorps secondaire, anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline, diluée au 1000^{ème} dans du PBS-Triton 0,1% a été incubé pendant 1 h à TA. Les membranes ont ensuite été révélées par chimioluminescence avec le kit « Western ECL Substrate » (Biorad).

1.5. Immunolocalisation

L'ensemble des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt sélectionnées ont été testés par immunofluorescence indirecte sur des frottis de spores. À partir des surnageants de cultures d'*A. algerae* et d'*E. cuniculi*, 10⁷ spores ont été centrifugées pendant 5 min à 10 000 x *g* afin d'éliminer les débris cellulaires. Les culots de spores ont ensuite été repris dans 1 mL de PBS 1X. 50 µL de cette solution de spores soit 5 x 10⁵ spores par frottis, ont été déposés sur des lamelles de verre disposées dans des plaques 24 puits puis laissés à sécher sur la nuit.

Les frottis de spores ont ensuite été fixés par une solution de Paraformaldehyde 4% (PFA 4%) pendant 20 min à 4°C. Les spores ont ensuite été incubées dans une solution de glycine 0,1M pendant 5 min à TA, puis lavées rapidement au PBS 1X, et enfin incubées dans une solution de saturation (PBS 1X-BSA 1%), pendant 1h à TA. Les incubations avec les différents anticorps primaires (anticorps anti-*Aa*RBLL-1, anti-*Aa*RBLL-2, anti-*Ec*RBLL-1, anti-*Ec*SWP9, *anti-Ec*SWP26, anti-*Ec*SWP12 et anti-*Ec*SWP7) ont été effectuées pendant 2h à TA. De manière générale, les anticorps primaires ont été utilisés à des dilutions au 1/100^{ème} dans du PBS-Triton 0,1%. Les échantillons ont ensuite été rincés avec du PBS 1X et incubés pendant 1h à TA avec des anticorps secondaires de souris conjugués au fluorochrome, Alexa Fluor 555 (Invitrogen) dilués

au 1/1000^{ème}. Une coloration au DAPI (100 µg.mL⁻¹) du matériel génétique pendant 5 min à TA a été systématiquement réalisé pour l'ensemble des immunomarquages réalisés. Les lamelles ont ensuite été montées au Prolong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen) puis ont été observées au microscope à épifluorescence (LEICA DM IRB).

I.6. Tests fonctionnels d'inhibition du processus d'infection

I.6.1. Tests de cytotoxicité

Les expérimentations qui suivent ont seulement été réalisées avec les protéines recombinantes *recEcRBLL-1* et *recAaRBLL-2* ainsi que les anticorps polyclonaux anti-*EcRBLL-1*, anti-*AaRBLL-1* et anti-*AaRBLL-2* pour vérifier l'absence de toxicité de ces composés sur les cellules-hôtes *d'E. cuniculi* (MRC5) et *d'A. algerae* (HFF).

Les cellules ont étéensemencées dans des microplaques 96 puits à une densité de 2×10^4 cellules par puits dans du milieu MEM complémenté comme décrit précédemment (cf. paragraphe 1.2.1). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 48 heures à 37°C, 5% de CO₂ jusqu'à l'obtention de cellules à confluence. Le milieu a été remplacé par du milieu frais contenant les différentes concentrations de protéines recombinantes *recEcRBLL-1* et *recAaRBLL-2* (25 µg.mL⁻¹), ou les anticorps polyclonaux anti-*EcRBLL-1*, anti-*AaRBLL-1* et anti-*AaRBLL-2* (1/100^{ème}). Les témoins négatifs (cellules avec le milieu de culture seulement) et positifs de cytotoxicité (cellules avec du DMSO 20% dilué dans le milieu) ont également été réalisés sur chaque microplaque. Chaque condition a été réalisée en triplicat. Après une incubation de 7 jours à 37°C, le milieu a été éliminé et remplacé par du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium) (Sigma Aldrich) dilué au 1/10^{ème} dans du milieu de culture et les plaques ont été placées à l'obscurité à 37°C sous légère agitation. Le milieu contenant le MTT a été remplacé par 100 µL d'une solution de DMSO/Isopropanol (1/1, v/v) et incubé pendant 5 minutes à TA. La densité optique a été mesurée à 550 nm par un lecteur de microplaque (Multiscan FC, ThermoScientific). L'effet cytotoxique des protéines recombinantes et des anticorps polyclonaux sur les cellules-hôtes a été analysé en comparant le témoin négatif correspondant au 100% de croissance cellulaire par un test de non paramétrique, le Wilcoxon test. Les différences ont été considérées comme significativement différentes si la *P* value était <0,05.

I.6.2. Tests *in vitro* d'inhibition du développement parasitaire

I.6.2.1. Activité anti-microsporidienne des protéines recombinantes *recEcRBLL-1*, *recAaRBLL-1* et *recAaRBLL-2* et des anticorps anti-*EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*

L'implication potentielle des protéines *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2* dans les processus d'infection a été abordée par des tests d'inhibition visant à bloquer l'interaction entre ces protéines et leurs interactants à la surface de la cellule-hôte en utilisant des anticorps comme agents bloquants ou des protéines recombinantes comme compétiteurs.

I.6.2.1.1. Test ELISA pour la quantification de la croissance d'*E. cuniculi*

Les tests d'inhibition ont été réalisés en utilisant les concentrations non cytotoxiques de *recEcRBLL-1* ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et des anticorps anti-*EcRBLL-1* ($1/100^{\text{ème}}$) sur des cellules MRC5 infectées par *E. cuniculi*. Les cellules-hôtes ont étéensemencées dans des plaques 48 puits à une densité de 4×10^4 cellules par puits dans le même milieu de culture que décrit précédemment. Chaque condition a été réalisée en triplicat : (i) cellules non infectées et non traitées (ii) cellules infectées (iii) cellules infectées et traitées avec la protéine *recEcRBLL-1* et (iv) cellules infectées et traitées avec l'anticorps anti-*EcRBLL-1*. Une fois les cellules à confluence, le milieu a été remplacé par du milieu de culture contenant ou non la protéine recombinante pendant 1h à 37°C. Des spores d'*E. cuniculi* ont ensuite été ajoutées à une concentration de 10^6 spores.mL⁻¹ et incubées pendant 1h à 37°C. En parallèle, des spores d'*E. cuniculi* ont été mises en contact avec les anticorps anti-*EcRBLL-1* pendant 1h à 37°C et mises en contact avec les cellules-hôtes pendant 1h à 37°C. Les milieux ont ensuite été éliminés, et un lavage rapide en PBS 1X a été réalisé puis du milieu de culture frais a été ajouté dans chaque puits. Après 7 jours, le milieu de culture a été éliminé puis les cellules ont été fixées au méthanol pendant 30 min à -20°C. Le méthanol éliminé, un lavage rapide en PBS a été réalisé suivi d'une saturation des cellules avec une solution de 100 mM Tris-2%-BSA sur la nuit. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1h à 37°C avec un sérum de lapin infecté par *E. cuniculi* dilué au $1/1000^{\text{ème}}$ dans un tampon de dilution pour anticorps (10 mM Tris pH = 8, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% BSA). Les cellules ont ensuite été lavées 5 fois avec une solution de lavage (10 mM Tris pH = 8, 0,05% Tween 20) et incubées à 37°C pendant 1h avec un anticorps secondaire

anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Promega) dilué à 1 :10000^{ème} dans le tampon de dilution pour anticorps. Les cellules ont ensuite été lavées 5 fois avec la solution de lavage puis une solution de révélation (0,1 mM 4-méthylumbelliferyl phosphate (MUP), 1 mM MgCl₂, 50 mM Na₂CO₃ pH = 9.8 ; Sigma Aldrich) a été ajoutée. Après une incubation à 37°C pendant 30 min sous agitation légère, la réaction a été interrompue par ajout de de NaOH 3 M. La lecture a été réalisée au FluoroskanAscent FL, à une longueur d'onde d'excitation et d'émission de 355 nm et de 460 nm, respectivement.

I.6.2.1.2. Approche FISH pour la quantification de la croissance d'*A. algerae*

Les cellules HFF ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 10⁵ cellules par puits dans le milieu de culture décrit précédemment. Une fois les cellules à confluence, les cellules ont été pré-traitées avec la protéine recAαRBLL-2 (25 µg.mL⁻¹) pendant 1 h à 30°C dans du milieu de culture. Suite à cette incubation, les cellules sont mises en contact avec 10⁶ spores.mL⁻¹ d'*A. algerae* pendant 1h. Le milieu de culture éliminé, un lavage rapide en PBS a été réalisé suivi de l'ajout de milieu de culture dans chaque puits. En parallèle, 10⁶ spores.mL⁻¹ ont été incubées avec soit l'anticorps anti-AαRBLL-1 soit anti-AαRBLL-2 (1/100^{ème}) pendant 1h à 30°C. Ces spores ont ensuite été mises en contact avec les cellules HFF pendant 1h. Une fois le milieu de culture éliminé, un lavage rapide en PBS 1X a été réalisé et du milieu de culture a été ajouté à chaque puits. Chaque condition a été réalisée en triplicat.

Après 7 jours d'incubation à 30°C, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été fixées en PFA 4% pendant 20 min à 4°C. L'observation et la quantification des foyers infectieux ont été réalisées par (FISH) comme décrit précédemment (cf. paragraphe I.2.2.3.1).

Les effets de recEcRBLL-1 et recAαRBLL-2 ou des anticorps polyclonaux anti-EcRBLL-1 ; anti-AαRBLL-1 et anti-AαRBLL-2 sur l'infection de cellules-hôtes par *E. cuniculi* ou *A. algerae* ont été analysées en comparant le contrôle infecté correspondant à 100% de la croissance parasitaire à chaque condition avec un test de Wilcoxon. Les différences ont été considérées comme significative si la *P* value était <0,05 et très significative si la *P* value était <0,001.

II. Recherche de glycanes exogènes inhibiteurs du processus d'infection des microsporidies

II.1. Initiation du décryptage du mécanisme d'action du polysaccharide

Porphyridium marinum

II.1.1. Couplage du polysaccharide à un fluorochrome

Le polysaccharide de PM a été marqué de manière covalente au niveau des fonctions carboxylates par la 5-aminofluorescéine et par la 6-aminofluorescéine dont les maxima d'excitation et d'émission se situent à $\lambda = 496$ et 495 nm respectivement. Le protocole opératoire a été réalisé à TA pour chacun des fluorochromes, et 3 cinétiques de marquage (2h, 4h et 6h) ont été testés. Pour cela, 50 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été ajoutés à 100 mL d'une solution de polysaccharide de PM à 0,75% (p/p). 187 μ L d'acétaldéhyde, 187 μ L de cyclohexylisocyanure et 187 mg de fluorochrome dissous dans 5 mL de DMSO ont ensuite été ajoutés. Après agitation pendant 2 heures, 4 heures et 6 heures, le PM marqué a été précipité en ajoutant 10 volumes d'éthanol à 96%, puis lavé successivement avec de l'éthanol absolu, de l'acétone, et du diéthyléther. Le polysaccharide ainsi précipité a ensuite été lyophilisé.

II.1.2. Activité anti-microsporidienne du polysaccharide de *P. marinum*

Les tests d'infection ont été réalisés afin d'identifier d'un point de vue fonctionnel les interactions du polysaccharide PM avec les cellules-hôtes et/ou les spores d'*E. cuniculi* en lien avec les capacités d'infection. Afin d'évaluer l'activité fonctionnelle du polysaccharide de PM sur les cellules-hôtes et les parasites (spores), des cellules HFF ainsi que des spores ont été incubées avec le PM à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pendant 1h à 37°C . Après élimination du milieu contenant le PM, 2×10^6 spores. mL^{-1} non traitées ont été ajoutée aux cellules HFF pré-traitées. Des spores pré-traitées avec le PM ont également été ajoutés aux cellules HFF non traitées. L'incubation et la révélation des foyers infectieux ont été effectuées en suivant le même protocole FISH décrit précédemment (cf. paragraphe I.2.2.3.1).

II.1.3. Localisation du polysaccharide *i.e.* sur la cellule-hôte ou sur le parasite

Des cellules HFF ont étéensemencées dans du milieu de culture à une densité cellulaire de $4 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ sur des lamelles déposées dans des boîtes 24 puits. Les cellules ont ensuite été incubées dans une étuve à 37°C , 5% de CO_2 , pendant environ 48 heures jusqu'à l'obtention de

cellules à confluence. Le milieu a été remplacé par du milieu frais contenant le polysaccharide marqué dilué à $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ et $200 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ et les cellules ont été placées pendant 1 heure à 37°C , 5% de CO_2 . Après élimination du milieu et un lavage au PBS, les cellules ont été fixées au PFA 4%. En parallèle, des spores purifiées ont également été mises en contact avec le polysaccharide de PM marqué aux mêmes concentrations que les cellules pendant 1 heure à 37°C . Les spores ont été centrifugées à $6000 \times g$ pendant 5 minutes, le surnageant a été éliminé et des frottis de spores ont été montés sur des lames en déposant $3 \mu\text{L}$ de liquide de montage Prolong Diamond, et ont été conservées à l'obscurité jusqu'à leur observation au microscope.

II.2. Production du polysaccharide de *Porphyridium marinum* en photobioréacteur

La croissance d'organismes en condition photoautotrophe apparaît comme fortement dépendante de l'éclairage apporté à la culture et des conditions physico-chimiques du milieu de culture (température, pH et composition en nutriments). C'est donc pour cela que la production de l'exopolysaccharide de *P. marinum* a été réalisée en photobioréacteur de 25L pendant 46 jours selon le protocole développé par Soanen et al. 2016 (Soanen et al., 2016). La production du polysaccharide a donc été réalisée à une température de 24°C en maintenant un pH entre 8 et 8,5 avec des prélèvements réguliers afin de suivre la consommation de nitrates et la production de sucres. Le dosage de nitrates a permis de mettre en évidence le début de la phase stationnaire de croissance à J27 et donc le début de la production de polysaccharides par les microalgues. Le dosage de sucres (Dubois et al., 1956), a permis de suivre la production de sucre au cours de la culture et ainsi déterminer le taux de sucre final, en équivalent glucose, à $1,2 \text{ g}.\text{L}^{-1}$. La purification du surnageant de culture dans le but d'éliminer les sels, protéines ou encore les débris cellulaires est essentielle. Pour cela, nous avons choisi d'effectuer une première filtration en cascade sur verre fritté de porosité différente (P1 (160 à $250 \mu\text{m}$), P2 (40 à $100 \mu\text{m}$) et P3 (16 à $40 \mu\text{m}$)) afin d'éliminer les débris les plus importants, qui pourraient être responsables de l'obstruction de la membrane de diafiltration. La diafiltration a, quant à elle, été réalisée en plusieurs fois avec une membrane de 100 kDa en fixant la vitesse de la pompe à 30%. La diafiltration de chaque batch soit environ 3 kg de surnageant a pris 5h. La conductivité du surnageant diafiltré a été prise au cours du temps afin d'évaluer la quantité de sels restante. Les surnageants de départ avaient une conductivité d'environ 37 mS/cm à $\pm 26^\circ\text{C}$. Après

diafiltration, la conductivité était d'environ 0,265 mS/cm à environ 26°C. Une fois la diafiltration terminée, nous avons congelé les surnageants pour pouvoir ensuite les lyophiliser. Après lyophilisation, nous avons 25 g de polysaccharide purifié.

II.2.1 Dosage des nitrates

La détermination des nitrates est réalisée par la méthode de Cawse (Cawse, 1967) modifiée selon (A.P.H.A, 1971). Une gamme étalon avec une solution mère (SM) de nitrate de sodium (NaNO_3) à 0,5 g.L⁻¹ a été réalisée comme suit :

SM (0,5 g.L ⁻¹) en μL	0	250	500	750	1000
Eau en mL	5	4,750	4,5	4,25	4,00
NaNO_3 en g.L ⁻¹	0	0,025	0,050	0,075	0,100

200 μL d'échantillon et 1,8 mL d'acide perchlorique à 5% ont été déposés dans des tubes. Le zéro d'absorbance est effectué sur le tube « 0 » de la gamme à 210 nm. Les absorbances ont été lues dans des cuves quartz à 210 nm et à 275 nm.

Les DO de la gamme sont égales à la DO_{210} .

$\text{DO}_{\text{échantillon}} = \text{DO}_{\text{mesurée à 210 nm}} - 2 \times (\text{DO}_{\text{éch 275nm}} - \text{moyenne des DO}_{\text{gamme 275nm}})$.

II.2.2 Dosage des sucres totaux selon la méthode Dubois

Afin de doser les sucres présents dans le surnageant selon Dubois et al., 1956, il est nécessaire d'éliminer au préalable les cellules ainsi que les sels, nitrates et/ou nitrites qui pourraient interférer avec le dosage.

Pour ce faire, la culture a été centrifugée à 5000 x g, 20°C pendant 10 min. 4 mL de surnageant (échantillon) ont été récupérés, déposés dans une colonne de 10 kDa et centrifugés pendant 10 min à 7500 x g. Le filtrat a été éliminé en mesurant le volume récupéré. Le volume filtré a été ajouté en eau distillée et centrifugé de nouveau. Ces étapes ont été réalisées deux fois. À la fin de la centrifugation, la conductivité de l'échantillon a été vérifiée. Une gamme étalon de glucose a été réalisée comme suit :

	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
Eau (μL)	500	400	300	200	100	
Glucose 0,1 g.L ⁻¹ (μL)		100	200	300	400	500

Dans un Falcon de 15 mL, 500 µL d'échantillon ou des solutions de glucose ou d'eau pour le blanc et 500 µL de phénol à 50 g.L⁻¹ ont été ajoutés. 2,5 mL d'acide sulfurique concentré >96% ont été déposés dans les Falcon. Une incubation de 10 min à TA a été réalisée sans mélanger les tubes. Puis une homogénéisation vigoureuse pendant 10 secondes (3000 rpm au vortex) a été effectuée suivie d'une nouvelle incubation de 15 min à TA puis 30 min à 35°C.

L'absorbance a ensuite été mesurée à 483 nm avec comme blanc l'échantillon sans glucose.

II.2.3. Purification du surnageant de culture par diafiltration

Afin d'éliminer les débris cellulaires, les sels résiduels, une méthode par diafiltration sur une membrane de 100 kDa a été adoptée et précédée d'une filtration sur verres frittés de porosité P1 (160 à 250 µm), P2 (40 à 100 µm) et P3 (16 à 40 µm). La diafiltration a été réalisée à vitesse constante (30%) avec une température cible d'environ 30-35°C. Une fois le polysaccharide purifié récupéré, celui-ci a été congelé à -20°C puis à -80°C pour pouvoir le lyophiliser par la suite.

II.3. Criblage de nouveaux polysaccharides à activité anti-microsporidienne

II.3.1. Activité anti-microsporidienne de polysaccharides sur abeilles infectées par *N. ceranae*

Toutes les expériences ont été effectuées sur des abeilles domestiques européennes *Apis mellifera* (Race Buckfast). Quatre cadres de couvain operculés issus de deux colonies ont été récupérés au rucher du LMGE et placés à l'étude à 33°C, (hygrométrie 60-70%) pendant 24 à 48h. Les abeilles émergentes ont été collectées, placées dans des cagettes d'élevage à raison de 50 abeilles par cagette. Durant cette période, les abeilles en cagettes ont été nourries avec 50% (p/v) de sirop de sucrose complété avec 1% (p/v) de protéines (Provita'bee, BiovéLaboratory) (sirop 51) *ad libitum*. Pour obtenir un environnement similaire à celui des colonies, un bout de PseudoQueen® (Contech Entreprises Inc.) libérant des phéromones mandibulaires de reine a été placé dans chaque cagette. Après trois jours de nourrissage, quatre groupes expérimentaux ont été formés : (i) contrôles non infectés (ii) infectés avec *N. ceranae*, (iii) infectés avec *N. ceranae* nourris avec du sirop complété avec chaque polysaccharide (P1, P2, P3, P4, P5, P6 et PM) dilué à 200 µg.mL⁻¹. Trois réplicats ont été réalisés pour chaque groupe expérimental. Les traitements (fumagilline molécule de référence anti-

microsporidienne et polysaccharides) ont été administrés 3 jours avant l'infection qui a eu lieu 4 jours après l'émergence des abeilles. Les abeilles ont été infectées de manière collective avec une solution de spores de *N. ceranae* diluée dans du sirop 51 de manière à obtenir 10^4 spores par abeille dans 3 mL final de sirop de nourrissage. Le sirop 51 est constitué de 50% de saccharose (dilué dans de l'eau distillée), additionné de 1% de complément alimentaire Provita'Bee (Laboratoires CORYLIS). Les abeilles ont ensuite été nourries *ad libitum* pendant 21 jours avec du sirop 51 complété ou pas avec la fumagilline ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou les polysaccharides ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) selon les groupes expérimentaux. Les tubes de nourrissage ont été changés tous les deux jours. Les abeilles mortes ont été enlevées et comptées tous les jours, jusqu'à la fin de l'expérience. À la fin de l'expérience, les abeilles ont été sacrifiées et leur abdomen a été disséqué et homogénéisé dans du PBS grâce à un broyeur tissulaire. La suspension obtenue a été centrifugée à $8000 \times g$ pendant 5 min et le culot a été remis en suspension avec du PBS. La charge parasitaire présente dans les intestins d'abeilles de chacune des modalités testées, un test de Kolmogorow-Smirnov a été effectué avec un *p*-value de 0,05. Le taux de mortalité quant à lui a été analysé par le test de Cox-Mantel et représenté par une courbe de Kaplan-Meier.

Résultats

EcRBL-1 (ECU08_1730)

MMLIALCMMGVVLGFKITAKNNEGKFLINNNGKAVMSESGKPAEFKTDEVSPGVKIVTDK
NTNKVLDIEGSKTNLIFYSRHGQENQRFTFVGEGDVIYIKSGDGCLEYDSNGKMYRTTC
SAKDQQRFKIVYSLGDPGYKPPVEVPVPAAPENPSTQDLLES^SSSQALSGSANAHAPPQV
LIFNGKKS^HSHSWHHNPYEDESSIYGDSCLIV

AaRBL-1 (H312_01328)

MLIFFLSIKTLLIKVQNNLGFVAFDGTYLFTQTPNIKEASEFEFIQNENGIDFYIQLAKTN
LVWDYPRQDFGGNIILYRFHGGSN^QKWRLIFNKL^GSLNIVNNDRRRVYNEYTNLFTTKKI
NEYMNGEEGFVIFDEKMHYFDFFNHVPVQ^NIMNVPSIEHLLPLGKELRK^PSPNIGGP^{SSA}
PPIMPLGPVNMHEQMFLNQMG

AaRBL-2 (H311_02755)

MTLTKYIIILSLF^INYSIS^FVIQERSTGRYLSSKNMGVVALVEDIRQASPYIIRAVGNSP
IDMAITDKKSKLALDFAADGPD^LISYS^SSTNQLFKLNLDENGYWQIIQGTEKYLYYDP
ETSKLKGGPYDVSKTVGFMLFADDGIGPFPVMKGAKLP^SPIPPVYPEAPLLPENEASFAP
K*

Figure 15 : Séquences protéiques d'*EcRBL-1*, *AaRBL-1* et *AaRBL-2*. Les domaines putatifs Ricin B Lectin (IPR035992) sont encadrés en bleu. Les peptides signaux obtenus avec SignalP pour *EcRBL-1* et *AaRBL-2* sont soulignés; les sites potentiels d'*O*-glycosylation sont indiqués en gras et les *N*-glycosylation sont soulignés et en gras.

Résultats

I. Recherche de protéines impliquées dans l'adhésion

I.1. Approche *in silico*

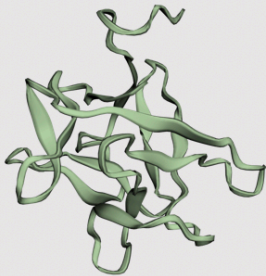
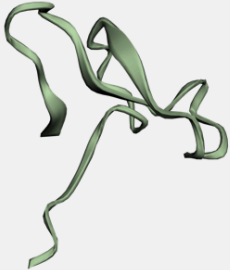
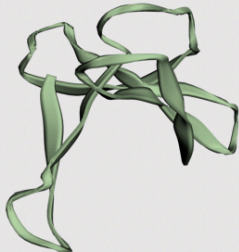
I.1.1. Identification de protéines candidates de surface par recherche de motifs

Les banques de données de séquences chez *E. cuniculi* et *A. algerae* ont été exploitées pour cribler et sélectionner des protéines candidates par une approche bio-informatique sur la base de la recherche de motifs spécifiques d'adressage pariétal ou extracellulaire, de peptide signal de sécrétion et de présence de domaine de liaisons à des carbohydrates.

Notre stratégie nous a permis d'identifier une première protéine hypothétique d'*E. cuniculi*, composée de 214 acides aminés avec un poids moléculaire (PM) prédit de 23,4 kDa. Cette protéine nommée *EcRBLL-1* a démontré un score significatif de prédiction extracellulaire, associé à l'identification d'un site de clivage entre les acides aminés A19 et K20 en lien probable avec la présence d'un peptide signal. Un domaine putatif de liaison aux carbohydrates apparenté aux Ricin B lectin like (RBLL) a été identifié dans la région s'étendant des acides aminés aa54 à aa153. La recherche de sites de glycosylation d'*EcRBLL-1* a fait apparaître la prédiction d'un site potentiel de *N*-glycosylation sur le résidu Asparagine en position 153 (N153) et de 6 d'*O*-glycosylation sur les résidus S155, T156, S162, S164, S191 et S193 (**Figure 15**).

De la même manière, deux protéines hypothétiques nommées *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2* ont été identifiées chez *A. algerae*. *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2* et sont composées de 202 et 181 acides aminés respectivement, avec un PM de 23,4 kDa pour *AaRBLL-1* et 20,2 kDa pour *AaRBLL-2*. Aucun peptide signal n'a été prédit pour *AaRBLL-1* alors que pour *AaRBLL-2*, un peptide signal a été identifié avec l'outil SignalP de MicrosporidiaDB (version Juin 2020). WoLF PSORT a prédit une localisation nucléaire et extracellulaire d'*AaRBLL-1* et *AaRBLL-2* respectivement. La recherche de domaines de liaison aux carbohydrates a mis en évidence la présence de domaines RBLL à la fois pour *AaRBLL-1* et pour *AaRBLL-2*, localisés entre aa38 et aa102 et entre aa65 et aa120, respectivement (**Figure 15**). La présence de sites potentiels de glycosylations a été établie sur les deux protéines et sont de l'ordre de 3 sites d'*O*-glycosylation pour *AaRBLL-1*

Tableau 5 : Analyse de la structure et de la fonction des protéines RBLL obtenues avec l'outil Phyre2.

Protéines	Modèle 3D	Structure secondaire	Superfamille / famille /PDB molecule	Fiabilité	% identité
<i>EcRBLL-1</i> (ECU08_1730)		α helix (8%) β strand (41%)	β -glucanase	98.8	20
			Ricin-B-like lectin	98.6	17
			Sugar binding protein	98.4	16
			Hemagglutinin component	98.2	13
<i>AaRBLL-1</i> (MZ547653)		α helix (18%) β strand (47%)	Ricin-B-like lectin	96.1	32
			Agglutinin-1 b chain	95.5	20
			Hemagglutinin component	95.3	23
			β -glucanase	93.5	38
<i>AaRBLL-2</i> (MZ547654)		α helix (2%) β strand (50%)	β -glucanase	91.5	21
			Ricin-B-like lectin	91.4	24
			Hemagglutinin component	85.2	23
			Agglutinin	81.4	20

Selon cet algorithme, la précision potentielle du modèle est déterminée par le pourcentage d'identité entre nos séquences et modèles. De plus, un modèle avec un pourcentage d'identité faible (<15%) peut tout de même être utilisé tant que la fiabilité est élevée. Un match avec une fiabilité élevée >90% indique que la protéine adopte la structure globale indiquée par le modèle 3D.

(positions S171, S178 et S179), et d'un site d'*N*-glycosylation (N15) et d'*O*-glycosylation (S159) pour *Aa*RBLL-2.

Le degré de similarité entre les trois protéines RBLL a été analysé par alignement de séquence ce qui n'a révélé aucune homologie significative entre les séquences protéiques, suggérant leur appartenance à des protéines fonctionnellement distinctes. L'identification de domaines RBLL n'impliquerait pas une importante conservation de séquence en acide aminés, mais pourrait être associée à une organisation spécifique des structures secondaires et tertiaires au sein de ces domaines. Cette hypothèse a été confirmée avec la modélisation de la structure 3D des 3 protéines grâce à l'outil Phyre2. Les trois RBLL ont été associées à des modèles 3D d'agglutinine, de glucanase ou de Ricin B-Like Lectin, avec des indices de confiance (fiabilité du modèle) significativement élevés (>98%). La forte similarité structurale des domaines RBLL de ces modèles avec les protéines *Ec*RBLL-1, *Aa*RBLL-1 et *Aa*RBLL-2 s'associe à une composition majoritaire en feuillets β et un faible pourcentage de structure type hélices α , constituant une caractéristique retrouvée fréquemment dans les lectines (**Tableau 5**).

I.1.2. Recherche de protéines orthologues de protéines de surface complémentée par une analyse bio-informatique

En complément de l'approche strictement bio-informatique, une recherche chez *E. cuniculi* et *A. algerae*, de protéines de surface (paroi de la spore, SWP) orthologues à des protéines décrites dans la littérature chez d'autres espèces a également été explorée. La recherche de motifs (localisation pariétal, peptide signal, domaine de fixation aux sucres) sur ces protéines a été réalisée.

Les protéines *Aa*SWP7, *Aa*SWP12, *Ec*SWP5, *Ec*SWP7, *Ec*SWP9, *Ec*SWP12, *Ec*SWP26 ont été sélectionnées à l'appui des données publiées chez *N. bombycis*. Les protéines SWP26 et SWP12 chez *N. bombycis* (*Nb*SWP26 et *Nb*SWP12) ont été décrites avec une distribution marquée au niveau de l'exospore et possédant pour *Nb*SWP26 une implication dans les processus d'adhésion. La protéine SWP5 interagit quant à elle avec les protéines du tube polaire PTP2 et PTP3, et jouerait donc un rôle important dans le soutien de l'ancrage du tube polaire à la paroi des spores (Yang et al., 2018). Enfin, la protéine *Ec*SWP9 s'accumulerait au niveau du disque d'ancrage et dans la partie terminale du tube polaire extrudé (Yang et al., 2018) et serait impliquée dans le processus de germination alors que *Nb*SWP7 contribuerait à l'attachement de la spore à la cellule et au processus d'infection (Yang et al., 2018).

Tableau 6 : Récapitulatif des protéines sélectionnées par approche surfomics et *in silico*. Les candidats protéiques sélectionnés par approche surfomics proviennent des analyses bio-informatiques des résultats de spectrométrie de masse. Les résultats de spectrométrie de masse ont été générés grâce aux expérimentations de décapage.

Les protéines sélectionnées par approche *in silico* proviennent de la recherche basée sur la littérature et du criblage des bases de données (BD) selon des critères spécifiques tels que la présence d'un peptide signal, d'un domaine particulier de liaison aux carbohydrates et d'une prédiction de localisation extracellulaire.

Approche surfomics							
Résultats de spectrométrie de masse	Nom de la protéine	Numéro d'accesion	Poids moléculaire (kDa)	Prédiction localisation	Peptide signal	Fonction / Domaine	Résultats NetOGlyc (nombre de sites)
	<i>Aa</i> P6BE05	KI0AFA6BE05FM1 (BDL)	22,53	SWP ^a	∅	∅	∅
	<i>Aa</i> P13YM	KI0APB13YM20FM1 (BDL)	29,2	Extr. ^b	∅	∅	23
	<i>Aa</i> P696T	H311_01696T0 (MDB)	10,26	Extr.	19-20	∅	21
	<i>Aa</i> P3569	H311_03569T0 (MDB)	49,31	Extr.	21-22	Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site profile (IPR012640)	1
	<i>Aa</i> P04039	H311_04039T0 (MDB)	20,54	Extr.	20-21	∅	8
	<i>Aa</i> P03248	KCZ79357.1 (BDL)	91,18	∅	∅	Proteasome complex (IPR016643)	∅
	<i>Aa</i> RBL1-1	KCZ81250.1 (BDL)	23,4	∅	∅	Ricin B Lectin Like (IPR035992)	3
		MZ547653 (GB)					
<i>Aa</i> RBL1-2	H311_02755T0 (MDB)	20,02	Extr.	19-20	Ricin B Lectin Like (IPR035992)	1	
	MZ547654 (GB)						
Approche <i>in silico</i>							
Littérature	<i>Aa</i> SWP7	KIOAEA11YB06AHM1 (BDL)	29,28	Cyto. ^c	∅	∅	4
	<i>Aa</i> SWP12	KI0ARB6YG03FM1 (BDL)	27,2	Cyto.	∅	AH/BAR domain superfamily (IPR027267)	∅
	<i>Ec</i> SWP5	ECU07_0400 (MDB)	22,81	Mito ^d	∅	∅	8
	<i>Ec</i> SWP7	ECU11_1210 (MDB)	33	Extr.	23-24	∅	1
	<i>Ec</i> SWP9	ECU04_1630 (MDB)	44,47	Extr.	∅	∅	2
	<i>Ec</i> SWP12	ECU01_0420 (MDB)	27,36	Nucl. ^e	∅	AH/BAR domain superfamily (IPR027267)	5
	<i>Ec</i> SWP26	ECU05_0590 (MDB)	28,37	Extr.	15-26	∅	7
Criblage des BD	<i>Ec</i> RBL1-1	ECU08_1730 (MDB)	23,4	Extr.	19-20	Ricin B-like lectins (IPR035992)	6
	<i>Aa</i> RBL1-2	H311_02755T0 (MDB)	20,02	Extr.	19-20	Ricin B-like lectins (IPR035992)	1
MZ547654 (GB)							

^aSWP : Spore wall protein ; ^bExtr. : Extracellulaire ; ^cCyto. : Cytosolique ; ^dMito. : Mitochondrial ; ^eNucl. : Nucléaire

BDL : Base de données locale ; MDB: microsporidiaDB (<https://microsporidiadb.org/micro/app>) ; GB: GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Les résultats relatifs aux analyses bio-informatiques réalisées pour les protéines *AaSWP7*, *AaSWP12*, *EcSWP5*, *EcSWP7*, *EcSWP9*, *EcSWP12* et *EcSWP26* sont présentés dans le **tableau 6**. Malgré leur localisation établie au niveau de la paroi sporale, seule *EcSWP7* affiche une prédiction extracellulaire ou membranaire et la présence d'un peptide signal. Aucun domaine fonctionnel, notamment de liaison aux carbohydrates, n'a été identifié sur l'ensemble des protéines, mis à part un domaine Bin/Amphiphysin/RVs (BAR) pour *AaSWP12* et *EcSWP12* associé à diverses fonctions cellulaires telles que la biogenèse des organelles ou le trafic et le remodelage membranaire. Enfin, un nombre variable de sites potentiels de glycosylations a été prédit pour l'ensemble des protéines à l'exception de *AaSWP12*.

1.2. Approches surfomics

Les approches de surfomics ont eu pour objectif d'isoler et d'identifier des protéines localisées à la surface des spores de microsporidies potentiellement impliquées dans le processus d'adhésion avec la cellule hôte. L'obtention de spores purifiées d'*E. cuniculi* et d'*A. algerae* et la purification spécifique des protéines de surfaces ont été des pré-requis nécessaires aux analyses de caractérisation de ces protéines par spectrométrie de masse.

1.2.1. Validation d'une méthode de purification/enrichissement de spores

La séparation des divers stades de développement d'*E. cuniculi* et *A. algerae* a constitué une étape cruciale pour l'obtention de fractions de spores relativement pures, dont les protéines de surfaces seront par la suite extraites. Dans ce but, une purification sur gradient de Percoll des surnageants de culture a été réalisée pour les deux espèces de microsporidies. Le degré d'enrichissement/purification des spores a été évalué par microscopie, via l'utilisation de marqueurs spécifiques des différents stades. Le marqueur WGA est une lectine qui se lie à l'acide sialique et aux résidus N-acétylglycosamine marquant ainsi la paroi des spores. Le DY96 permet la visualisation des spores en se liant à la chitine pariétale des spores. Enfin, l'utilisation d'une sonde par la méthode FISH permet la visualisation uniquement des stades précoces de développement soit les mérontes, sporontes et sporoblastes, mais n'induit pas de marquage des spores en raison de l'incapacité de la sonde à traverser la paroi sporale. Les résultats des marquages effectués sur les fractions récoltées ont montré à la fois chez *E. cuniculi* et *A. algerae* des cellules présentant un marquage de la paroi avec les marqueurs WGA et le DY96, un

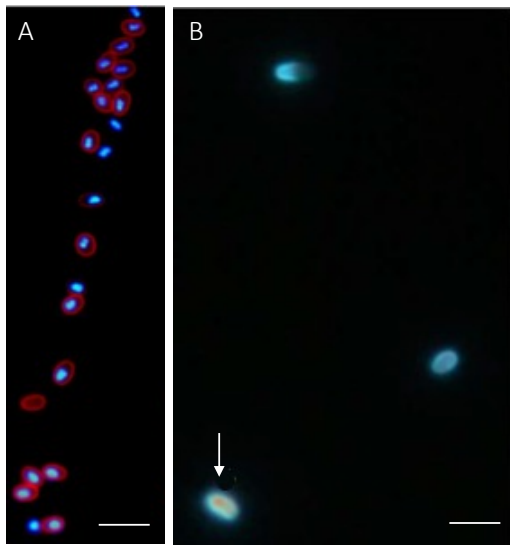


Figure 16 : Marquages de parasites d'*E. cuniculi* (de la fraction « culot ») obtenus après séparation des stades de développement par gradient de Percoll. Marquages des parasites au (A) WGA et DAPI et (B) par méthode FISH et DY96. Les marquages pariétaux au WGA et DY96, ainsi qu'au DAPI mettent en évidence la présence de la paroi et du matériel génétique. Une absence de marquage FISH, sauf pour quelques exceptions (indiqués par la flèche) a été observée. Ces marquages suggèrent par conséquent la présence majoritaire de spores dans les culots après purification sur gradient de Percoll. Échelle = 1 μm

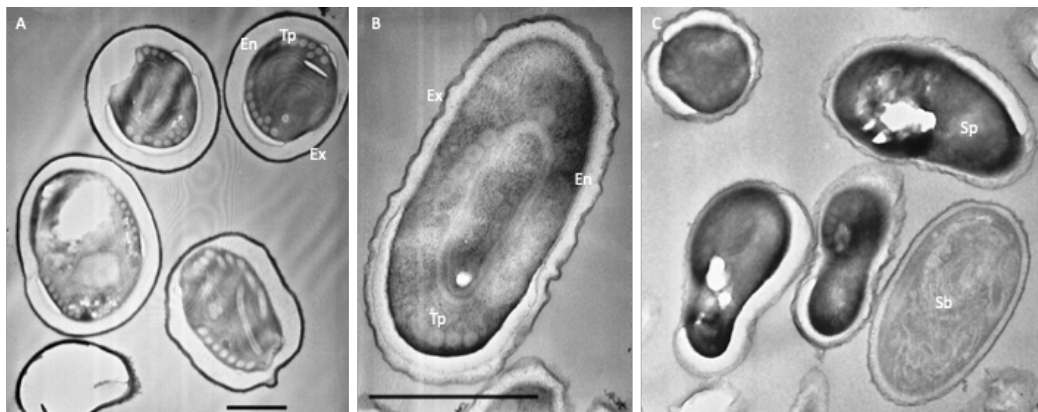


Figure 17 : Coupe obtenue par microscopie électronique à transmission (de la fraction « culot ») après purification par gradient de Percoll d'*Anncaliia algerae* et d'*Encephalitozoon cuniculi*. (A) La coupe met en évidence la présence majoritaire de spores d'*A. algerae*, caractérisées par leur forte densité aux électrons, la présence du tube polaire ainsi que de l'endospore et de l'exospore. (B) Spore d'*E. cuniculi* présentant le tube polaire, l'endospore ainsi que l'exospore. (C) Coupe présentant divers stades de développement d'*E. cuniculi*. En: Endospore; Ex: Exospore; Tp: Tube polaire; Sporonte; Sb: Sporoblaste. Échelle = 1 μm

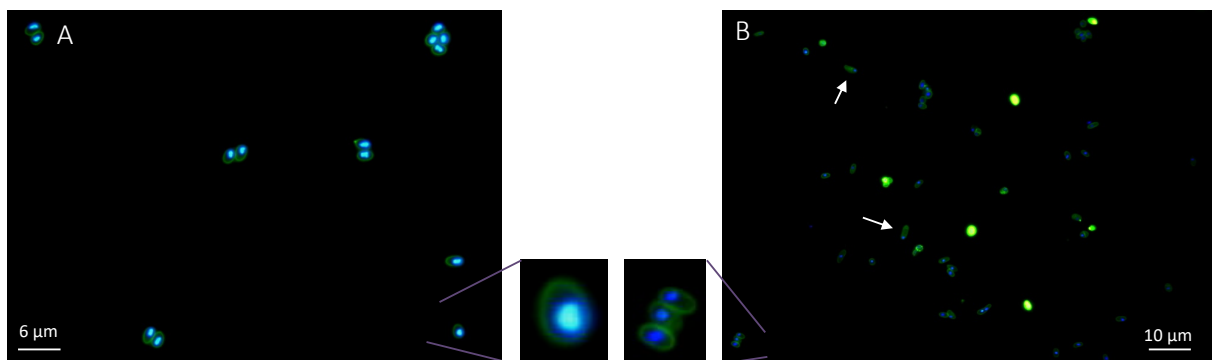


Figure 18 : Frottis de spores d'*Anncaliia algerae* et d'*Encephalitozoon cuniculi* biotinylées. Des spores ont été mises en contact avec de la biotine à $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ pendant 2h à 4°C puis ont été incubées avec de la streptavidine fluorescéine à $30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pendant 1h à TA. Les marquages de la paroi suggèrent que la biotinylation est efficace que ce soit pour (A) *A. algerae* et (B) *E. cuniculi*. Des stades de développement précoces sont visibles pour *E. cuniculi* (flèches blanches).

marquage au DAPI indiquant la présence de matériel génétique et l'absence de marquage en FISH (**Figure 16**). L'ensemble de ces résultats semble clairement indiquer l'efficacité de la purification sur gradient de Percoll, dans les conditions mises en place, pour l'obtention de fractions fortement enrichies en spores aussi bien pour *A. algerae* et d'*E. cuniculi*. Une analyse plus fine et complémentaire par microscopie électronique a été réalisée afin de vérifier ces résultats. L'analyse des clichés de coupes obtenues pour la fraction « culot » d'*A. algerae* met en évidence et confirme la présence majoritaire de spores, caractérisées par leur forte densité aux électrons ainsi que par la présence des structures caractéristiques comme le tube polaire, l'endospore et l'exospore (**Figure 17(A)**). Concernant *E. cuniculi*, la présence de spores a été également observée, mais des stades précoces de développement de type sporontes ou sporoplastes sont également présents en proportion non négligeable (**Figure 17 (B)(C)**). Le niveau insuffisant d'enrichissement en spore pour *E. cuniculi* nous a conduit à tester une méthode alternative de purification par ultracentrifugation sur un gradient de sucrose 0,23M-Percoll 70% (Taupin et al., 2006). Les fractions récoltées, analysées en microscopie à épifluorescence, ont présenté un contenu très majoritaire en spores (données non montrées), validant ainsi cette méthode pour *E. cuniculi*.

1.2.2. Extraction de protéines de surface de spores

L'extraction de protéines de surface de spores a été envisagée par trois approches différentes : (i) biotinylation des protéines de surface et purification des protéines biotinylées via la streptavidine, (ii) décapage des protéines de surface par traitement à la trypsine et (iii) par traitement au SDS chaud.

1.2.2.1. Biotinylation des protéines de surface de spores

La biotinylation des protéines de surface est la résultante de l'interaction de la biotine avec les amines primaires de polypeptides de surface, conduisant à la possibilité par la suite de purifier ces protéines biotinylées par chromatographie d'affinité basée sur la reconnaissance Biotine/Streptavidine. L'efficacité de la biotinylation des protéines de surface des spores d'*E. cuniculi* et *A. algerae* a été analysée sur les spores purifiées traitées avec quatre concentrations différentes (20, 15, 10 et 5 mg.mL⁻¹) de biotine. La révélation du marquage par la streptavidine-fluorescéine a permis de mettre en évidence un marquage spécifiquement localisé au niveau de la surface (paroi) des spores, quelle que soit la concentration en biotine utilisée (**Figure 18**).

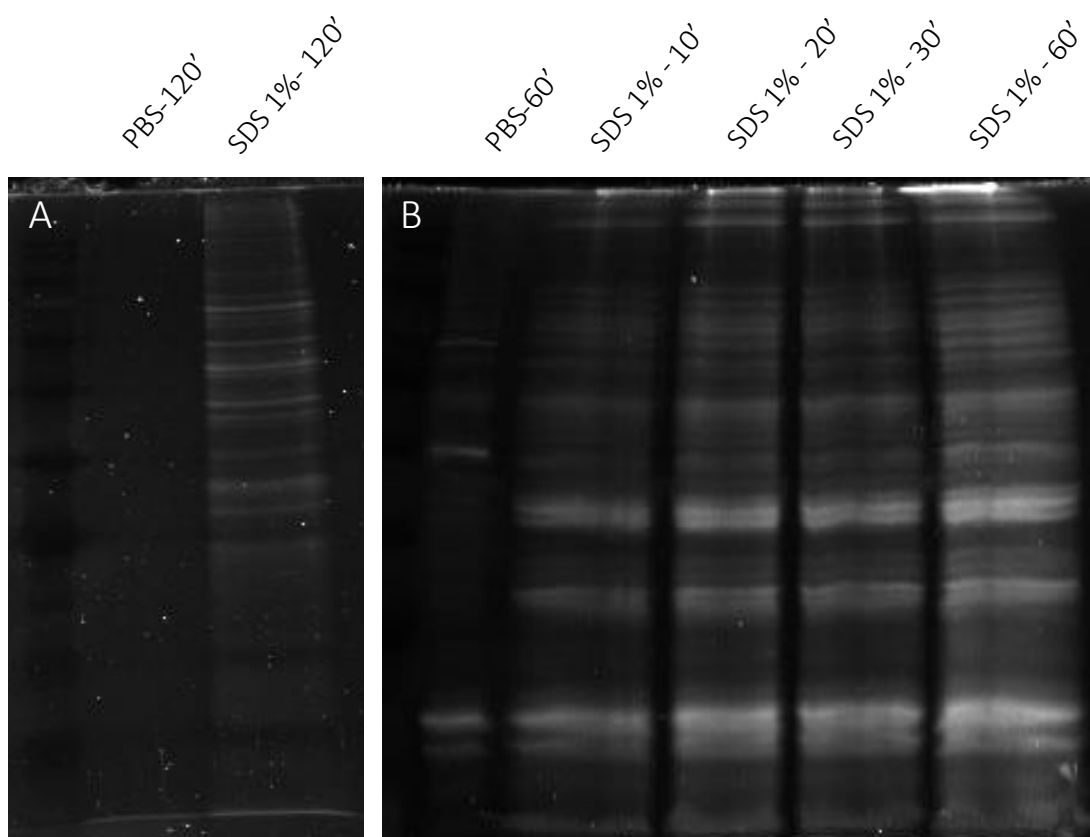


Figure 19 : Profils protéiques obtenus après traitements des spores de microsporidies. (A) Des spores d'*E. cuniculi* ont été incubées à 65°C soit en (i) PBS pendant 120 min, soit (ii) dans la solution de décapage pendant 120 min. **(B)** Les spores d'*A. algerae* ont été incubées à 65°C soit en (i) PBS pendant 60 min, soit dans la solution de décapage pendant (ii) 10 min, (iii) 20 min, (iv) 30 min ou (v) 60 min. Les spores ont ensuite été centrifugées, le surnageant a été récupéré et déposé sur gel SDS-PAGE 12%.

L'homogénéité du marquage sur l'ensemble des spores témoigne d'une importante efficacité de la biotinylation et permet d'envisager des rendements d'extraction des protéines de surface satisfaisants. Les étapes suivantes d'extraction et de purification sur chromatographie d'affinité (streptavidine) n'ont cependant pas été réalisées et temporairement mises en attente, en raison principalement des résultats positifs obtenus par la méthode de « shaving », qui a été réalisée en parallèle et qui s'avérait une méthode plus simple à mener jusqu'à l'analyse en spectrométrie de masse.

1.2.2.2. Décapage des protéines de surface de spores

En parallèle de l'approche de biotinylation, l'extraction des protéines de surface par un décapage ou « shaving » de ces protéines a été réalisée via deux méthodes, l'une basée sur le traitement des spores au SDS chaud, et l'autre s'appuyant sur le traitement enzymatique des spores à la trypsine en vue de digérer les protéines de la surface.

Le décapage des spores par traitement au SDS à 65°C a été testé avec différentes durées d'incubation des spores (10, 20, 30, 60 et 120 min) pour les deux espèces afin de déterminer les conditions les plus efficaces. À l'issue des traitements, les surnageants ont été analysés sur gel SDS-PAGE 12%, et la présence de protéines ou polypeptides libérés suite au décapage a été révélée par coloration au SYPRO Ruby. L'observation de profils protéiques (**Figure 19**) pour les différents échantillons analysés semble démontrer l'action du traitement au SDS chaud, avec cependant des efficacités différentes selon *E. cuniculi* et *A. algerae*. En effet, une incubation de 120 minutes pour les spores d'*E. cuniculi* a été nécessaire pour visualiser la présence de protéines relarguées dans le surnageant (**Figure 19A**), alors que pour *A. algerae*, un profil protéique a été observé dès 10 minutes de traitement des spores au SDS chaud (**Figure 19B**). L'analyse comparative des intensités des profils pour les deux espèces montre clairement une plus faible quantité de protéines extraites pour *E. cuniculi* par rapport à *A. algerae*, suggérant une sensibilité / réponse à l'action du SDS différente chez ces deux espèces. L'augmentation des temps de traitements au SDS chaud (10 à 60 minutes) des spores d'*A. algerae* semble avoir un effet significatif sur l'efficacité du décapage des protéines de surfaces, comme en témoigne l'intensité croissante des profils protéiques obtenus sur la cinétique 10-60 minutes (**Figure 19B**). Enfin, l'analyse des témoins correspondant à des traitements des spores à 65°C en absence de SDS, a permis de démontrer l'implication du SDS sur les effets de décapage, avec

l'absence totale de protéines observée pour le témoin *E. cuniculi* ou la présence de quelques bandes protéiques pour *A. algerae* (Figure 19).

En parallèle d'un décapage des spores par voie « chimique » au SDS, une alternative enzymatique utilisant la trypsine a été envisagée. Les spores ont été traitées par différentes concentrations en trypsine (0,5, 1 et 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). L'efficacité de la trypsinisation n'a pas été évaluée sur gel SDS-PAGE en raison de l'action protéolytique de la trypsine. En effet, nous avons considéré que l'activité protéasique de la trypsine pouvait conduire à l'obtention de populations peptidiques, donnant lieu à des profils de type « smears » sur les gels SDS-PAGE. L'obtention de tels profils n'aurait pas permis de discerner un effet réel de décapage des protéines de surfaces. Pour cette raison, l'efficacité de la trypsinisation a été analysée de façon indirecte par des tests fonctionnels d'infectivité (Cf. paragraphe suivant).

Enfin, dans le cadre du décapage des spores par voies chimique ou enzymatique, il nous est apparu important de s'assurer de l'intégrité des spores suites aux différents traitements, de sorte à s'affranchir de contaminations de protéines intracellulaires, pouvant être liées à des altérations structurales ou à l'induction de la germination des spores. Des frottis de spores suivis d'un marquage au DAPI ont été réalisés. Les résultats ont montré que, quels soient les traitements, les spores d'*E. cuniculi* et d'*A. algerae* avaient conservé leur intégrité, démontrée par le maintien du matériel génétique dans les spores, et indiquant ainsi l'absence de germination.

1.2.2.3. Évaluation du potentiel infectieux des spores « décapées »

Le caractère infectieux des spores traitées par la trypsine et au SDS chaud a été étudié afin d'estimer si les décapages réalisés ont potentiellement permis d'éliminer des protéines de surfaces impliquées dans l'infectivité des spores.

Les spores d'*A. algerae* et *E. cuniculi* issues de la trypsinisation semblent avoir conservé leur caractère infectieux, comparées aux spores témoins non trypsinées. Cela a été notamment démontré par la méthode FISH révélant la présence de nombreux foyers infectieux au niveau des cellules infectées avec des spores trypsinées à un niveau équivalent aux cellules infectées par les spores non traitées. Les résultats obtenus par la méthode ELISA ont confirmé le maintien du niveau infectieux des spores d'*E. cuniculi* traitées comparé aux spores non traitées. Au vu

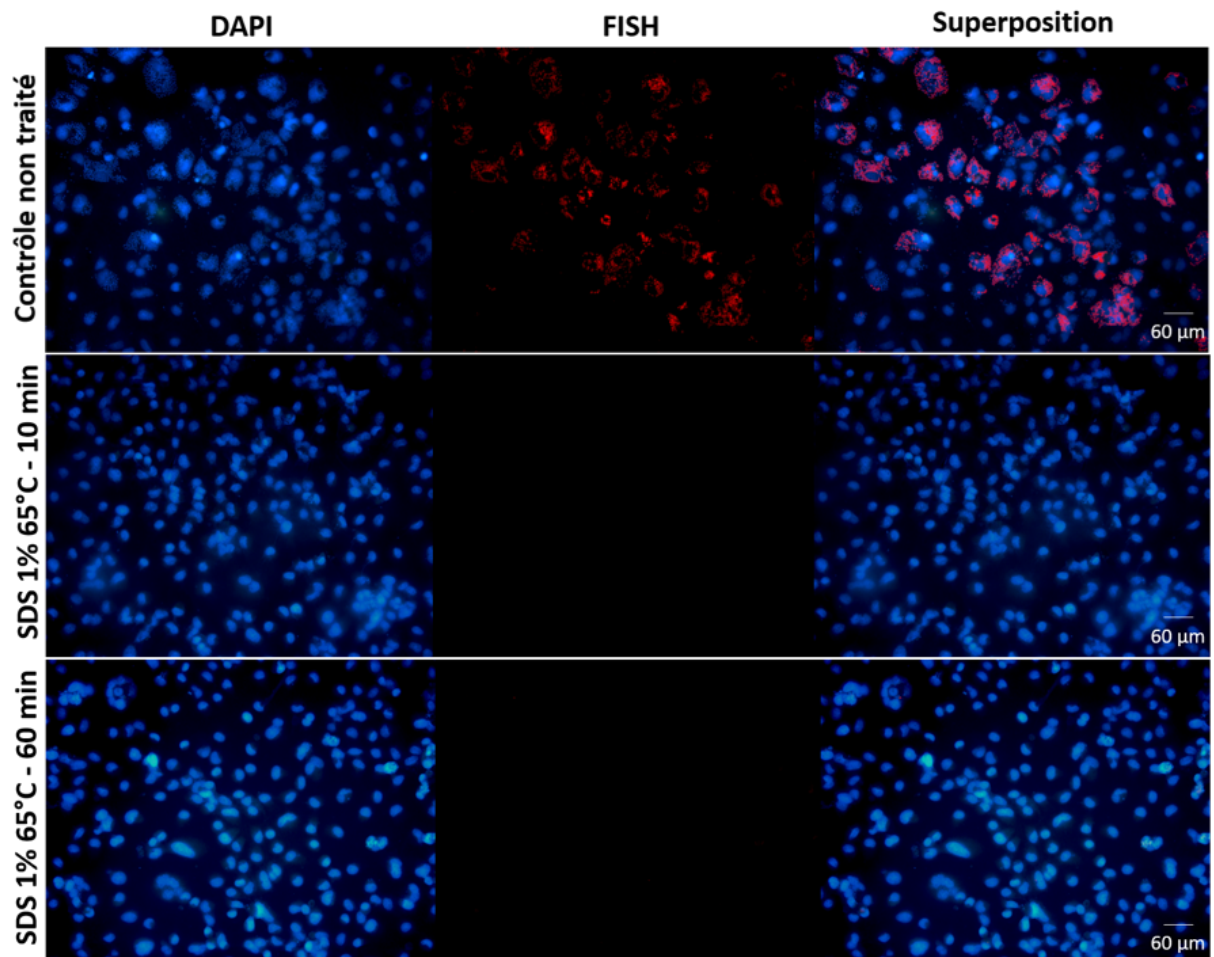


Figure 20 : Visualisation en FISH des foyers infectieux au niveau de cellules RK13 infectées par *Anncaliia algerae*. Des spores d'*A. algerae* ont été traitées avec une solution de SDS 1% chauffé à 65°C pendant 10 min ou 60 min puis ont été mises en contact avec les cellules. Les cellules ont été incubées avec 4×10^6 spores.mL⁻¹ pendant 4 jours. Aucun foyer infectieux n'est visible après un traitement des spores avec la solution de décapage pendant 10 min ou 60 min. X40

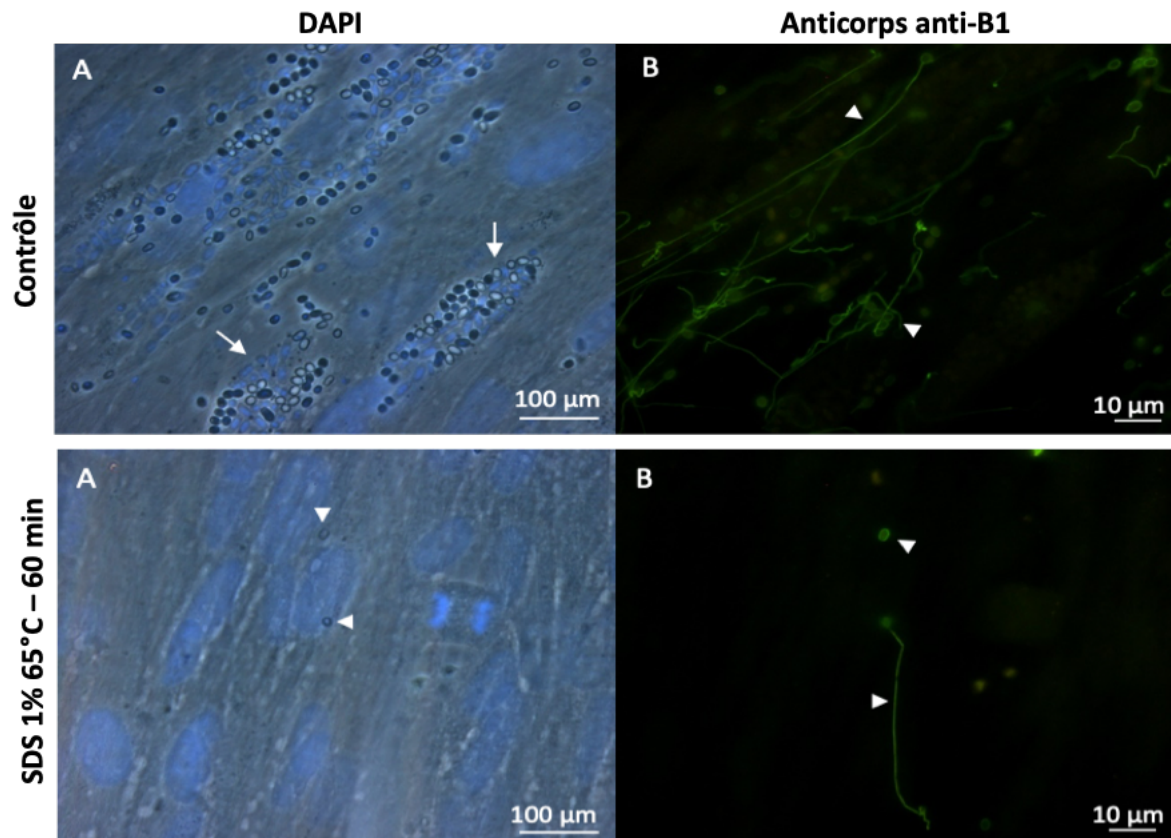


Figure 21 : Visualisation par immunofluorescence des spores d'*Anncaliia algerae* traitées par SDS dans des cellules MRC5 infectées après 4 jours d'infection. Des cellules MRC5 ont été infectées pendant 4 jours par des spores d'*A. algerae* soit non traitées (contrôle PBS 1X), soit traitées par une solution de SDS 1% chauffée à 65°C pendant 60 min. Les cellules fixées en PFA 4%, ont été perméabilisées en PBS-Triton 0,5% puis incubées avec l'anticorps anti-B1 ciblant la paroi et le tube polaire de la spore suivi par une incubation avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué à l'Alexa Fluor 488. Le marquage DAPI permet de visualiser des foyers infectieux (flèches blanches) dans le contrôle. Le marquage fluorescent permet de mettre en évidence la présence de nombreuses spores ainsi que de nombreux tubes polaires dévaginés (têtes de flèches). En revanche, dans la condition où les spores ont été traitées avec une solution de SDS 1% et chauffées à 65°C pendant 60 min, aucun foyer infectieux n'est visible en DAPI, seules quelques spores sont visibles (têtes de flèches) et un tube polaire est observable par fluorescence (tête de flèches). X100

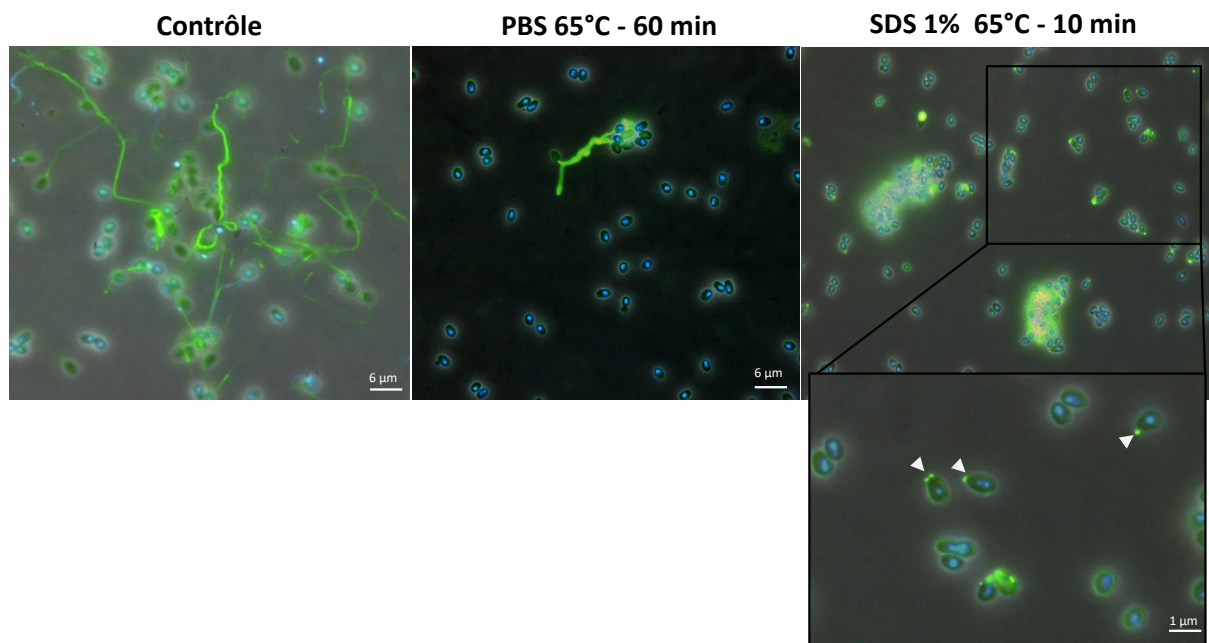


Figure 22 : Immunomarquage de frottis de spores d'*Anncaliia algerae*. Des spores d'*A. algerae* (i) non traitées (contrôle), (ii) PBS 65°C – 60 min, (iii) SDS 1% 65°C – 10 min ont été incubées dans une solution de germination (0,5M de NaCl, 0,5M de NaHCO₃, pH6) à 20°C pendant 2h. Les spores ont ensuite été fixées en méthanol, incubées avec l'anticorps anti-B1 ciblant la paroi et le tube polaire des spores d'*A. algerae* puis avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué à l'Alexa Fluor 488. Une contre coloration en DAPI a été réalisée afin de mettre en évidence les noyaux des spores. La solution de germination n'a pas permis de provoquer l'extrusion du tube polaire pour les spores d'*A. algerae* des spores chauffées dans du PBS chauffé à 65°C pendant 60 min et au SDS 1% à 65°C pendant 10 min. De plus, pour la condition SDS 1% 65°C – 10 min, un marquage plus intense est visible au pôle apical des spores (têtes de flèches).

de l'ensemble de ces observations, il semblerait que dans nos conditions expérimentales de trypsinisation des spores, la trypsine n'ait pas eu un effet décapant suffisant à la libération de protéines de surfaces impliqués dans l'adhésion et/ou l'infection.

L'infection de cellules RK13 par des spores d'*A. algerae* traitées par une solution de SDS 1% chauffé à 65°C a, en revanche, été diminuée significativement. L'effet sur le taux d'infection est visible à partir de 10 minutes de traitement des spores, et ce, même lorsque les cellules ont été infectées avec 2 fois plus de spores (**Figure 20**). Les résultats obtenus par la méthode ELISA concernant le potentiel infectieux des spores d'*E. cuniculi* n'ont quant à eux pas pu être interprétés. En effet, les valeurs obtenues pour le témoin infecté non traité (cellules infectées par des spores non traitées) à la fin de la révélation étaient similaires aux valeurs des cellules saines. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le sérum de lapin (naturellement infecté par *E. cuniculi*) utilisé n'était pas le même que précédemment et que les conditions d'utilisation optimale nécessitent d'être nouveau mises au point.

Le pouvoir infectieux des spores d'*A. algerae* traitées par SDS a également été visualisé par immunofluorescence suite à l'infection de cellules MRC5 pendant 4 jours (**Figure 21**). L'immunomarquage réalisé avec l'anticorps anti-B1 ciblant la paroi et le tube polaire permet de mettre en évidence dans le contrôle PBS 1X, une quantité importante de spores dévaginées avec la présence de nombreux tubes polaires. Le DAPI permet quant à lui de mettre en évidence la présence de foyers infectieux au sein des cellules. En revanche, pour la condition dans laquelle les spores ont été traitées avec une solution de SDS 1% chauffé à 65°C pendant 1h, une diminution importante des foyers infectieux et de spores dévaginées a été observée. Ces résultats indiquent que le traitement des spores au SDS 1% 65°C pendant 60 min a probablement permis d'éliminer des acteurs protéiques impliqués dans le processus d'infection.

Afin de mesurer l'impact du décapage au SDS sur la capacité à dévagner des spores d'*A. algerae*, des tests de germination ont été réalisés sur les spores (**Figure 22**). Pour cela, des spores d'*A. algerae* soit décapées au SDS pendant 10 min, soit chauffées dans du PBS pendant 60 min ou soit des spores non traitées, ont été incubées dans une solution de germination (0,5M de NaCl, 0,5M de NaHCO₃, pH6) à 20°C pendant 2h. Des frottis de spores sur lamelles ont ensuite été réalisés par dépôt de 50 µL de spores (5x10⁵ spores par frottis) pour chaque condition suivie d'un immunomarquage avec l'anticorps anti-B1 ciblant la paroi et le tube polaire. Dans la condition contrôle, la solution de germination a provoqué l'extrusion de

nombreux tubes polaires comme attendu. De manière intéressante, une diminution significative du nombre de tubes polaires est observable dans la condition SDS chauffée à 65°C pendant 10 min et dans PBS 65°C pendant 60 min. De plus, un marquage plus intense est visible au pôle apical des spores, seulement dans la condition où les spores ont été traitées au SDS. L'absence de germination ainsi que le marquage nous laisse ainsi penser que le traitement au SDS a modifié la surface de la spore et notamment les protéines potentiellement impliquées dans le processus de germination du tube polaire.

I.2.3. Caractérisation des fractions protéiques issues du shaving par analyse par spectrométrie de masse

Suite aux différents résultats décrits précédemment, nous avons décidé qu'il était plus pertinent de limiter l'analyse par spectrométrie de masse aux fractions protéiques obtenues pour *A. algerae*, et plus particulièrement celles issues du décapage au SDS chaud, incluant les conditions PBS-SDS 10min, PBS-SDS 1h et le témoin PBS chaud.

Les données brutes obtenues par analyses MS sont présentées dans l'**annexe 1**. Les données globales, incluant les 3 conditions, ont permis de faire état d'un total de 195 protéines, référencées par un N° d'identification et associées pour certaines d'entre elles à une identité fonctionnelle (nom de la protéine). L'analyse de ce référencement a permis de comptabiliser 81 protéines hypothétiques (« hypothetical proteins »), 94 protéines présentant uniquement un N° d'identifiant et 20 protéines associées à une fonction. Parmi ces 20 protéines, 17 sont apparentées à des métabolismes cellulaires divers (traduction, glycolyse, protéolyse, etc.), et les 3 autres ont été identifiés comme étant des protéines de surface, incluant 1 protéine de la paroi des spores SWP7 (AaSWP7_KIOAEA11YB06AHM1) et 2 protéines du tube polaire PTP2 et PTP3 (AaPTP2_KIOAKA23YJ18FM1 et AaPTP3_KIOAPB23YG12FM1). Plusieurs informations ont pu être apportées par ces résultats préliminaires, la première étant que les conditions de décapage au SDS chaud n'ont pas permis de s'affranchir totalement de la contamination de protéines intracellulaires comme en témoigne par exemple la présence de protéines ribosomales ou d'enzymes de la glycolyse. L'origine de ces contaminants peut s'expliquer par des phénomènes de lyse de certaines spores lors du décapage, ou par la présence de spores en cours de dévagination. Cette dernière hypothèse argumenterait également la présence de protéines du tube polaire, n'ayant pu être extraite qu'à partir de spores dévaginées. Enfin, l'identification d'AaSWP7 a également permis dans une certaine mesure de valider une

certaine efficacité de l'approche de décapage pour la purification des protéines de surface des spores.

Le référencement des 195 protéines, tel qu'il était présenté ne nous permettait pas de réaliser la sélection de candidats pour les approches d'immunolocalisation et fonctionnelle. Plus particulièrement, l'annotation des protéines, restreinte aux données de séquences chez *A. algerae*, limitait considérablement l'acquisition de données fonctionnelles, en raison du peu d'informations disponibles chez ce modèle parasitaire. C'est pourquoi une étude plus approfondie de l'appartenance fonctionnelle des 195 protéines a été envisagée par la recherche de protéines homologues chez d'autres espèces via l'utilisation de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Dans un premier temps, le référencement des protéines a été établi uniquement à l'appui des résultats du BLAST obtenus sur *A. algerae*, afin d'avoir une vision des informations complémentaires que pouvait apporter l'approche BLAST, par rapport aux données brutes établies en MS. Les résultats ont permis de montrer que 149 protéines sur les 195 (soit environ 76%) étaient annotées comme protéines hypothétiques (« hypothetical protein »), alors que seule 42% (82 sur 195) avaient été répertoriés en MS. Les 25% restant, soit 50 protéines, ont montré une appartenance à différents métabolismes cellulaires, incluant principalement la traduction (26 protéines) avec l'identification de sous-unités ribosomiques. Les 20 autres protéines ont été apparentées à des métabolismes divers tels que la glycolyse, la protéolyse (protéasome) et le métabolisme du tréhalose. Dans un second temps, l'analyse par BLAST, élargie à d'autres espèces, a conduit à donner une qualification fonctionnelle à 68 protéines parmi les 149 « hypothetical proteins » préalablement établie chez *A. algerae*. Cette reconsidération d'annotation s'est principalement appuyée sur les homologues de séquences ou de domaines fonctionnels de ces 68 protéines avec des protéines identifiées chez la microsporidie *Tubulinosema ratisbonensis*. Le bilan de ces études nous a permis à terme d'aboutir à un référencement finalisé des données de MS sur la base de 39% de protéines hypothétiques et 61 % de protéines ayant une identité fonctionnelle. Elles ont également permis d'identifier 3 protéines PTP3 supplémentaires (H311_01164T0, KCZ79867.1, KIOAPB3YL08AHM1) et une protéine de la paroi, SWP12 (198-908 Undeen).

L'analyse de la distribution des 195 protéines selon les conditions de décapage des spores (SDS 10 min, SDS 1h et témoin PBS) a été abordée à partir des données de MS (Annexe 1). Un total de 147 et 158 protéines ont été identifiées respectivement pour les traitements

Tableau 7 : Protéines sélectionnées par approche bio-informatique suite aux résultats obtenus par spectrométrie de masse. Les échantillons protéiques analysés par spectrométrie de masse proviennent du décapage de la surface des spores d'*A. algerae*.

Conditions	Numéro d'accension	Résultats blastp	Résultats Interpro	Résultats SignalP (position)	Résultats WolfPsort + score	Résultats NetOglyc	Microsporidiadb
PBS 1h	KCZ81720.1 (BDL)	Hypothetical protein H312_00899 (PRA339)	None	Oui (19-20)	Extr. ^a 6	20 sites	∅
SDS 1h et PBS 1h	H311_01551T0 (MDB)	Hypothetical protein H311_01551T0 (PRA109)	None	Non	Extr. 9	Non	∅
SDS 10 min	KCZ81250.1 (BDL)	Hypothetical protein H312_01328 (PRA339)	Ricin B Lectin Like	Non	Non	3 sites	Ricin B like lectin (IPR035992)
	AaRBLL-1 (MZ547653) (DB)						
3 conditions	KIOAEA11YB06AHM1 (BDL)	Hypothetical protein H311_00994 (PRA109) / H312_01036 (PRA339)	None	Non	Non	4 sites	∅
	KIOAAD35CC01FM1 (BDL)	Hypothetical protein H312_00433 / H312_00433 (PRA339)	None	Non	Extr. 5	16 sites	∅
	KIOAFA6BE05FM1 (BDL)	Prédiction SWP (IPR031513) / Hypothetical protein H312_00715 (PRA339)	None	Non	Non	Non	Spore wall protein (IPR031513)
	AaP6BE05						
	KIOAPB13YM20FM1 (BDL)	H312_02245 (PRA339)	None	Non	Extr. 15	23 sites	∅
	AaP13YM						
	KIOARB6YG03FM1 (BDL)	Spore wall protein 12 (Tubulinosema) / H311_01349 (PRA109) / H312_02974 (PRA339)	None	Non	Non	Non	BAR/IMD domain-like (IPR027267)
	KIOAKA7YE02AHM1 (BDL)	SWP25 / Hypothetical protein H312_03193 (PRA339)	None	Oui	Extr. 1	53 sites	Lysozyme-like (IPR023346)
	H311_01696T0 (MDB)	Hypothetical protein H311_01696T0 (PRA109)	None	Oui (19-20)	Extr. 16	21 sites	Peptide signal
	AaP696T						
	H311_02755T0 (MDB)	Hypothetical protein H311_02755 (PRA109)	Ricin B Lectin like	Non	Extr. 13	1 site	Ricin-B like lectin (IPR035992) / Peptide signal
	AaRBLL-2 (MZ547654) (GB)						
	H311_03569T0 (MDB)	Hypothetical protein H311_03569T0 (PRA109)	None	Oui (21-22)	Extr. 2	1 site	Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site profile (IPR012640)
	AaP3569						
	H311_04039T0 (MDB)	Hypothetical protein H311_04039T0	None	Oui (20-21)	Extr. 3	8 sites	∅
	KCZ82156.1 (BDL)	Hypothetical protein H312_00433 (PRA339)	None	Non	Extr. 6	14 sites	∅
	KCZ81185.1 (BDL)	Hypothetical protein H312_01395 (PRA339)	None	Non	Extr. 12	Non	Peptide signal
SDS 1h	KCZ79357.1 (BDL)	Hypothetical protein H312_03248 (PRA339)	Proteasome complex (IPR016643)	Non	Non	Non	ARM repeat (IPR016024) (Armadillo-like fold)
	AaP03248						

*Extr. : Extracellulaire.

En gras, les protéines sélectionnées (renommées) pour la production de protéines recombinantes

BDL : Base de données locale ; MDB: microsporidiaDB (<https://microsporidiadb.org/micro/app>) ; GB: GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

SDS 10min et SDS1h, et de façon surprenante, 168 protéines ont été obtenues dans la fraction témoin. Ce résultat inattendu dans le témoin, n'a pas trouvé d'explication cohérente notamment en relation avec les quantités faibles de protéines préalablement mis en évidence en SDS PAGE. Cela questionne sur le rôle de la chaleur et du SDS dans l'infectivité des spores. L'analyse comparative selon les différentes conditions a montré 75% des protéines retrouvées dans les 3 conditions de traitements, et 5,6%, 10,2% et 7,1% sont uniquement présentes respectivement dans la fraction SDS 10min, SDS 1h et témoin. Les protéines SWP7 et PTP2 ont été identifiées dans les 3 conditions, 2 des 3 protéines PTP3 dans la fraction SDS 10min et l'autre uniquement dans le témoin.

Au final, aucune corrélation exploitable entre la nature des protéines présentes dans les différentes fractions et la cinétique de traitement au SDS, n'a pu être établie afin d'orienter le choix de candidats pour les analyses fonctionnelles.

1.3. Protéines candidates sélectionnées

La quantité importante (195) de protéines de surface identifiées par analyses MS imposait de réaliser un tri pour sélectionner un nombre raisonnable de candidats pour conduire des études d'immunolocalisations et des tests fonctionnels. Le choix de ces protéines candidates a été réalisé en utilisant la même démarche que celle décrite dans l'approche *in silico*, la recherche de i) la présence de motifs d'adressage extracellulaire ou membranaire, et ii) la présence de domaines spécifiques (site de glycosylations, Carbohydrate Binding Domains). Pour cela, les mêmes algorithmes de prédictions de localisation membranaire ou extracellulaire (WoLF PSORT, SignalP), de glycosylations (NetOGlyc et NetNGlyc) et de domaines particuliers (Interpro et Microsporidiadb) ont été utilisés sur l'ensemble des 195 protéines.

Cette approche nous a permis d'isoler 16 protéines (**Tableau 7**) dont AaRBLL-1 et AaRBLL-2, précédemment isolées par l'approche *in silico* et, dont l'identification par l'approche surfomics confirme l'intérêt et la complémentarité des deux approches. Pour la suite de notre étude, 6 protéines parmi les 16 ont été sélectionnées (**Tableau 7**), 4 de ces protéines (AaP13YM, AaP696T, AaP3569 et AaP04039) étaient prédites extracellulaires et une protéine (AaP6BE05) a été prédite comme étant une protéine de la paroi (SWP). De plus, 3 de ces protéines (AaP696T, AaP3569 et AaP04039) ont été prédites comme possédant un peptide signal. Des sites d'O-glycosylation ont été prédits pour 4 de ces 6 protéines (AaP13YM, AaP696T, AaP3569 et AaP04039). En parallèle, nous avons également sélectionné la protéine AaP03248 retrouvée

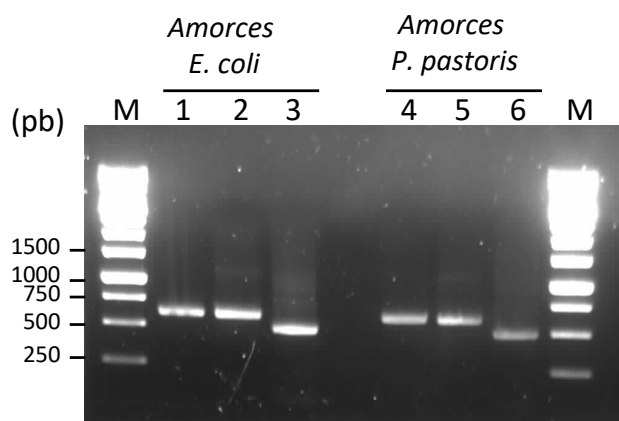


Figure 23 : Validation de la construction des vecteurs d'expression par électrophorèse sur gel d'agarose, des protéines *EcRBL-1* (Pistes 1 et 4), *AaRBL-1* (pistes 2 et 5) et *AaRBL-2* (pistes 3 et 6) dans les systèmes bactériens (*E. coli*) et levures (*P. pastoris*). Les bandes sont retrouvées aux tailles attendues soit à 575 bp, 609 bp et 546 bp pour *EcRBL-1*, *AaRBL-1* et *AaRBL-2* respectivement.

dans les résultats MS du traitement au SDS, pour son implication potentielle dans le protéasome. En effet, l'absence de germination des spores traitées au SDS et le marquage plus intense du pôle apical des spores, nous laissent penser que le traitement a pu dégrader des protéines telles que des protéases impliquées dans la rupture du capuchon polaire permettant ainsi la germination des spores.

Au final, la sélection des protéines pour les approches fonctionnelles s'est restreinte aux protéines *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1*, *EcSWP5*, *EcSWP9*, *EcSWP12*, et *EcSWP26*, identifiées par l'approche *in silico*, aux protéines *AaP13YM*, *AaP696T*, *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP6BE05Aa* et *AaP03248*, identifiées par l'approche surfomics, et aux protéines *AaSWP7* et *AaRBLL-2* isolées par les deux approches (**Tableau 7**).

II. Rôles des protéines RBLL dans l'adhésion

Les 3 protéines de type RBLL (*EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*), précédemment sélectionnées ont dans un premier temps fait l'objet d'une étude d'immunofluorescence afin de déterminer leur localisation dans la spore. L'analyse de leur rôle potentiel dans l'infection des cellules hôtes a été abordée par des études fonctionnelles basées sur des tests compétitifs d'inhibition de l'infection de la cellule hôte. Les résultats obtenus dans cette partie font l'objet d'un article actuellement en révision dans le journal *Parasitology International*.

II.1. Production de protéines recombinantes et génération des anticorps polyclonaux anti-RBLL

La production des protéines recombinantes *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2* a été réalisée afin de générer des anticorps spécifiques pour les études d'immunolocalisation. Ces protéines recombinantes ont également été utilisées comme agents compétiteurs dans le cadre des études fonctionnelles. L'expression de ces 3 protéines a été envisagée dans le système bactérien (*E. coli*) et levure (*P. pastoris*) afin de sélectionner le système le plus adapté en termes d'efficacité de production mais idéalement nous souhaitons tout produire dans le système *Pichia* pour obtenir des protéines glycosylées. Une première étape a consisté à la construction des vecteurs d'expressions, dans lesquels ont été clonés les 3 gènes de 575 pb, 609 pb et 546 pb codant respectivement pour *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2* obtenus par PCR (**Figure 23**). Au total, six constructions plasmidiques, incluant le clonage des 3 gènes dans

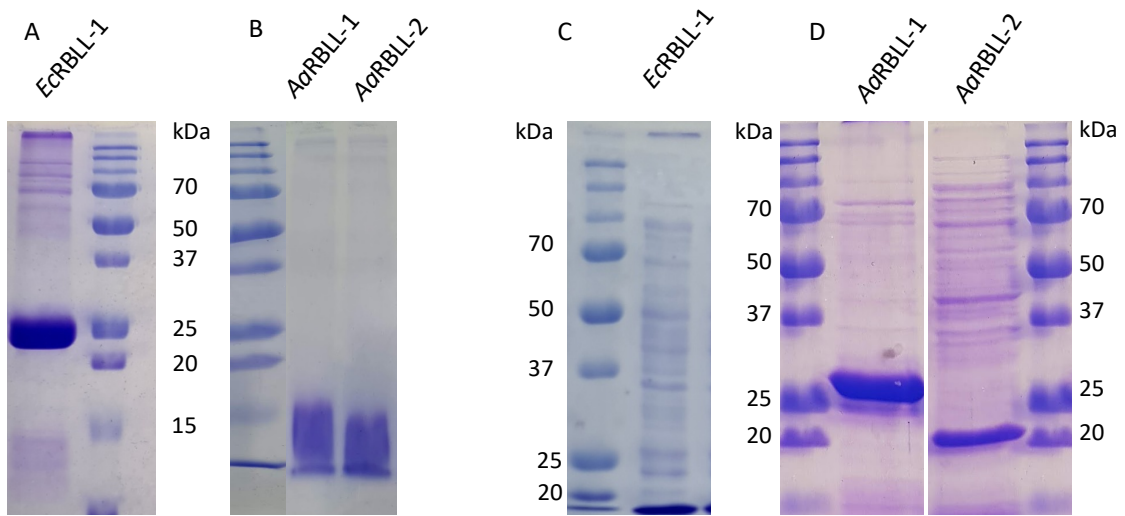


Figure 24 : Analyse de l'expression des protéines recombinantes sur gel SDS-PAGE à partir d'extraits protéiques issus de surnageant de culture de *P. pastoris* pour *EcRBLL-1* et des fractions protéiques totales d'*E. coli* pour *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*. Dans le surnageant de culture de *P. pastoris* (A) une protéine d'environ 25 kDa est détecté dans le surnageant de culture correspondant à la protéine *EcRBLL-1*. En revanche, (B) aucune bande n'est détectée pour les protéines *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*. Dans les fractions protéiques totales d'*E. coli* (C) aucune bande n'est visible pour *EcRBLL-1*. (D) Une bande est visible à environ 20-25 kDa pour *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*.

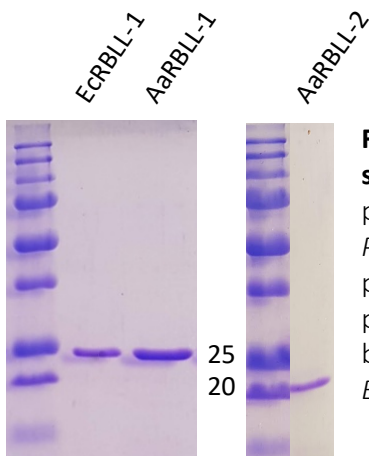


Figure 25 : Analyse sur gel SDS-PAGE des protéines purifiées sur colonne Nickel (IMAC) des protéines recombinantes. La purification a été réalisée à partir de surnageant de culture de *P. pastoris* pour *recEcRBLL-1*, de la fraction soluble d'*E. coli* pour *recAaRBLL-1* et insoluble pour *recAaRBLL-2*. Le degré de purification des protéines a été validé par la présence d'une bande unique pour chaque protéine à environ 25 kDa pour *EcRBLL-1* et *AaRBLL-2* et 20 kDa pour *AaRBLL-2*.

le vecteur d'expression bactérien pET28a et le vecteur d'expression levure pPICZ α -A, ont été obtenues et validées par séquençage. Après transformation des souches productrices, l'expression des protéines recombinantes a été analysée en SDS-PAGE à partir d'extraits protéiques issus de lysats bactériens ou de surnageant de culture considérant *Pichia*. L'analyse des profils protéiques totaux (fractions solubles et insolubles) obtenus chez *E. coli* révèle la surexpression d'une protéine de l'ordre de 20-25 kDa, correspondant aux tailles attendues pour A α RBLL-1 (23,4 kDa) et A α RBLL-2 (20 kDa), alors qu'aucune production d'EcRBLL-1 n'est clairement visible. La protéine recA α RBLL-2 s'est avérée être soluble, contrairement à recA α RBLL-1, identifiée dans la fraction insoluble des protéines extraites d'*E. coli*. À l'inverse, le système *Pichia* s'avère parfaitement adapté pour la production d'EcRBLL-1, pour laquelle une protéine soluble (sécrétée dans le surnageant de culture) d'environ 20-25 kDa a été détectée, contrairement aux deux autres protéines (**Figure 24**). Une des raisons possibles à la différence d'expression des 3 protéines observée selon les systèmes hétérologues peut s'expliquer par la fréquence d'utilisation des codons (ou « biais codons »), différente selon les organismes et impactant le niveau d'expression d'une protéine recombinante lors de la traduction.

À l'appui de ces résultats, les 3 protéines recombinantes recEcRBLL-1, recA α RBLL-1 et recA α RBLL-2 ont été purifiées sur colonne de Nickel (IMAC), à partir du surnageant de culture pour recEcRBLL-1 (*P. pastoris*), de la fraction protéique soluble pour recA α RBLL-2 (*E. coli*) et de la fraction insoluble pour recA α RBLL-1 (*E. coli*). L'analyse sur gel SDS-PAGE des protéines purifiées a montré la présence d'une bande unique à la taille attendue pour chaque protéine (entre 20 et 25 kDa) (**Figure 25**), validant ainsi un degré de purification satisfaisant et l'absence de protéines résiduelles contaminantes qui constituaient des pré-requis indispensables à leurs utilisations pour la production d'anticorps spécifiques.

Les anticorps polyclonaux contre les protéines EcRBLL-1, A α RBLL-1 et A α RBLL-2 ont été générés par l'immunisation de souris avec les 3 protéines recombinantes. La spécificité des anticorps polyclonaux a été analysée par Western blot, à la fois sur des extraits protéiques de spores et des extraits totaux de cellules-hôtes, utilisés comme contrôles négatifs. Comme montré sur la **figure 26**, une seule bande protéique a été détectée à environ 28 kDa avec l'anticorps anti-EcRBLL-1 dans les protéines sporales d'*E. cuniculi* et proche de 25 kDa et 20 kDa avec les anticorps anti-A α RBLL-1 et anti-A α RBLL-2 pour les protéines de spores d'*A. algerae*. L'observation de tailles légèrement supérieures aux poids moléculaires prédits de 23 kDa pour EcRBLL-1 et A α RBLL-2 pourrait être liée à des modifications post-traductionnelles, notamment

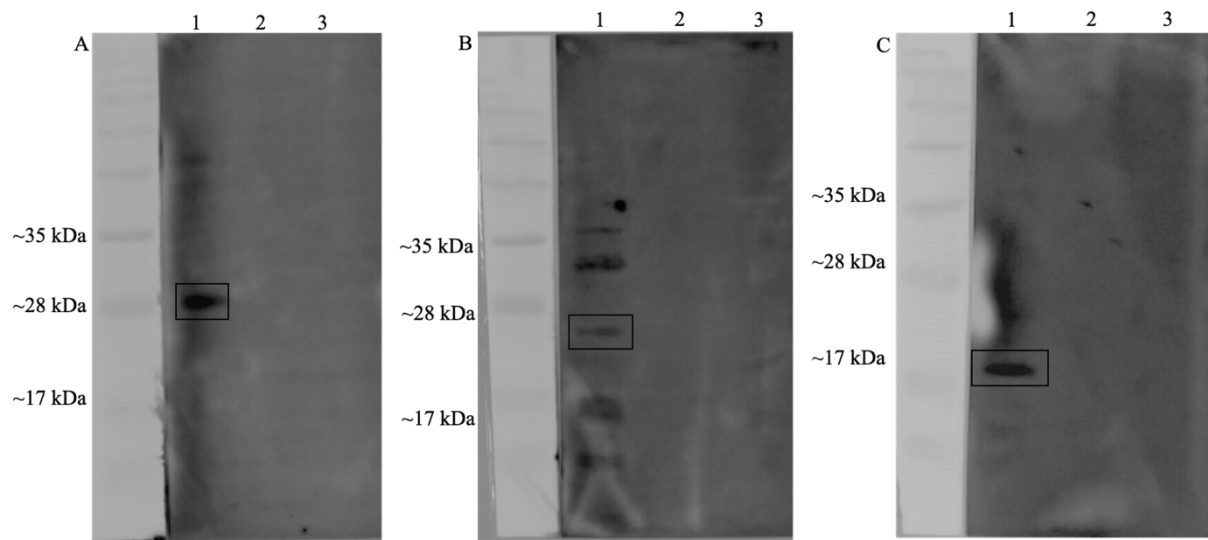


Figure 26 : Analyse par Western Blot des anticorps générés contre les protéines *EcRBL-1*, *AaRBL-1* et *AaRBL-2*. (A) Anticorps anti-*EcRBL-1*. Dans la piste 1, extrait total de protéines de spores d'*E. cuniculi*; piste 2, extrait protéique de cellules-hôtes (MRC-5); piste 3, extrait total de protéines de spores d'*A. algerae*. Une bande a été obtenue dans la piste 1 à environ 28 kDa. (B) Anticorps anti-*AaRBL-1* et (C) anti-*AaRBL-2*. Dans la piste 1, extrait total de protéines de spores d'*A. algerae*, piste 2, extrait protéique de cellules-hôtes (HFF); piste 3, extrait total de protéines de spores d'*E. cuniculi*. (B) Trois bandes ont été obtenues dans la piste 1, la première à environ 25 kDa et les deux autres au-dessus de la taille prédite et (C) une seule bande a été obtenue dans la piste 1 à environ 20 kDa. Aucune réaction croisée n'a été observée entre *E. cuniculi* et *A. algerae*.



Figure 27 : Localisation d'*EcRBL-1* chez *Encephalitozoon cuniculi*. Les spores ont été visualisées avec un microscope à fluorescence après une première incubation avec des anticorps polyclonaux anti-*EcRBL-1* suivi d'un autre marquage avec un sérum de lapin naturellement infecté par *E. cuniculi*. Le marquage fluorescent a démontré que les anticorps anti-*EcRBL-1* réagissent avec le tube polaire extrudé de la spore avec un marquage hétérogène le long du tube. Le sérum de lapin infecté par *E. cuniculi* a marqué la totalité du tube polaire ainsi que la paroi de la spore. Cependant, une fois les marquages superposés, l'extrémité du tube polaire est marquée seulement par l'anti-*EcRBL-1* (flèche).

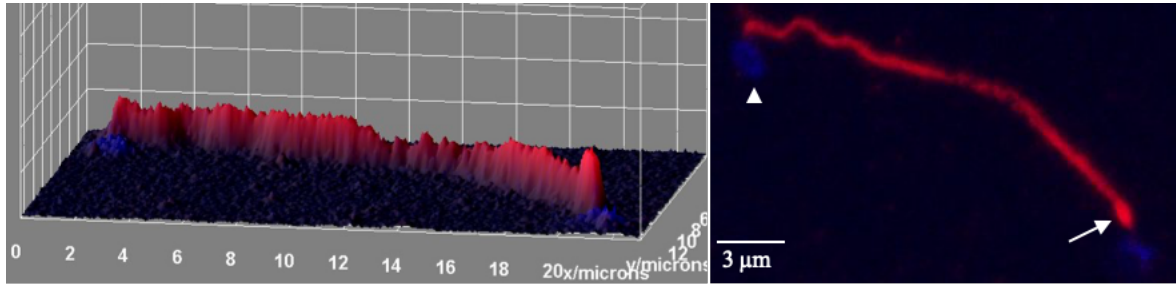


Figure 28 : Intensité des pixels de l'immunolocalisation d'*EcRBL-1* chez *Encephalitozoon cuniculi*. Les spores ont été visualisées avec un microscope confocal après incubation avec l'anticorps anti-*EcRBL-1*. Suite à cela, un graphique représentant l'intensité des pixels de l'image a été réalisé avec le logiciel ImageJ permettant de mettre en évidence l'inégalité de marquage, en particulier à l'extrémité du tube polaire (flèche). La tête de flèche met en évidence le matériel génétique de la spore (localisé sur le même plan que le tube polaire) avec une contre-coloration au DAPI, ce qui indique que le sporoplasme était toujours présent au sein de la spore.

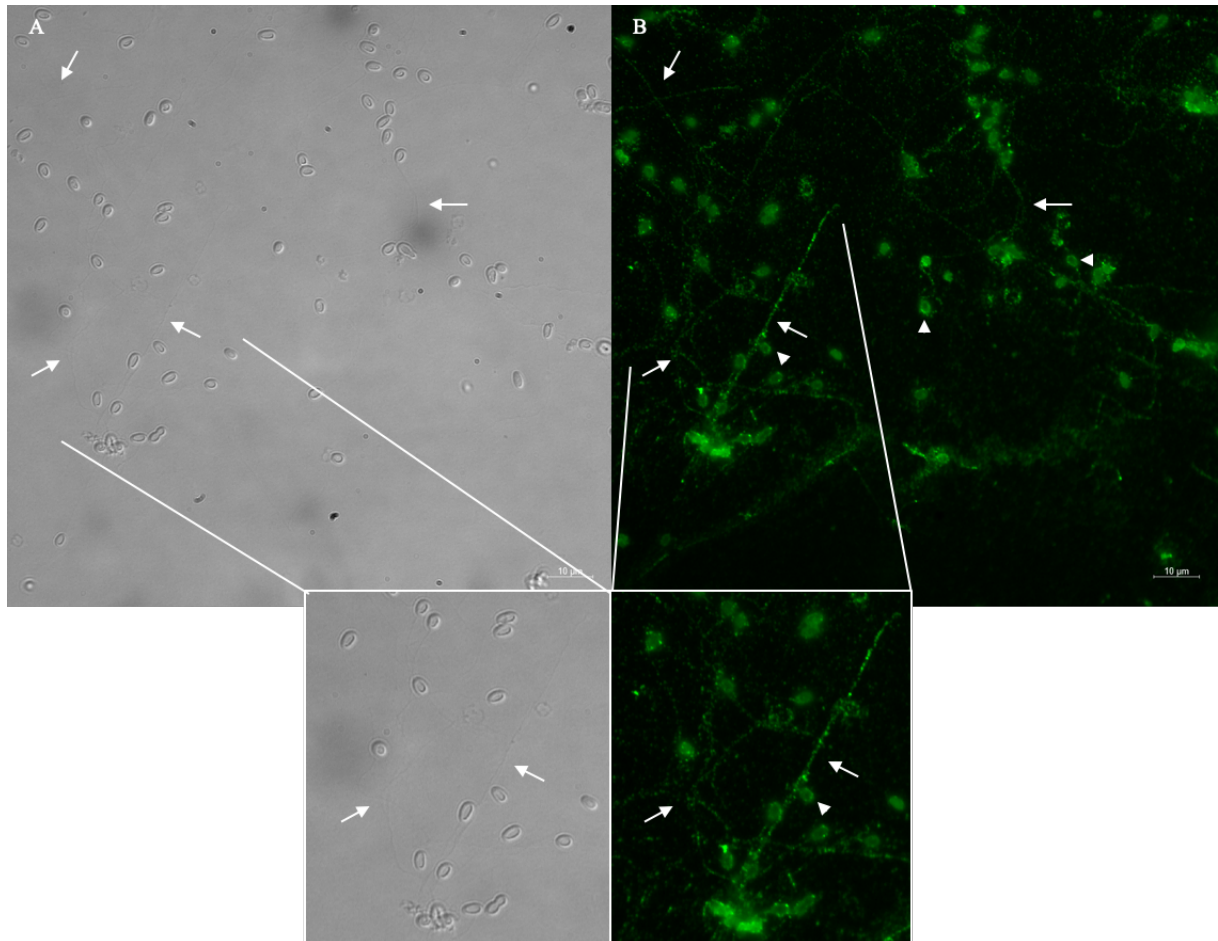


Figure 29 : Localisation d'*AaRBL-1* chez *Anncaliia algerae*. Les spores ont été observées avec un microscope à fluorescence après une première incubation avec les anticorps anti-*AaRBL-1* dilués au 100^{ème}. **(A)** La visualisation avec la lumière blanche permet de visualiser les spores et certains tubes polaire (flèche). **(B)** Un marquage de la paroi des spores (tête de flèche) ainsi que des tubes polaires (flèches) ont été observés.

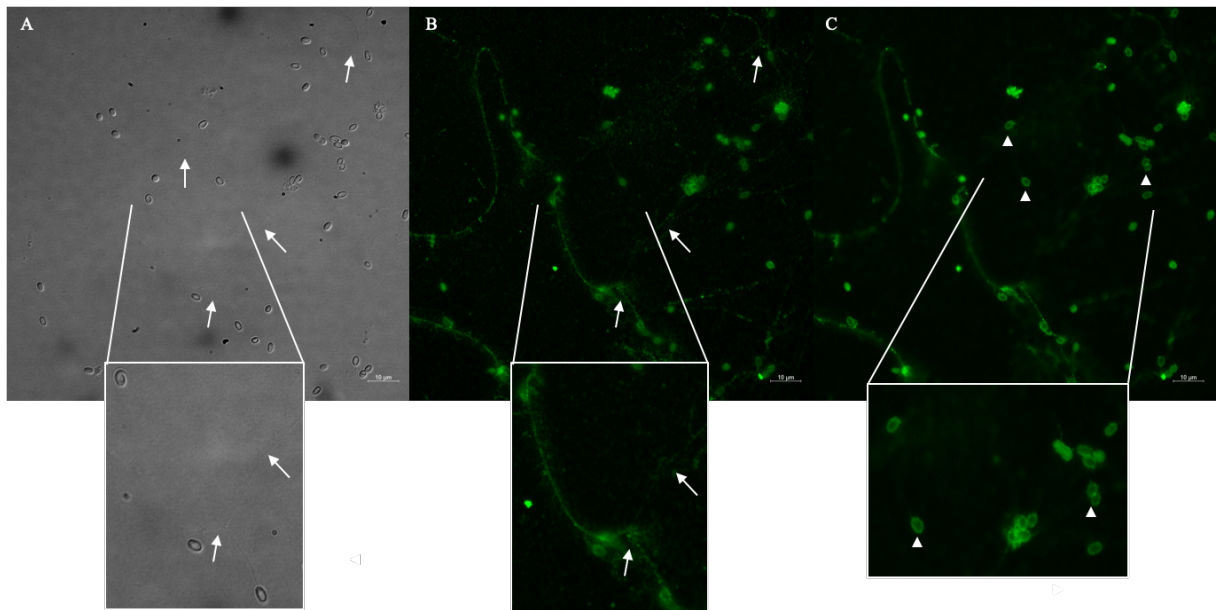


Figure 30 : Localisation d'AaRBLL-2 chez *Anncaliia algerae*. Les spores ont été observées avec un microscope à fluorescence après une première incubation avec les anticorps anti-AaRBLL-2 dilués au 100^{ème}. **(A)** La visualisation avec la lumière blanche permet de visualiser les spores et certains tubes polaire (flèche). **(B)** Un marquage des tubes polaires (flèches) ainsi que de la paroi des spores (tête de flèche) ont été observés.

de type glycosylations prédites par l'approche *in silico* réalisée sur ces protéines. Concernant les anticorps anti-A α RBL-1, deux bandes supplémentaires ont été détectées aux alentours de 35 kDa et 30 kDa qui pourraient correspondre à une réaction croisée des anticorps avec d'autres protéines RBL. Cette hypothèse est appuyée par les résultats des analyses bio-informatiques qui ont révélé l'existence, dans le protéome d'*A. algerae*, de nombreuses protéines RBL présentant des poids moléculaires estimés proches des bandes visibles observées en Western blot. Par ailleurs, aucune hybridation croisée n'a été observée avec chacun des anticorps entre les protéines d'*E. cuniculi* et *A. algerae*. Aucun signal n'a été obtenu sur les témoins négatifs d'extraits totaux de cellules hôtes. L'ensemble de ces résultats a permis de valider les anticorps générés pour les approches d'immunolocalisation.

II.2. Localisation d'*EcRBL-1*, *A α RBL-1* et *A α RBL-2* au niveau du tube polaire et de la paroi de la spore

La localisation des 3 protéines *EcRBL-1*, *A α RBL-1* et *A α RBL-2*, a été étudiée par microscopie à épifluorescence (IFA) réalisées sur des préparations de spores d'*E. cuniculi* et *A. algerae*.

Concernant *E. cuniculi*, les immunomarquages ont été réalisés avec l'anticorps anti-*EcRBL-1* et avec un sérum contrôle, issu de lapin naturellement infecté par *E. cuniculi*, qui induit un marquage spécifique des protéines du tube polaire et de la paroi de la spore. L'anticorps anti-*EcRBL-1* a mis en évidence un marquage strictement restreint au tube polaire dévaginé de la spore (**Figure 27**). Aucun marquage n'a été observé sur des spores non dévaginées. Le sérum de lapin anti-*E. cuniculi* a, comme attendu, marqué de façon homogène le tube polaire dévaginé ainsi que la paroi de la spore. De manière intéressante, la superposition des marquages obtenus avec le sérum de lapin anti-*E. cuniculi* et l'anticorps anti-*EcRBL-1* a mis en évidence une région très localisée, située à l'extrémité du tube polaire, marquée uniquement avec l'anticorps anti-*EcRBL-1*. La quantification de l'intensité de signal avec l'anticorps anti-*EcRBL-1* a nettement révélé une intensité de marquage hétérogène du tube polaire, avec une intensité plus importante à l'extrémité de celui-ci (**Figure 28**).

La localisation d'*A α RBL-1* et *A α RBL-2* au niveau des spores d'*A. algerae* a été analysée avec les anticorps anti-*A α RBL-1* et anti-*A α RBL-2* (**Figure 29 et 30**). La localisation des protéines *A α RBL-1* et *A α RBL-2* ont été toutes les deux détectées au niveau de la paroi de la spore et du

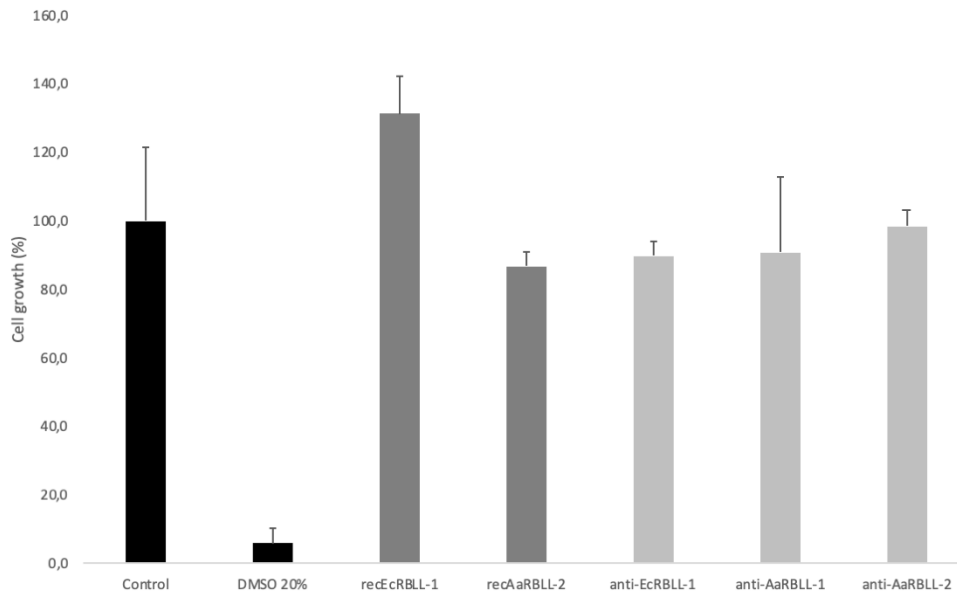


Figure 31 : Effet cytotoxique des protéines recombinantes et des anticorps sur des fibroblastes humains. Une fois les cellules à confluence, les cellules MRC-5 ont été mises en contact avec soit les recEcRBL-1 ou l'anti-EcRBL-1. Les fibroblastes de prépuces humains (HFF) ont été mis en contact avec soit les recAaRBL-2, l'anti-AaRBL-1 ou l'anti-AaRBL-2. Les protéines recombinantes ont été testées à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et les anticorps ont été dilués au 100ème. L'effet cytotoxique a été observé après 7 jours d'incubation des cellules avec les protéines recombinantes ou les anticorps. Aucun effet cytotoxique a été observé avec les protéines recombinantes ou les anticorps puisque aucune différence significative a été observée entre le contrôle et les cellules traitées ($p \text{ value} = 1$) (Test Wilcox). Un contrôle positif de cytotoxicité avec du DMSO 20% a été réalisé et le contrôle correspond aux cellules non-traitées (100% de la croissance cellulaire).

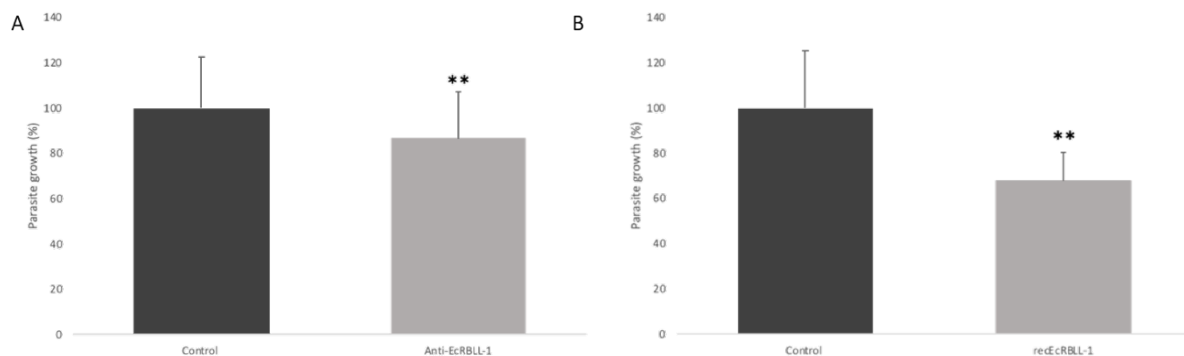


Figure 32 : Activité anti-microsporidienne des anticorps anti-EcRBL-1 et des protéines recombinantes recEcRBL-1. Les tests d'inhibition ont été réalisés en utilisant les concentrations non-cytotoxiques (A) des anticorps anti-EcRBL-1 au 100ème et (B) des protéines recombinantes recEcRBL-1 ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sur des cellules MRC-5 infectées par *E. cuniculi*. La prolifération du parasite a été mesurée après 7 jours d'infection. (A) et (B) représentent seulement une seule expérimentation indépendante de deux (A) et cinq (B) réplicats. Chaque condition a été réalisée en triplicat. La prolifération parasitaire a été analysée en comparant les conditions traitées au témoin infecté non traité avec un test Wilcox. Les différences ont été considérées significatives si la $p \text{ value}$ était <0.001 (**). (A) Une diminution de 12,3% en moyenne du développement du parasite a été observée lorsque les cellules ont été infectées avec 2×10^5 spores et prétraitées avec l'anti-EcRBL-1. (B) Un prétraitement des cellules MRC-5 a été réalisé avec $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de recEcRBL-1 suivi d'une infection avec 2×10^5 spores. Une diminution de 23,7% en moyenne du développement parasitaire a été observée.

tube polaire dévaginé. Un marquage de la paroi de la spore est plus distinct avec l'anti-A α RBLL-2.

II.3. Diminution et de l'infection avec les protéines recombinantes et les anticorps anti-RBLL en tant que compétiteurs dans l'adhésion de la spore

L'utilisation des protéines recombinantes et des anticorps, comme agents compétiteurs dans les tests fonctionnels et d'infection, imposait au préalable d'établir leur innocuité sur les modèles cellulaires hôtes. Des tests de cytotoxicité ont été réalisés afin de déterminer la cytotoxicité des protéines recombinantes recEcRBLL-1 et recA α RBLL-2 et des anticorps anti-EcRBLL-1, anti-A α RBLL-1 et anti-A α RBLL-2, utilisées respectivement à la concentration de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et à la dilution au 1/100^{ème}. La cytotoxicité de recA α RBLL-1 n'a pas été déterminée, car la protéine n'a pas été retenue pour les tests fonctionnels, en raison de son insolubilité et des conditions dénaturantes utilisées lors de sa purification, qui ne permettent pas de garantir la conservation de sa structure tridimensionnelle native et fonctionnelle. Les 2 protéines recombinantes et les 3 anticorps n'ont pas induit de cytotoxicité au niveau des cellules MRC-5 et HFF, qui correspondent aux cellules-hôtes d'*E. cuniculi* et d'*A. algerae* respectivement (**Figure 31**). En effet, une réduction de 17% et une augmentation d'environ 30%, par rapport aux cellules non traitées, des capacités de croissance cellulaire ont été respectivement observées pour les cellules HFF en présence de recA α RBLL-1 et les cellules MRC5 traitées avec recEcRBLL-1 (**Figure 31**). Les cellules HFF et MRC5 traitées avec les 3 anticorps ont montré une cinétique de croissance identique à celle des témoins (**Figure 31**).

L'ensemble de ces résultats a permis de valider la concentration de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de protéines recombinantes et l'utilisation de la dilution 1/100^{ème} des anticorps pour les tests compétitifs d'inhibition de l'infection.

L'effet compétitif des anticorps anti-EcRBLL-1 et de la protéine recombinante sur le processus d'infection par *E. cuniculi* a été mesuré par des tests ELISA. Les incubations de recEcRBLL-1 (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou de l'anti-EcRBLL-1 (1/100^{ème}) avec des cellules MRC-5 ont montré une diminution du développement d'*E. cuniculi* avec des pourcentages d'inhibition allant de 12,3% à 23,7% (**Figure 32**). En effet, lors de la pré-incubation des cellules avec l'anti-EcRBLL-1, suivi de l'infection des cellules avec 2×10^5 spores, une diminution de 12,3% en moyenne de la croissance du parasite a été observée, traduisant un niveau d'infection diminué en présence

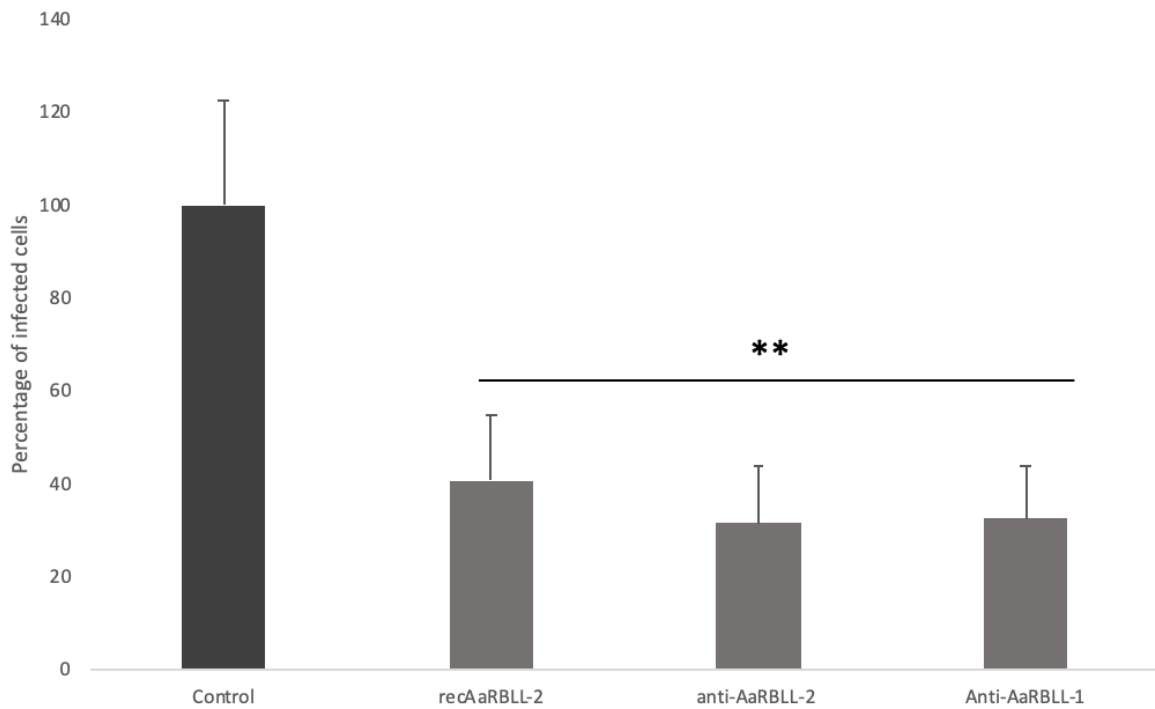


Figure 33 : Activité anti-microsporidienne de la protéine recombinante recAaRBLL-2 et des anticorps anti-AaRBLL-1 et anti-AaRBLL-2. Les tests d'inhibition ont été réalisés en prétraitant pendant 1h la solution de spores d'*A. algerae* avec chaque anticorps polyclonal au 100^{ème}. Après un lavage rapide en PBS, les spores ont ensuite été mises en contact avec les cellules HFF pendant 5 jours. Le développement du parasite a été visualisé par la méthode FISH. Les résultats proviennent de 3 infections indépendantes répétées 2 fois. Le pourcentage de cellules infectées a été évalué en comptant les noyaux des cellules et les foyers infectieux de 10 champs choisis aléatoirement sur 3 lamelles. Le développement parasitaire a été analysé en comparant les conditions traitées au témoin infecté non traité avec le test Wilcox. Les différences ont été considérées significatives si la *p* value était <0.001 (**). La condition contrôle correspond à des cellules non infectées. En comparaison avec le groupe infecté, les prétraitements avec recAaRBLL-2, les anti-AaRBLL-2 et les anti-AaRBLL1 ont diminué la croissance parasitaire en moyenne de 59,3%, 68,5% et 67,6% respectivement.

de l'anticorps. Cette diminution démontre clairement l'effet compétitif de l'anticorps sur le processus d'infection et pourrait suggérer la neutralisation potentielle de la protéine *EcRBL-1* à la surface du tube polaire, impactant son action dans les mécanismes d'adhésion/infection. En parallèle, un pré-traitement des cellules avec *recEcRBL-1* infectées avec 2×10^5 spores a conduit à une réduction de la croissance parasitaire en moyenne de 23,7% ($p < 0,001$), ce qui pourrait traduire un effet « leurre » des protéines recombinantes, en séquestrant les récepteurs à la surface des cellules hôtes.

L'implication d'*AaRBL-1* et *AaRBL-2* dans les processus d'adhésion des spores et d'infection des cellules a été analysée comme décrit précédemment. L'inhibition du développement d'*A. algerae* a été quantifiée par la méthode d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH). Les noyaux des cellules et les foyers infectieux de 10 champs choisis aléatoirement sur chaque lamelle ont été comptés afin d'évaluer le pourcentage de cellules infectées par rapport aux cellules totales. Le pré-traitement avec les anticorps anti-*AaRBL-1* et anti-*AaRBL-2* ou la protéine recombinante *recAaRBL-2* ont diminué la prolifération du parasite en moyenne de 67,6%, 68,5%, et 59,3% respectivement (**Figure 33**), ce qui démontre clairement un effet compétitif (effet neutralisant ou « leurre ») et suggère l'implication fonctionnelle de *AaRBL-1* et *AaRBL-2* dans le processus d'adhésion et d'infection.

III. Étude préliminaire d'autres protéines et de leur rôle dans l'adhésion

Cette partie est consacrée aux études des protéines candidates identifiées par les approches *in silico* et de surfomics, qui n'ont pas été apparentées aux RBL du fait de l'absence de domaine spécifique associé. Ces études ont porté sur les 13 protéines dont 4 identifiées chez *E. cuniculi* (*EcSWP5*, *EcSWP9*, *EcSWP12*, *EcSWP26*) et 8 chez *A. algerae* (*AaSWP7*, *AaSWP12*, *AaP13YM*, *AaP696T*, *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP6BE05* et *AaP03248*). Ces études sont encore actuellement en cours et n'ont pas abouti à l'heure actuelle aux tests fonctionnels d'inhibition de l'adhésion et d'infection. Les résultats présentés se limiteront au degré d'avancement pour chacune d'entre elles, comprenant les phases de productions d'anticorps et/ ou d'immunolocalisation.

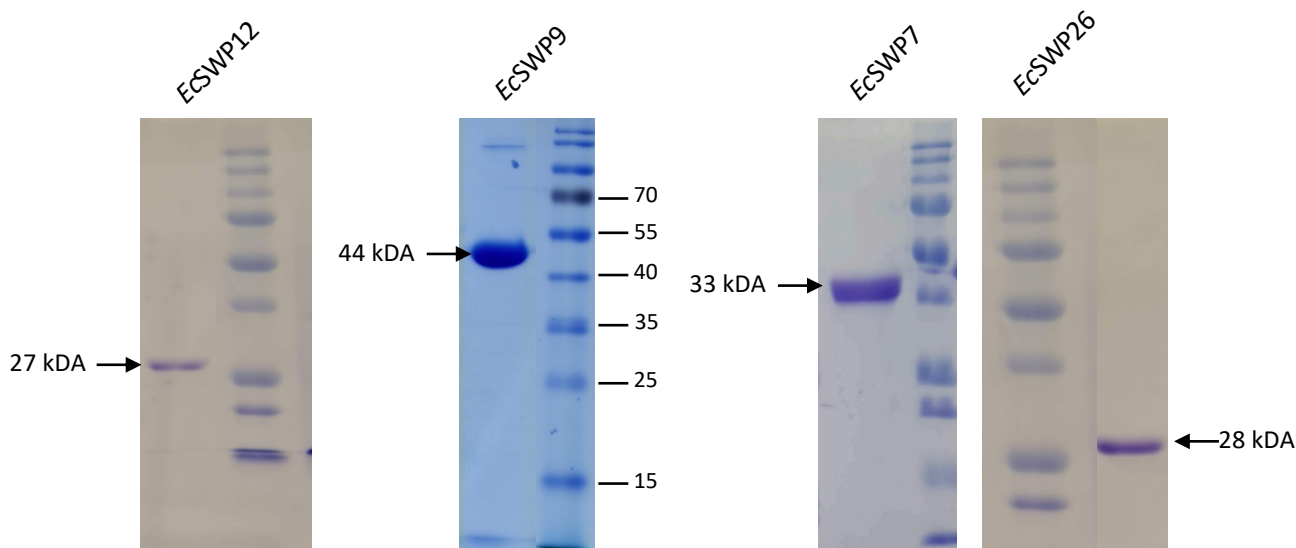


Figure 34 : Analyse sur gel SDS-PAGE des protéines purifiées sur colonnes de Nickel (IMAC) des protéines recombinantes. La purification a été réalisée à partir de surnageants de culture de *P. pastoris* pour recEcSWP7, de la fraction soluble d'*E. coli* pour recEcSWP12 et insoluble pour recEcSWP9 et à partir des deux systèmes d'expression pour recEcSWP26.

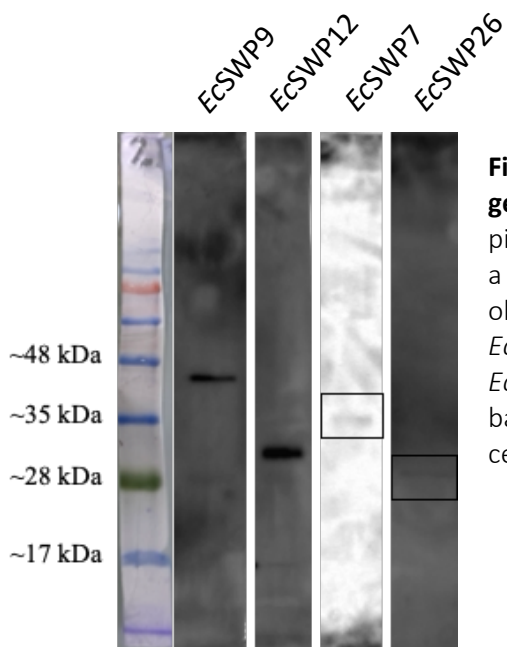


Figure 35 : Analyse par Western Blot des anticorps générés contre les protéines candidates. Dans chaque piste un extrait total de protéines de spores d'*E. cuniculi* a été déposé. Pour chaque anticorps une bande est obtenue aux tailles attendues soit ~ 40 kDa pour l'anti-EcSWP9, ~ 30 kDa pour l'anti-EcSWP12, ~ 35 kDa pour EcSWP7 et enfin ~ 28 kDa pour l'anti-EcSWP26. Les bandes pour EcSWP7 et EcSWP26 sont plus faibles que celles obtenus avec les autres anticorps.

III.1. Étude des protéines *EcSWP26*, *EcSWP7*, *EcSWP12*, *AaSWP7* et *AaSWP12* : localisation au niveau du tube polaire et de la paroi de la spore d'*EcSWP26*, *EcSWP9* et *EcSWP12*

Pour des raisons de synthèse et de pertinence, les résultats relatifs aux constructions plasmidiques et à l'expression des protéines recombinantes seront brièvement décrits sans nécessairement être appuyés par des figures. Ces étapes ont été présentées et illustrées dans le cadre de l'étude sur les protéines RBLL.

Les gènes codant pour chacune des 4 protéines ont été dans un premier temps clonés dans pET28a et pPICZ α -A. Après validation par séquençage, les constructions ont été transformées dans les systèmes *E. coli* et *P. pastoris* pour les phases d'expression et purification des protéines recombinantes. La production de la protéine recombinante rec*EcSWP26* a été validée dans les deux systèmes d'expression. L'expression des autres protéines a été effective uniquement chez un des 2 systèmes, *Pichia* pour rec*EcSWP7* et *E. coli* pour *EcSWP12* et *EcSWP9*. L'ensemble des protéines ont été produites sous forme soluble à l'exception d'*EcSWP9*. Concernant les protéines d'*A. algerae*, *AaSWP7* et *AaSWP12*, aucune production n'a pu être obtenue, quel que soit le système. La purification par IMAC des protéines rec*EcSWP26*, rec*EcSWP7*, *EcSWP12* et *EcSWP9* a été ensuite validée en SDS-PAGE (**Figure 34**).

À l'issue de ces résultats, les anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines *EcSWP26*, *EcSWP7*, *EcSWP9*, *EcSWP12* ont été générés par immunisation de souris avec les protéines recombinantes purifiées. La spécificité des anticorps polyclonaux a été analysée par Western blot, sur des extraits protéiques de spores. Un signal unique d'hybridation a été obtenu aux tailles attendues pour chacun des anticorps anti-*EcSWP26*, *EcSWP7*, *EcSWP9* et *EcSWP12* (**Figure 35**).

La disponibilité de ces anticorps spécifiques a permis d'initier les premiers essais d'immunolocalisation de ces 4 protéines, à partir de frottis de spores d'*E. cuniculi*. Une localisation restreinte à la paroi de la spore a été mise en évidence pour *EcSWP9* et *EcSWP12*, avec dans les deux cas une distribution hétérogène du marquage autour de la spore (**Figure 36 (A et B)**). L'anticorps anti-*EcSWP26* a conduit à déterminer une localisation de la protéine au niveau de la paroi des spores, mais également au niveau du tube polaire de spores dévaginées (**Figure 36 (C)**). Concernant la protéine *EcSWP7*, aucun marquage n'a été observé avec les anticorps anti-*EcSWP7*. Dans la continuité de cette étude, des tests d'inhibitions de

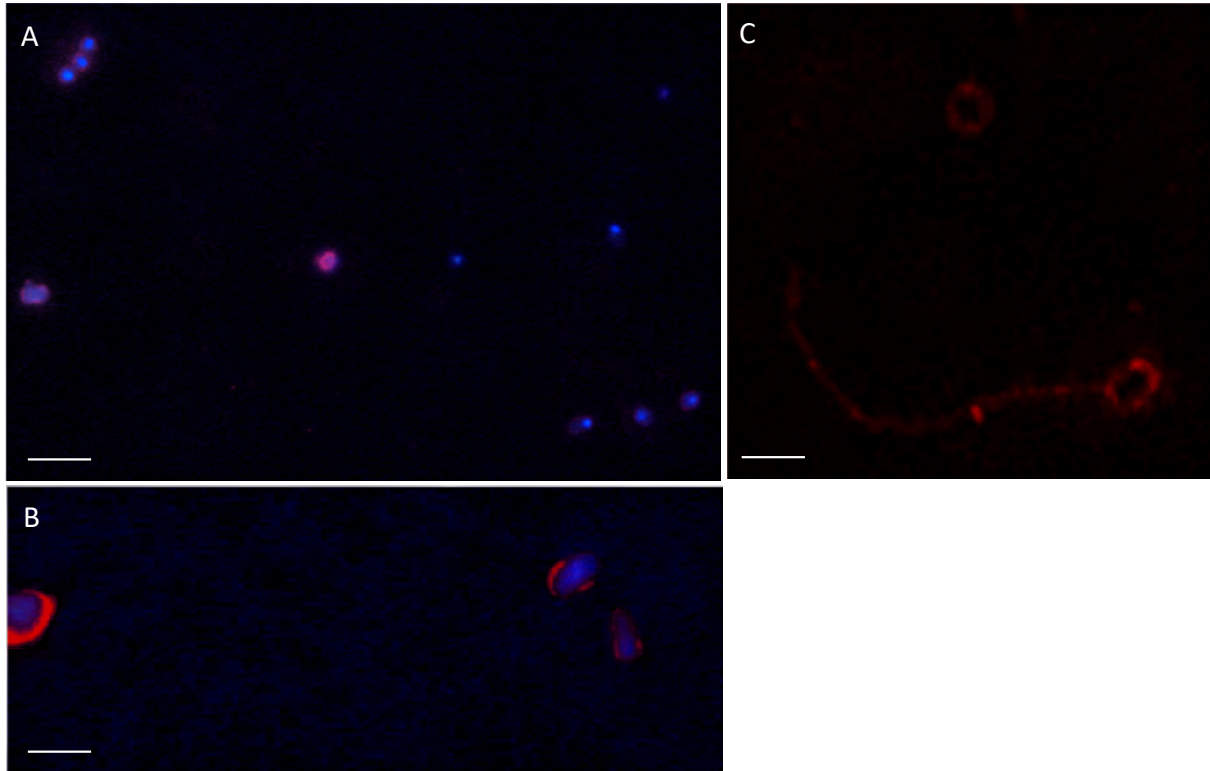


Figure 36 : Résultats préliminaires de localisation d'*EcSWP9*; *EcSWP12* et *EcSWP26* chez *Encephalitozoon cuniculi*. Des frottis de spores ont été incubés avec les anticorps **(A)** anti-*EcSWP9*, (échelle = 1 μm) **(B)** anti-*EcSWP12* (échelle = 2 μm) et **(C)** anti-*EcSWP26* suivi d'une contre-coloration au DAPI (échelle = 2 μm). Un marquage de la spore et du tube polaire a été observé avec l'anti-*EcSWP26*. Un marquage plus faible et non uniforme de la paroi des spores a été observé avec l'anti-*EcSWP9*. Un marquage de la paroi est également observé avec l'anti-*EcSWP12*.

l'adhésion/infection ont été initiés et sont actuellement en cours afin d'établir l'implication des 3 protéines *EcSWP26*, *EcSWP9* et *EcSWP12* dans l'infection.

III.2. Étude des protéines *AaP13YM*, *AaP696T*, *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP6BE05* et *AaP03248*, identifiées par l'approche surfomics

Pour rappel, les 6 protéines d'*A. algerae* ont été sélectionnées à l'issue des données de spectrométrie de masse, générées à partir des fractions obtenues suite au décapage des spores au SDS chaud, et complétées par une analyse bio-informatiques de recherche de motifs. Cette étude a été initiée dans les derniers mois de ma thèse et s'est par conséquent limitée à aux premières phases de constructions de vecteurs d'expression et de productions des protéines recombinantes. De ce fait, les résultats relatifs à la construction des plasmides, la sélection des clones recombinants et la production des protéines recombinantes seront abordés de manière plus détaillée.

III.2.1. Construction des vecteurs d'expression

Les gènes relatifs aux 6 protéines ont été amplifiés par PCR à partir d'ADNg d'*A. algerae*, avec pour chaque gène, un couple d'amorces permettant le clonage dans pET28a et un autre couple pour le clonage dans pPICZ α -A. L'analyse des produits de PCR, sur gel d'agarose a permis de confirmer pour l'ensemble des couples d'amorces l'obtention d'un fragment de taille attendue, de 1188 pb, 495 pb, 2295 pb, 252 pb, 801 pb et 609 pb pour respectivement *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP03248*, *AaP696T*, *AaP13YM* et *AaP6BE05* (**Figure 37**). Suite à l'étape de clonage, le crible de clones recombinants par PCR sur colonies a conduit à l'obtention de clones positifs, comme illustre la **figure 38**. L'ensemble des plasmides recombinants (6 pour pET28a et 6 pour pPICZ α -A) ont été séquencés et validés en termes de séquence nucléotidique pour leur introduction par la suite dans les 2 systèmes d'expression.

III.2.2. Production des protéines recombinantes

Les premiers essais de production ont été réalisés sur le modèle *Pichia* avec des temps d'induction au méthanol de 72h. L'analyse des surnageants de culture en SDS-PAGE (**Figure 39 (A)**) a montré, pour la protéine *AaP696T*, l'obtention d'une bande à la taille attendue d'environ 8 kDa, présentant une assez faible intensité. Aucune bande distincte n'a été visualisée pour les

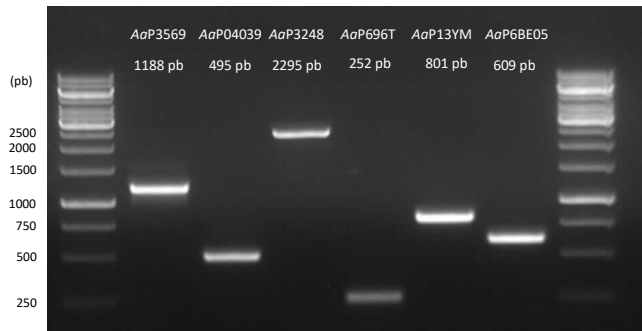


Figure 37 : Validation des couples d'amorces par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour l'ensemble des couples d'amorces, un fragment est obtenu à la taille attendue de 1188 pb, 495 pb, 2295 pb, 252 pb, 801 pb et 609 pb pour respectivement *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP3248*, *AaP696T*, *AaP13YM* et *AaP6BE05*.

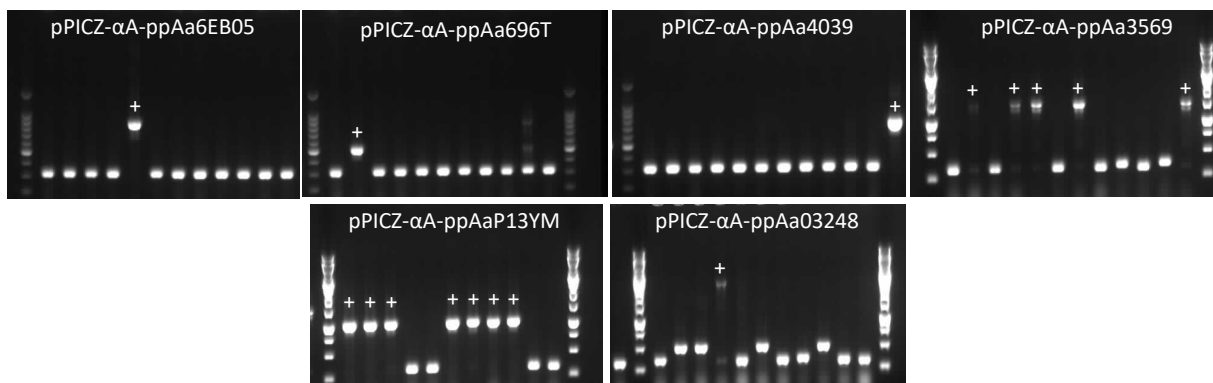


Figure 38 : Résultats des PCR sur colonies pour le criblage des pPICZα-A recombinants. Un clone positif a été obtenu pour les constructions pPICZα-ppAa6EB05, pPICZα-ppAa696T, pPICZα-ppAa4039 et pPICZα-ppAa03248. 5 clones positifs ont été obtenus pour pPICZα-Aa3569 et enfin 7 clones positifs pour pPICZα-ppAa13YM.

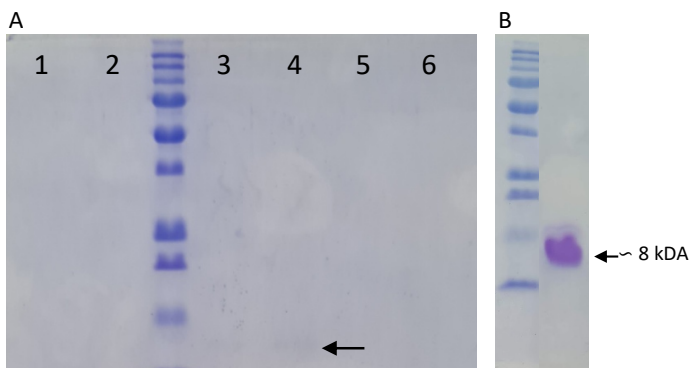


Figure 39 : Analyse sur gel SDS-PAGE des premiers essais de production de protéines sélectionnées par approche surfomics. (A) L'analyse des surnageants de culture a montré l'obtention d'une bande pour la protéine *AaP696T* de faible intensité. Aucune bande n'est visible pour les autres protéines signifiant l'absence de production. (B) Résultat de la purification sur colonne de nickel (IMAC) de la protéine *AaP696T*.

5 autres protéines (**Figure 39 (A)**), même dans des conditions d'induction en méthanol 0,5% de 120h. Pour la purification de la protéine AaP696T, le temps d'induction au méthanol 0,5%, a été augmenté à 144h afin d'accroître la quantité de protéine recombinante produite (**Figure 39 (B)**). À l'issue de cette purification, une bande nette et unique de la protéine purifiée a été visualisée sur gel SDS-PAGE, validant quantitativement et qualitativement les conditions mises en œuvre pour la production et la purification de recAaP696T. L'immunisation des souris avec recAaP696T est en cours de réalisation pour la production d'un anticorps polyclonal. Concernant les 5 protéines AaP6BE05, AaP3569, AaP04039, AaP13YM et AaP03248, les essais de production dans le système bactérien sont en cours de réalisation.

IV. Utilisation de glycanes exogènes comme agents anti-microsporidiens

IV.1. Mode d'action du polysaccharide issu de *Porphyridium marinum*

Une étude réalisée au laboratoire a mis en évidence le potentiel anti-microsporidien d'un hétéroxylane sulfaté issu de la microalgue *Porphyridium marinum* (PM). Il a permis une réduction de la croissance d'*E. cuniculi*, cultivée *in vitro* sur cellules humaines, de l'ordre de 90%, ainsi qu'une réduction de la mortalité et de la charge parasitaire d'abeilles infectées par la microsporidie *N. ceranae* en conditions de laboratoire (Roussel et al., 2015). Cependant, le mécanisme d'action de l'exopolysaccharide de PM reste à ce jour inconnu et constitue le 2^e objectif de ma thèse. Nous avons formulé l'hypothèse que ce composé pouvait agir en interférant avec les processus d'adhésion des spores microsporidiennes à leurs cellules-hôtes, la question étant de savoir où se fixe ce composé (sur la spore ou sur la cellule-hôte). Pour cela, nous avons entrepris de vérifier l'activité anti-microsporidienne du PM pour ensuite le marquer avec un fluorochrome et suivre son action par immunofluorescence. Une nouvelle production du polysaccharide PM en photobioréacteur a également été réalisée pour avoir un lot en quantité suffisante pour envisager les expériences à venir.

IV.1.1. Activité du polysaccharide de PM sur des cellules infectées par *E. cuniculi*

Pour aller plus loin dans la compréhension du mécanisme d'action du PM, nous avons décidé d'évaluer les effets du PM sur l'infection de cellules par *E. cuniculi* en pré-traitant d'une part les cellules HFF et d'autre part les spores avec le PM (100 µg.mL⁻¹), en adaptant le

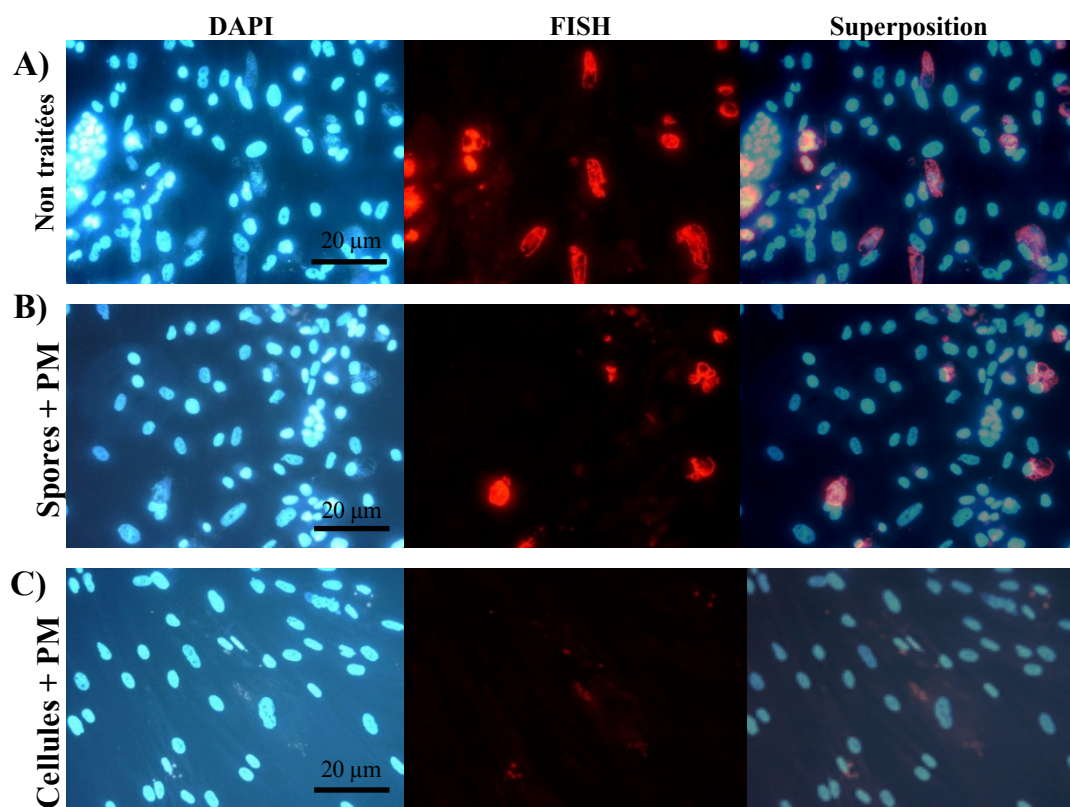


Figure 40 : Visualisation en FISH des foyers infectieux au niveau de cellules infectées par *Encephalitozoon cuniculi*. En amont de l'infection, un prétraitement des cellules et des spores avec le PM ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a été effectué. Les cellules ont ensuite été infectées pendant 72h. **(A)** Témoin infecté non traité, de nombreux foyers infectieux sont visibles en DAPI et en FISH. Le prétraitement des spores **(B)** au PM n'a pas diminué l'infection en comparaison avec le contrôle non traité. En revanche, les cellules prétraitées avec le PM montrent une réduction importante du nombre de foyers infectieux **(C)**. Grossissement X63.

protocole de Roussel et al. (2015). Les foyers infectieux ont été mis en évidence par marquage FISH suivi d'une contre-coloration au DAPI, nous permettant ainsi de visualiser l'absence d'effet sur le développement parasitaire lors du pré-traitement des spores avec le PM en comparaison avec le témoin infecté non traité. En revanche, le pré-traitement des cellules avec le PM montre une diminution considérable de l'infection avec un nombre de foyers infectieux visible considérablement diminué (**Figure 40**). Ces résultats laissent donc penser que le PM agirait préférentiellement au niveau de la cellule.

IV.1.2. Le polysaccharide de PM fluorescent est retrouvé à la périphérie des cellules humaines

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les tests d'infection et de mettre en évidence la localisation du PM un couplage des fluorochromes (5-aminofluorescéine et 6-aminofluorescéine) aux fonctions carboxylates du PM a été réalisé. Une fois le couplage effectué et le produit final lyophilisé, celui-ci a été mis en contact soit avec des cellules HFF (**Figure 41(A)**), soit avec des spores d'*E. cuniculi* (**Figure 41(B)**) pendant 1h. L'observation au microscope montre que, quelle que soit la concentration ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), et le fluorochrome utilisé, le polysaccharide semble s'accumuler à la périphérie des cellules HFF. Dans certains cas, un marquage punctiforme a été observé pouvant suggérer une interaction spécifique avec certains récepteurs de surface des cellules HFF. Concernant les frottis de spores, aucune fluorescence spécifique n'a été visualisée indiquant une absence d'interaction dans les conditions expérimentales utilisées. Le PM semble donc mimer un motif présent à la surface des spores et qui leur permet d'interagir avec des récepteurs spécifiques des cellules-hôtes. Ces données nous ont permis d'envisager de comprendre de manière plus approfondie l'activité du PM. Mais, pour cela il nous a fallu produire ce polysaccharide en grandes quantités pour pouvoir :

- d'une part, produire des oligosaccharides issus de la fragmentation du PM pour pouvoir étudier leur structure et avoir une idée de la structure du PM. De plus, les oligosaccharides ont souvent des activités plus importantes que les polysaccharides à partir desquels ils ont été produits,
- d'autre part, mettre au point des colonnes d'affinité à base de PM ou d'oligosaccharides nous permettant d'identifier les récepteurs cellulaires ciblés par PM.

Nous avons donc produit le PM en photobioréacteur selon un protocole établi au laboratoire.

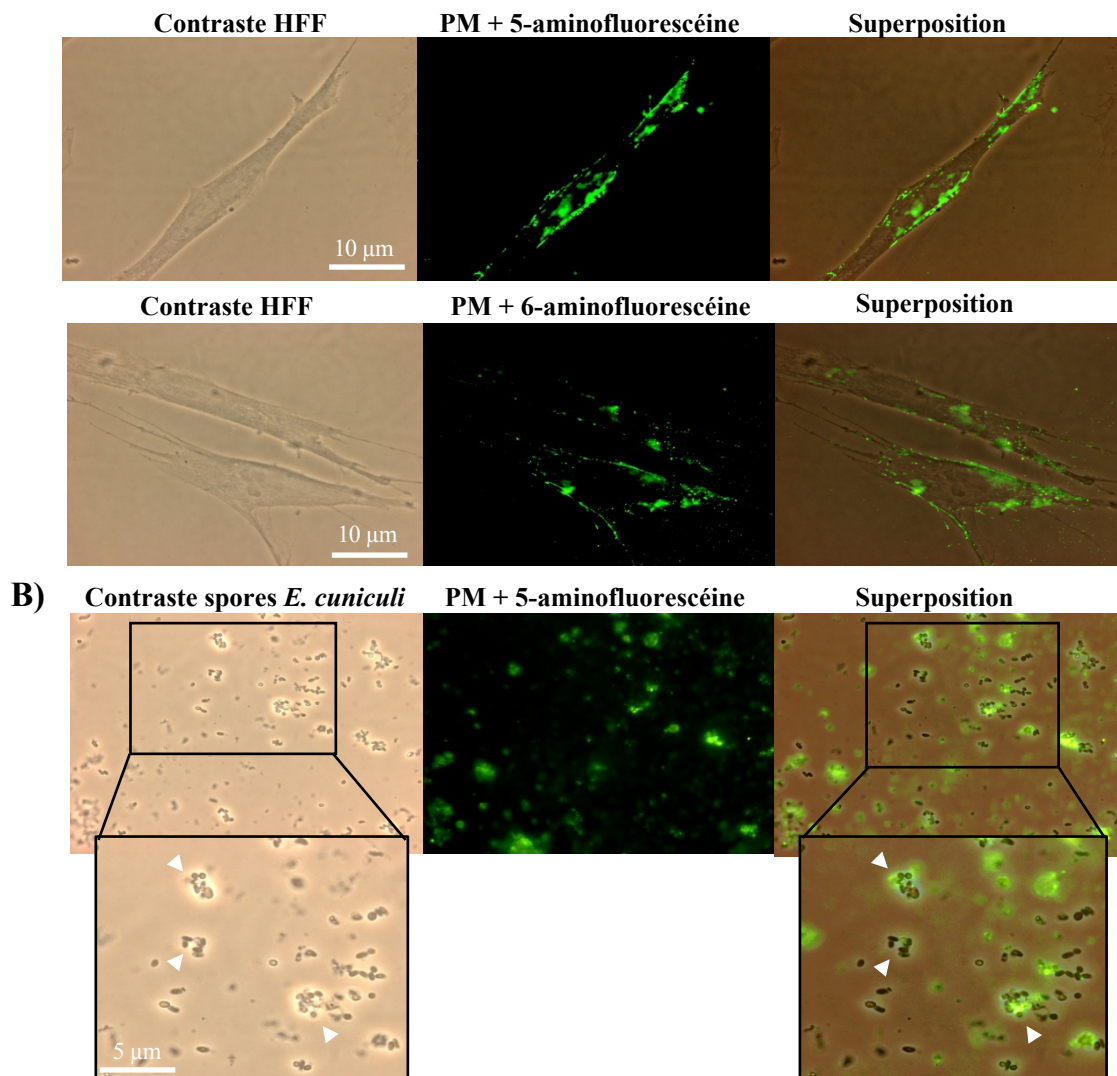


Figure 41 : Localisation de PM couplé à un fluorochrome au niveau des cellules HFF et des frottis de spores d'*Encephalitozoon cuniculi*. Le polysaccharide couplé soit à la 5-aminofluorescéine, soit à la 6-aminofluorescéine a été incubé avec d'une part des cellules HFF et d'autre part des spores d'*E. cuniculi* pendant 1 heure. **(A)** Liaison du polysaccharide ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) à la périphérie des cellules HFF aussi bien avec le 5-aminofluorescéine ou le 6-aminofluorescéine. **(B)** Absence de marquage du fluorochrome ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sur frottis de spores d'*E. cuniculi*. La fluorescence visible correspondrait à des agrégats de débris cellulaires. Les flèches pointent des spores ne montrant pas de marquage spécifique. Le PM marqué par la 6-aminofluorescéine et incubé avec les spores n'est pas présenté ici mais un résultat identique au PM marqué par la 5-aminofluorescéine a été obtenu. Un contrôle négatif a été effectué avec seulement le fluorochrome et ne montre aucun marquage des cellules. Grossissement X100.

IV.2. Production et purification du polysaccharide de *P. marinum* en photobioréacteur

La croissance d'organismes en condition photoautotrophe apparaît comme fortement dépendante de l'éclairage apporté à la culture et des conditions physico-chimiques du milieu de culture (température, pH et composition en nutriments). C'est donc pour cela que la production de l'exopolysaccharide de *P. marinum* a été réalisée en photobioréacteur de 25L pendant 46 jours selon le protocole développé par Soanen et al. (2016) (Soanen et al., 2016). La production du polysaccharide a donc été réalisée à une température de 24°C en maintenant un pH entre 8 et 8,5 avec des prélèvements réguliers afin de suivre la consommation de nitrates et la production de sucres. Le dosage de nitrates a permis de mettre en évidence le début de la phase stationnaire de croissance à J27 et donc le début de la production de polysaccharides par les microalgues. Le dosage de sucre (Dubois et al., 1956), a permis de suivre la production de sucres au cours de la culture et ainsi déterminer le taux de sucre final, en équivalent glucose, à 1,2 g.L⁻¹. La purification du surnageant de culture dans le but d'éliminer les sels, protéines ou encore les débris cellulaires est essentielle. Pour cela, nous avons choisi d'effectuer une première filtration en cascade sur verre fritté de porosité différente (P1 (160 à 250 µm), P2 (40 à 100 µm) et P3 (16 à 40 µm) afin d'éliminer les débris les plus importants, qui pourraient être responsables de l'obstruction de la membrane de diafiltration. La diafiltration a, quant à elle, été réalisée en plusieurs fois avec une membrane de 100 kDa en fixant la vitesse de la pompe à 30%. La diafiltration de chaque batch soit environ 3 kg de surnageant a pris 5h. La conductivité du surnageant diafiltré a été prise au cours du temps afin d'évaluer la quantité de sels restante. Les surnageants de départ avaient une conductivité d'environ 37 mS/cm à +/- 26°C. Après diafiltration, la conductivité était d'environ 0,265 mS/cm à environ 26°C. Une fois la diafiltration terminée, nous avons congelé les surnageants pour pouvoir ensuite les lyophiliser. Après lyophilisation, nous avons obtenu 25 g de polysaccharide purifié destiné à préparer les oligosaccharides et la colonne d'affinité.

IV.3. Activité d'autres polysaccharides chez des abeilles infectées par *Nosema ceranae*

Les travaux sur le PM ayant montré l'intérêt des polysaccharides pour lutter contre les microsporidioses, nous avons effectué un criblage d'autres polysaccharides sur des abeilles

Tableau 8 : Récapitulatif des polysaccharides utilisés dans le criblage de nouvelles molécules à activité anti-microsporidienne.

Polysaccharide	Annotation
Chondroïtine Sulfate A	P1
Chondroïtine Sulfate C	P2
Dextrane sulfate 1400	P3
Dextrane sulfate 40	P4
Succinoglycane	P5
Arabino-galactane	P6
Héparine	P7
Acide hyaluronique	P8
Fucoïdan	P9
Glucuronane déacétylé	P10
Cellulose oxydée	P11
Xanthane oxydé	P12

En gras, les polysaccharides sélectionnés pour les tests sur abeilles.

infectées par *N. ceranae*. Le potentiel anti-parasitaire de 7 polysaccharides (**Tableau 8**) a été analysé sur des abeilles en cagettes infectées par *N. ceranae*. L'effet des polysaccharides a été évalué avec le suivi de la charge parasitaire et la détermination du taux de survie des abeilles. Leur effet a été comparé à celui de la fumagilline, molécule de référence anti-microsporidienne. Le développement de *N. ceranae* a été suivi par le comptage des spores dans les abdomens des abeilles survivantes à 20 jours de traitement avec les polysaccharides post-infection. L'analyse statistique a révélé une quantité de spores plus élevée chez le groupe contrôle infecté et non traité par rapport au groupe contenant les abeilles infectées traitées avec la fumagilline ($p < 0,001$), avec le PM ($p < 0,05$), avec le dextrane sulfate 1400 (P3) ($p < 0,001$), avec le succinoglycane (P5) ($p < 0,01$) et avec l'arabinogalactane (P6) ($p < 0,01$). L'inhibition la plus importante de la charge parasitaire est observée avec la fumagilline (réduction d'environ 72%) suivi par le traitement avec le succinogalactane pour lequel une diminution d'environ 65% de la charge parasitaire a été obtenue ($22,4 \times 10^6$ spores dans le groupe P5 contre $64,3 \times 10^6$ spores par abeille en moyenne dans le groupe infecté non traité) (**Figure 42**). Les abeilles nourries avec un sirop complétement en PM, en dextrane sulfate 1400 et en arabinogalactane présentent une réduction du nombre de spores d'environ 50% (respectivement $34,6 \times 10^6$; $26,9 \times 10^6$; $35,3 \times 10^6$ spores par abeille en moyenne).

De manière surprenante, l'analyse des courbes de survie indique une diminution de la survie des abeilles nourries avec du sirop complétement en fumagilline ($p=0,0000$), en chondroïtine sulfate A (P1) ($p=0,00017$), en dextrane sulfate 1400 (P3) ($p=0,0000$), en dextrane sulfate 40 (P4) ($p=0,0000$), en succinoglycane (P5) ($p=0,0000$), en arabinogalactane (P6) ($p=0,0000$) et en glucuronane déacétylé (P10) ($p=0,0000$) par rapport aux abeilles infectées non traitées. Par contre, aucune différence significative de la survie des abeilles n'est observée lors du traitement avec PM ($p=0,24$) par rapport au groupe d'abeilles infectées non traitées (**Figure 43**). Ces composés n'améliorent donc pas la survie des abeilles infectées mais montrent un effet sur la charge parasitaire, confirmant ainsi le potentiel anti-microsporidien des polysaccharides.

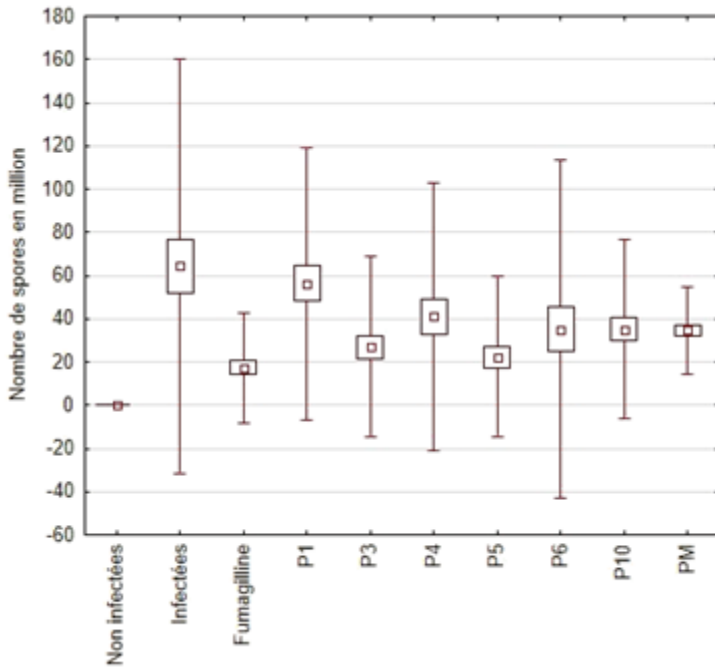


Figure 42 : Nombre moyen de spores de *Nosema ceranae* par abdomen d'abeille. Le nombre de spores a été déterminé à partir des abeilles survivantes au 20^{ème} jour, en réponse à des traitements à la fumagilline, et aux polysaccharides (P1, P3, P4, P5, P6, P10 et PM) (n=15 par traitement). Des différences significatives ($p < 0,05$) ont été obtenues avec la fumagilline, PM, P3, P5 et P6 ($p < 0,001$, $p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,01$ et $p < 0,01$ respectivement) par comparaison avec le groupe infecté à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov.

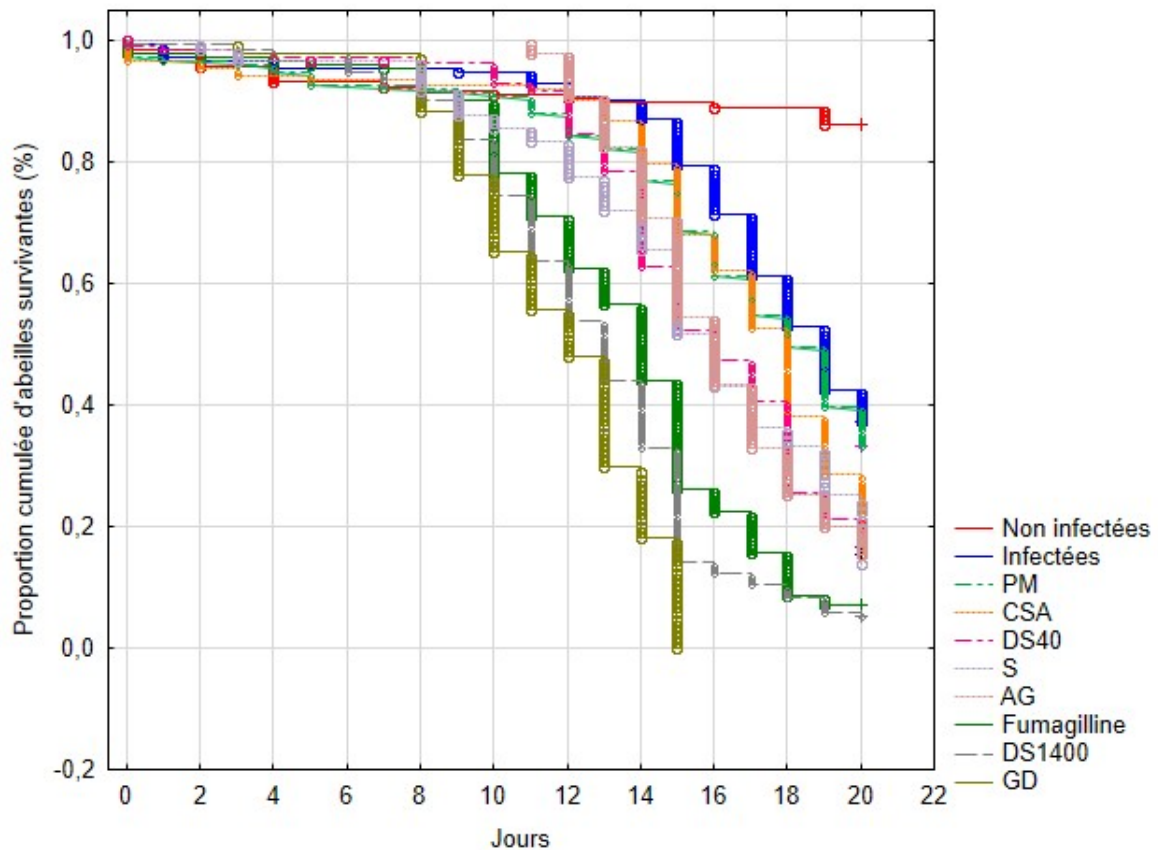


Figure 43 : Effet des polysaccharides sur la survie d'abeilles infectées par *Nosema ceranae*. Les données indiquent la proportion cumulée d'abeilles survivantes exposées à *N. ceranae* en présence ou non de polysaccharides. Les abeilles ont été exposées 3 jours avant l'infection collective avec une solution de spores de *N. ceranae* à 10^4 spores par abeille. Les données provenant de trois réplicats de 30 abeilles ont été analysées avec la méthode de Kaplan-Meier.

Discussion

Discussion

I. Recherche d'acteurs moléculaires impliqués dans l'adhésion des spores microsporidiennes

Les interactions des parasites intracellulaires obligatoires avec la surface de leurs cellules-hôtes constituent une étape clé dans le processus d'infection. Ces interactions contribuent principalement à la reconnaissance et à l'adhésion des microorganismes pathogènes qui sont nécessaires pour l'internalisation et probablement en aval, le déclenchement d'une réponse inflammatoire caractéristique de l'infection (Hoepelman and Tuomanen, 1992). Chez les microsporidies, les protéines de la paroi de la spore ainsi que celles du tube polaire jouent un rôle important dans l'interaction entre les spores et les cellules-hôtes (Han et al., 2020). Le surfaceome des microsporidies est ainsi important pour la compréhension des mécanismes d'invasion des microsporidies mais aussi pour la découverte de marqueurs diagnostiques potentiels et de cibles médicamenteuses pour le contrôle des microsporidioses. Cependant, en raison de barrières techniques, les études se sont principalement concentrées sur l'identification des composants de l'ensemble de la paroi des spores, plutôt que sur les protéines de surface en particulier (Zhao et al., 2015).

De nombreuses protéines à la surface du parasite participant aux interactions avec les cellules-hôtes sont décrites dans la littérature restent restreintes à certains modèles parasitaires, en particulier *N. bombycis*, *Encephalitozoon* spp., et *A. locustae* (Chen et al., 2017; Hayman et al., 2005; Southern et al., 2007; Wu et al., 2009), et ont été identifiées, pour certaines d'entre elles, par des études ciblant certaines protéines candidates. Dans le cadre de notre étude, nous avons eu pour objectif de développer des approches plus larges, nous appuyant à la fois sur une recherche à l'échelle du génome de protéines candidates (approche *in silico*) et sur la purification et la caractérisation des protéines de surface de la spore (approche surfomics).

1.1. Intérêt et complémentarité des approches *in silico* et surfomics

Dans le but de rechercher des protéines possédant un rôle potentiel dans les processus d'infection, une approche *in silico* a été abordée en exploitant les banques de données de séquences *E. cuniculi* et *A. algerae* par une approche bio-informatique par la recherche de motifs spécifiques d'adressage pariétal ou extracellulaire, de peptide signal de sécrétion ou encore de domaine de liaisons à des carbohydrates. Cette stratégie nous a ainsi permis de sélectionner trois protéines en nous basant sur la prédiction de motifs particuliers comme les peptides signaux et le domaine Ricin-B-lectin like. Les résultats de localisation subcellulaires et de prédiction de glycosylation ont montré que *EcRBL-1* et *AaRBL-2* sont des protéines potentiellement sécrétées et que ces protéines peuvent se lier aux carbohydrates. Cependant, *AaRBL-1* est la seule protéine ne possédant pas de peptide signal, ce qui pourrait être expliqué par le fait que les algorithmes utilisés (WoLF PSORT et SignalP) ont été mis en place sur des modèles génétiques qui ne sont pas complètement adaptés aux microsporidies. Ce biais provoqué par les algorithmes a aussi été observé chez *N. bombycis* notamment avec la protéine SWP12 qui a été démontré comme localisé à la paroi de la spore alors qu'aucun peptide signal n'avait été prédit (Chen et al., 2013; Wu et al., 2008). Les trois protéines sélectionnées possèdent un domaine Ricin-B-lectin connu comme jouant un rôle important dans l'adhésion et l'infection des microsporidies (Campbell et al., 2013; Liu et al., 2016). L'analyse portant sur les protéines RBL présentes chez les espèces de microsporidies ont révélé une importante hétérogénéité de séquences, mais également aucune analogie intra et inter-espèces. Cependant, la présence de structures communes, similaires aux agglutinines et aux β -glucanases, chez les protéines RBL, pourraient être liées à la conservation de la fonction de liaison des carbohydrates illustrée par le modèle de prédiction 3D (**Tableau 6**). La comparaison des protéomes d'*A. algerae* et d'*E. cuniculi* a révélé un nombre plus important de protéines RBL dans le protéome d'*A. algerae* (~17 pour *A. algerae* contre 6 pour *E. cuniculi*). Les gènes codant les protéines RBL sont retrouvés chez d'autres espèces de microsporidies, *N. ceranae* and *S. lophii*, parasites d'abeilles et de la lotte, respectivement et sont organisés en clusters. C'est également le cas pour *E. cuniculi* dont les gènes RBL se trouvent dans des blocs synténiques y compris le gène d'*EcRBL-1* (Campbell et al., 2013). La faible taille des contigs du génome d'*A. algerae* ne nous a pas permis d'analyser la synténie du gène RBL dans ce génome. Campbell et al., 2013 ont suggéré que les paralogues RBL sont issus de duplications au sein de chaque espèce et auraient donc pu contribuer à l'adaptation de l'hôte. Par conséquent, la différence

dans le nombre de protéines présentes chez *A. algerae* et *E. cuniculi* pourrait être liée à une gamme d'hôtes d'*A. algerae* plus large allant des mammifères aux insectes.

Les difficultés de prédiction engendrées par les outils disponibles rendent ainsi la recherche de protéines candidates par approche bio-informatique particulièrement délicate et ces outils devraient être adaptées aux microsporidies, en développant des programmes de bioanalyse spécifiques aux microsporidies. C'est pourquoi, une approche expérimentale par surfomics s'est avérée complémentaire. L'approche « shaving » notamment par décapage à la trypsine est une stratégie utilisée chez une grande variété d'organismes, non seulement dans le but d'identifier l'ensemble des protéines exposées à la surface (Olaya-Abril et al., 2014). Au total, 24 espèces différentes à la fois procaryotes et eucaryotes ont été soumises au « shaving » pour une analyse par spectrométrie de masse de leurs surfaceomes (Olaya-Abril et al., 2014). Le groupe d'organismes pour lequel cette approche a été le plus largement appliquée est celui des bactéries Gram-positives (10 espèces au total), en particulier les streptocoques (Olaya-Abril et al., 2014). Des espèces de bactéries Gram-négatives ont également été étudiées tels que *Chlamydia trachomatis* ou *Escherichia coli* (Olaya-Abril et al., 2014). Une étude réalisée par Esbelin et al., en 2018 visait à comparer l'efficacité de trois méthodes pour extraire et étudier les protéines de surface de *Listeria monocytogenes* se développant en biofilm : shaving par trypsine, biotinylation et fractionnement cellulaire. Les résultats ont permis de mettre en évidence de nombreuses protéines impliquées notamment dans la virulence, le transport ou les voies métaboliques. Les trois méthodes d'extraction semblent donc être complémentaires et leurs combinaisons permettent d'améliorer l'exploration du surfaceome bactérien. Dans notre étude, cette approche par surfomics a été abordée par trois méthodes différentes : biotinylation, décapage par trypsine et décapage par SDS chaud dans le but d'enrichir nos données expérimentales en protéines candidates et de croiser les résultats pour sélectionner les protéines communes. La méthode de biotinylation a notamment été adoptée par Zhao et al., en 2015 afin d'identifier des protéines de surface chez *N. bombycis*. Cette méthode leur a permis d'identifier 5 protéines localisées à la surface de *N. bombycis*. Dans le cadre de notre étude, nous avons réussi à biotinyler les protéines de surface des spores d'*A. algerae* et d'*E. cuniculi*. Au vu des résultats obtenus, il sera nécessaire de poursuivre afin d'identifier d'autres candidats potentiels.

Au cours de mes travaux, le shaving par trypsine des spores de microsporidies n'a pas permis de montrer une diminution du taux d'infection des cellules. Cela pourrait venir du fait

que les concentrations de trypsine utilisées étaient trop faibles et les temps d'incubation trop courts. En effet, le traitement à la trypsine de spores de *Clostridium difficile*, bactérie de type bacille à Gram positif anaérobie, responsable de colites pseudo-membraneuses et de 15 à 20% des cas de diarrhée associés aux antibiotiques, a permis de diminuer significativement l'adhésion aux cellules-hôtes (Paredes-Sabja and Sarker, 2012). Dans cette étude, les spores ont été incubées avec une solution contenant de la trypsine à $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ pendant 3h (Paredes-Sabja and Sarker, 2012) donc 5000 fois plus concentrées que la plus faible concentration utilisée pour le traitement des spores de microsporidies. De par la complexité structurale des spores de microsporidies en particulier l'exospore, les concentrations utilisées pour récupérer les protéines de surface étaient probablement trop faibles. De ce fait, il serait nécessaire de refaire les expérimentations à des concentrations plus élevées et des temps d'incubation plus longs pour pouvoir évaluer la capacité des spores à infecter les cellules. Suite à cela, les surnageants récupérés contenant les protéines de surface pourront être analysés par spectrométrie de masse, puis une approche bio-informatique permettra de sélectionner les candidats protéiques potentiels jouant un rôle dans les processus d'adhésion.

Enfin, les analyses bio-informatiques des résultats MS obtenus après décapage des spores d'*A. algerae* par SDS chaud ont permis de sélectionner *in fine* 6 protéines potentiellement impliquées dans l'adhésion prédite pour la majorité comme étant sécrétées et possédant un peptide signal. En revanche, les résultats MS obtenus dans le témoin sont difficilement explicables et ne sont pas en cohérence avec les quantités faibles de protéines observées en SDS-PAGE. Le rôle du SDS et de la chaleur dans le décapage des spores pose question. Il a été ainsi impossible d'effectuer une corrélation entre la nature des protéines obtenues dans chacune des conditions et la capacité d'infection des spores, ceci dans le but d'orienter notre sélection d'échantillons pour l'analyse MS. Il est possible qu'en plus de décaper les protéines de surface, les traitements à la chaleur et au SDS aient pu modifier des protéines responsables de l'infection. Néanmoins, notre objectif était de décaper la surface de la spore pour identifier des protéines qui ont ensuite été sélectionnées par le crible bio-informatique. Cette méthode de décapage au SDS pourrait aussi être améliorée par l'ajout d'urée 8M dans la solution de SDS. En effet, une étude réalisée par Thompson et al. (2011) a comparé des méthodes de décapage de spores de *Bacillus anthracis* par solution de SDS et par solution de SDS additionné d'urée 8M (Thompson et al., 2011). Les résultats de cette étude ont montré que l'ajout d'urée dans la solution de SDS permet d'améliorer considérablement l'extraction de

protéines de l'exospore. D'autre part, les résultats d'analyse MS, révèlent la présence de protéines appartenant à différents métabolismes cellulaires incluant notamment la traduction. Il serait donc intéressant de développer des moyens de validation de la technique par l'utilisation de marqueurs spécifique du cytoplasme, de la paroi et du noyau pour apprécier le niveau de contamination du sporoplasme dans l'échantillon enrichi en protéines de surface. Il existe actuellement un anti-Mab 6G2, un anticorps monoclonal et un anticorps polyclonal anti-EhSSP1 qui réagissent avec le sporoplasme des spores d'*E. cuniculi* et d'*E. hellem* respectivement (Fasshauer et al., 2005; Han et al., 2019).

De plus, lors de l'analyse des échantillons protéiques par LC/MS/MS seule la base de données d'*A. algerae* a été criblée, il serait également intéressant d'élargir la recherche sur le protéome humain afin de mettre en évidence des protéines qui pourraient avoir été acquises à partir de l'hôte. En effet, une étude récente a suggéré la capacité des microsporidies à acquérir des filaments intermédiaires de type lamine-like et des complexes caténine-cadhérine de l'hôte impliqués dans l'adhésion des parasites (Weidner et al., 2020). L'avantage le plus évident pour un parasite intracellulaire d'acquérir des molécules d'adhésion de l'hôte ainsi que d'autres protéines du cytoplasme de l'hôte est d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, il est très rare d'observer une forte réaction immunitaire à l'infection par les microsporidies chez les hôtes vertébrés et invertébrés.

Lors du décapage de la surface des spores d'*A. algerae*, celles-ci ont été soumises à une incubation dans une solution de germination afin d'évaluer la capacité des spores à dévagner suite au traitement. Ces tests de germination ont permis de mettre en évidence l'incapacité des spores à germer suite aux traitements en comparaison avec le traitement. De manière très intéressante, l'immunomarquage des spores traitées avec la solution de décapage a permis de mettre en évidence un marquage plus intense et punctiforme au pôle apical des spores. Ces résultats suscitent de nombreuses questions : ce marquage correspondrait-il au lieu de « rupture » au niveau du capuchon polaire lors de la germination ? Le traitement aurait-il pu éliminer une enzyme comme une protéase, qui permettrait l'extrusion du tube polaire ? Cette hypothèse va dans le sens des résultats obtenus dans une étude de 2013 (Dang et al., 2013) où la protéine NbSLP1 de *N. bombycis*, une protéase à sérine subtilisine-like a été identifiée. Cette protéine NbSLP1 est retrouvée au pôle apical de la spore au niveau du site d'extrusion du tube polaire, de manière similaire aux marquages que nous avons obtenus sur les spores d'*A. algerae* décapées au SDS. L'étude de la fonction de la protéine NbSLP1 dans le processus de

germination est nécessaire pour la compréhension de ce mécanisme. De par la localisation de NbSLP1, les auteurs ont proposé deux hypothèses : (i) en considérant que le tube polaire n'est pas seulement fixé, mais est également expulsé du disque d'ancrage, la protéine NbSLP1 hydrolyse le complexe d'attachement permettant au tube polaire d'être extrudé plus facilement (ii) la protéine NbSLP1 pourrait avoir un rôle similaire à la protéase de la famille des subtilisine (OSW3) retrouvée chez *Saccharomyces cerevisiae*, laquelle est nécessaire dans l'assemblage de la paroi (Dang et al., 2013). Dans notre étude, l'analyse bio-informatique des résultats obtenus après analyse MS a permis de mettre en évidence une protéine avec une fonction prédite dans le protéasome. Cette protéine aurait-elle ainsi un rôle similaire à NbSLP1 ? Cette hypothèse mérite d'être approfondie.

I.2. Caractérisation et rôles des protéines RBLL et autres protéines sécrétées identifiées

I.2.1. Protéines RBLL

Les résultats d'immunolocalisation sur les spores et le tube polaire d'*E. cuniculi* et *A. algerae* montrent une hétérogénéité de marquage. La différence de localisation des trois protéines (double localisation sur le tube polaire et la paroi pour *A. algerae* et seulement sur le tube polaire pour *E. cuniculi*) suggère qu'elles sont probablement fonctionnellement différentes au cours du processus d'invasion. Le marquage plus intense retrouvé chez avec *EcRBLL-1* correspondant soit à l'extrémité du tube polaire soit au sporoplasme peut indiquer le rôle de cette protéine dans l'adhésion à la membrane de la cellule-hôte avant la pénétration du tube ou l'adhésion du sporoplasme. Afin de valider la localisation exacte du marquage plus intense d'*EcRBLL-1*, il serait intéressant de réaliser un double marquage avec un anticorps ciblant des protéines du sporoplasme tel que l'anti-*EhSSP1* qui cible une protéine du sporoplasme chez *E. hellem* (Han et al., 2019).

Ces protéines RBLL peuvent également être différentes de celle identifiée chez *N. bombycis* (Liu et al., 2016) *NbRBL* étant seulement localisée à la paroi de la spore. Malgré ces différences, elles sont toutes impliquées dans l'infection de la cellule-hôte, puisqu'une diminution significative de la prolifération a été observée suite aux pré-traitements des cellules hôtes avec les protéines recombinantes ou les spores avec les anticorps polyclonaux anti-RBLL. Ces résultats sont cohérents avec les résultats observés avec *NbRBL* capable de se lier aux

carbohydrates et contribuant à l'adhésion de la spore (Liu et al., 2016). En effet, les protéines RBL pourraient être relarguées lors de la germination des spores au fur et à mesure que le contenu sporal traverse le tube polaire. *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2* pourraient donc contribuer à l'ancrage du tube polaire en se liant aux carbohydrates des cellules-hôtes par l'intermédiaire du domaine Ricin B Lectin. La distance entre la cellule-hôte et les spores étant plus courte pour la germination, le sporoplasme serait internalisé dans l'hôte par un mécanisme endocytaire. Ces protéines possèdent toute une région Ricin B Lectin et il a été démontré que ces lectines interagissent avec les glycolipides ou les glycoprotéines présentés à la surface des cellules (Olsnes, 2004; Sandvig, 2000). Une fois que les lectines ont interagi avec les fragments glycosylés à la surface des cellules, elles sont vraisemblablement importées par les endosomes dans le cytosol des cellules-hôtes (Cummings and Schnaar, 2017).

Les RBL sont décrites comme des glycoprotéines composées de deux chaînes, une chaîne A impliquée dans l'inhibition de la synthèse protéique et une chaîne B (lectin), qui interagit avec les glycoprotéines et les glycolipides à la surface des cellules (Audi et al., 2005; Olsnes, 2004). Les lectines RBL peuvent être impliquées dans divers mécanismes tels que l'inhibition de l'activité protéique, les voies de l'apoptose ou la libération de médiateurs inflammatoires cytokiniques (Audi et al., 2005). De nombreux pathogènes synthétisent des lectines qui interagissent souvent avec des glycoconjugués sur les cellules-hôtes, favorisant l'adhésion cellulaire, l'invasion et la colonisation des cellules-hôtes (Favila et al., 2015; Nogueira et al., 2016; Persson et al., 2008; Sardinha-Silva et al., 2019). Les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*, protozoaires entériques, possèdent une lectine de surface jouant un rôle dans l'adhésion du parasite au galactose et N-acetyl-D-galactosamine de l'hôte (Petri et al., 2002, 1987). Les protéines de micronèmes (MICs) et de rhoptries sécrétées (ROPs et RONs) du protozoaire *Toxoplasma gondii*, joue un rôle important dans la reconnaissance de la cellule-hôte, l'attachement et la pénétration (Carruthers and Sibley, 1997). Deux protéines MICs, MIC1 et MIC4, possèdent des domaines lectines capables de se lier aux oligosaccharides avec des acides sialiques et des D-galactose en position terminale, respectivement (Blumenschein et al., 2007; Brecht et al., 2001; Lourenço et al., 2001; Marchant et al., 2012; Sardinha-Silva et al., 2019). Cependant, *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2* n'ont pas permis d'éteindre complètement l'infection, indiquant l'implication d'autres composants moléculaires dans le processus d'adhésion. De plus, le mécanisme moléculaire de l'interaction des RBL avec les cellules-hôtes est inconnu chez les microsporidies.

1.2.2. Autres protéines sécrétées

La sélection de protéines potentiellement impliquées dans les processus d'infection basée sur la littérature a également permis d'identifier et de produire 5 autres protéines chez *E. cuniculi* (*EcSWP26*, *EcSWP7*, *EcSWP9*, *EcSWP12*). Les résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence un marquage pariétal ainsi qu'un marquage du tube polaire sauf pour *EcSWP7*. De ce fait, et afin d'aller plus loin dans le décryptage du processus d'infection, il sera nécessaire de réaliser des tests fonctionnels d'inhibition permettant alors de mettre en évidence le rôle de ces protéines. En effet, il a été décrit dans la littérature chez *N. bombycis* que les protéines *NbSWP26* et *NbSWP12* sont distribuées au niveau de l'exospore et possédant pour *NbSWP26* une implication dans les processus d'adhésion. Il a également été démontré que la protéine *SWP5* interagit avec les protéines du tube polaire *PTP2* et *PTP3*, et qu'elle jouerait donc un rôle important dans le soutien de l'ancrage du tube polaire à la paroi des spores (Yang et al., 2018). Enfin, la protéine *EcSWP9* s'accumulerait au niveau du disque d'ancrage et dans la partie terminale du tube polaire extrudé (Yang et al., 2018) et serait impliquée dans le processus de germination alors que *NbSWP7* contribuerait à l'attachement de la spore à la cellule et au processus d'infection (Yang et al., 2018).

L'absence de marquage avec l'anti-*EcSWP7* pourrait être expliquée par le fait que cette protéine soit l'orthologue à la protéine *EHEL_111090* (*EhSSP1*) chez *E. hellem* qui serait une protéine du sporoplasme. En effet, suite à l'extrusion du tube polaire, le sporoplasme passe à travers le tube polaire, apparaissant comme une goutte présente à l'extrémité du tube polaire restant ainsi attaché à celui-ci pendant quelques minutes (Han et al., 2019). Il semblerait que le tube polaire soit étroitement associé au sporoplasme à l'intérieur et à l'extérieur de la spore. Han et al. 2019 ont mis en évidence une interaction entre la protéine du tube polaire *PTP4* et *EhSSP1*. Cette interaction entre *EhSSP1* et *PTP4* pourrait jouer un rôle important dans l'ancrage du sporoplasme à l'extrémité du tube polaire après dévagination. De plus, cette interaction pourrait être impliquée dans la capacité du tube polaire à s'enrouler autour du sporoplasme dans la spore, établissant ainsi un point d'ancrage pour une interaction entre le tube polaire et la membrane du sporoplasme. Les orthologues de cette protéine *EhSSP1* sont très conservés chez *E. cuniculi*, *E. intestinalis* et *E. romaleae*, avec une identité de séquence supérieure à 85% (Han et al., 2019) notamment avec *EcSWP7*. La protéine recombinante *rEhSSP1* ainsi que les anticorps anti-*EhSSP1* ont permis de diminuer significativement l'infectiosité des microsporidies, suggérant le rôle d'*EhSSP1* dans l'invasion. Cette étude a également démontré

que EhSSP1 interagit avec des canaux de la membrane externe mitochondriale : les VDAC. Les protéines VDAC sont des porines mitochondriales et sont majoritairement exprimées au niveau de la membrane externe mitochondriale (Han et al., 2019; Hoogenboom et al., 2007). Chez les mammifères, trois isoformes ont été identifiées : VDAC1, VDAC2 et VDAC3 et toutes ces isoformes présentent une grande similitude à la fois au niveau de la séquence et de la structure (Han et al., 2019; Messina et al., 2012). De manière générale, les VDACs contrôlent le passage de métabolites à travers la membrane externe et possèdent également une fonction pathologique en tant que médiateurs de l'apoptose par voie mitochondriales par la formation de pores de transition de perméabilité (Han et al., 2019; Rostovtseva et al., 2005). Plus récemment, il a été rapporté que les VDAC des cellules-hôtes interagissent avec des agents pathogènes intracellulaires. Les VDAC ont été identifiées comme des composants de la membrane phagosomique de *Mycobacterium avium* et ont servi de transporteurs de lipides mycobactériens dans le cytoplasme via l'interaction avec une lipoprotéine bactérienne (Danelishvili et al., 2017; Han et al., 2019). Au cours de l'infection par *E. cuniculi*, les VDAC de l'hôte ont été retrouvées à l'interface de la vacuole parasitophore et des mitochondries et sont impliquées dans la récupération de l'ATP directement de l'hôte (Hacker et al., 2014).

De ce fait, il serait intéressant de mettre en évidence la reconnaissance de protéines du sporoplasme par l'anticorps anti-*EcSWP7* ainsi que la présence d'un récepteur cellulaire au site d'attachement du tube polaire pour étudier son potentiel rôle dans le processus d'infection.

II. Étude du mécanisme d'action du polysaccharide de *Porphyridium marinum* (PM)

La deuxième partie de mes travaux a porté sur des polysaccharides possédant une activité anti-microsporidienne, avec pour objectifs, d'une part, de mieux comprendre le mode d'action du polysaccharide de *Porphyridium marinum* (PM), présentant des activités anti-microsporidienne (Roussel et al., 2015) et, d'autre part, le criblage de nouveaux polysaccharides d'origine animale.

Depuis quelques années, de nombreuses études sont menées sur l'activité de molécules provenant de microalgues telles que les polysaccharides, les protéines, les lipides et les pigments dont leurs propriétés biologiques et physico-chimiques peuvent être utilisées dans les industries alimentaires, cosmétiques, médicales et pharmacologiques (Delattre et al., 2016;

Li et al., 2019; Prybylski et al., 2020). Parmi ces microalgues, les microalgues rouges, particulièrement celles du genre *Porphyridium* et *Rhodella*, ont suscité un intérêt particulier de par leur haute teneur en exopolysaccharides sulfatés (Raposo et al., 2014). Ces polymères sont dotés de nombreuses activités biologiques notamment anti-virale, anti tumorale, anti-oxydante (Ngo and Kim, 2013) et anti-parasitaire (Roussel et al., 2015). Le genre *Porphyridium* constitue notamment une source importante d'exopolysaccharides sulfatés (EPS) et possède de nombreuses activités biologiques en lien probablement avec des spécificités structurales et des groupements spécifiques liés à l'espèce et aux conditions de production. En effet, ces composés ont démontré des activités anti-virales contre les virus de l'herpès (Huheihel et al., 2002) en éliminant les effets cytopathogènes liés à l'infection de cellules Vero (cellules de rein de singe) sans effet cytotoxique. Les auteurs de cette étude ont également montré de manière indirecte l'interaction de l'EPS avec les particules virales suggérant ainsi une action sur les processus d'adsorption des virus à la surface des cellules Vero bloquant ainsi l'invasion de ces dernières (Huheihel et al., 2002). Toutefois, il semblerait que ces EPS puissent avoir un effet pléiotropique, en agissant, entre autres, par blocage de la synthèse des protéines virales. Il est également intéressant d'ajouter que ces polysaccharides ont également permis de prévenir l'infection par le virus HSV-1 (Human Simplex Virus) chez des rats nouveau-nés et des lapins, ce qui montre le potentiel de ces EPS pour lutter contre cette infection virale.

Une étude récente a montré l'activité anti-fongique de fractions de *P. marinum* sur la formation de biofilm par *Candida albicans*. *C. albicans* est le microorganisme le plus courant parmi les infections fongiques, provoquant une mortalité et une morbidité élevées en particulier chez les personnes immunodéprimées (Lin et al., 2019). Dans cette étude, l'utilisation de faibles concentrations de PM a permis de réduire la formation du biofilm de l'ordre de 90% (Gargouch et al., 2021).

Dans la suite des travaux de Roussel et al. (2015), j'ai entrepris de comprendre le mode d'action du PM sur l'infection des cellules par *E. cuniculi*. J'ai tout d'abord vérifié l'activité du PM pour être sûr de travailler sur un composé biologiquement actif ; j'ai ainsi confirmé la capacité du PM à réduire de manière importante l'infection. De plus, j'ai pu mettre en évidence que ce composé était actif quand on pré-traite les cellules et non pas les spores, suggérant que le PM agirait en se fixant sur les cellules-hôtes bloquant ainsi l'adhésion des spores. Pour avancer sur cette hypothèse, j'ai réalisé un marquage du PM par couplage chimique à un fluorochrome qui a été mis en contact d'une part avec les spores d'*E. cuniculi* et d'autre part avec les cellules-

hôtes. Ceci a permis de mettre en évidence un marquage non uniforme des cellules HFF, ce qui renforce notre hypothèse sur le fait le PM créerait une barrière au niveau des cellules. Nous pensons que le polysaccharide se lierait à des récepteurs à la surface des cellules-hôtes ciblés par *E. cuniculi* et impliqués dans l'infection. Le PM pourrait ainsi mimer des structures sucrées présentes à la surface des spores impliquées dans l'interaction avec les récepteurs de l'hôte. L'annotation du génome d'*E. cuniculi* suggère la présence d'une O-mannosylation comme seul mode de O-glycosylation (Katinka et al., 2001). Taupin et al. (2007) a d'ailleurs montré que des lectines fixant le mannose réagissaient avec le capuchon polaire au niveau de la spore et avec plusieurs bandes protéiques d'un extrait protéique total d'*E. cuniculi* (Taupin et al., 2007). Des glycanes avec des liaisons O-glycosidiques ont été identifiés comme étant des manno-oligosaccharides linéaires contenant jusqu'à 8 résidus mannoses liés en $\alpha 1,2$, ce qui ressemble à ce qu'on trouve chez les champignons et ce qui peut expliquer pourquoi le PM est aussi actif sur *C. albicans* (Gargouch et al., 2021). Le PM ne possède pas de mannose mais pourrait adopter une structure similaire aux mannanes présents à la surface de spores. Toutefois, ces processus d'adhésion pourraient être liés au degré de sulfatation du PM ou à la charge.

La suite du travail serait de pouvoir identifier les récepteurs ciblés par le PM ; pour cela nous avons envisagé de mettre en place une colonne d'affinité chargée en PM en effectuant un greffage du polysaccharide à des billes de sepharose selon le protocole publié par Funahashi et al., 1982. En effet, au cours de cette étude, trois types de greffage d'héparine à la sepharose avaient été proposés. Le principe général est le suivant : Un époxyde est ajouté à la sepharose grâce à de l'épichlorohydrine suivi d'une amination. Cette première liaison permet d'obtenir une « amino-sepharose ». Suite à cela, trois étapes différentes seront réalisées pour permettre la liaison du PM à la sepharose. Dans le premier cas, de l'EDC, un carbodiimide soluble dans l'eau sera utilisé pour activer les acides carboxyliques présents dans le PM, ceci permettra la liaison avec l'amine primaire de la sepharose. Dans le deuxième cas, de l'anhydride succinique est ajouté pour obtenir un « carboxyl-sepharose » puis les mêmes étapes avec l'EDC ont été réalisées. Enfin dans le troisième cas, le PM ainsi que la sepharose sont mis en contact avec un hydrure qui permettra la réduction des amines et la liaison du PM à la sepharose. L'objectif final sera ainsi de faire passer un extrait de protéines de surface des cellules-hôtes obtenu par une approche « Surfomics » et par conséquent, récupérer un complexe « PM-récepteurs ciblés ». L'identification de ces récepteurs nous permettrait de tester l'interaction du PM avec ces récepteurs par l'approche ITC (Isothermal Titration Calorimetry) permettant de caractériser

des interactions physiques entre 2 partenaires moléculaires. Dans un second temps, nous pourrions également tester par ITC l'interaction des récepteurs identifiés avec les protéines parasitaires susceptibles d'être impliquées dans l'infection (identifiées dans la première partie). Pour la colonne d'affinité, il est plus efficace de travailler avec des oligosaccharides ; c'est la raison pour laquelle nous envisageons de fragmenter le PM en oligosaccharides et d'évaluer leur activité antimicrosporidienne. En effet, l'activité biologique des polysaccharides dépend de leurs caractéristiques structurales comme le degré de sulfatation, le type de sucre, les ramifications glycosidiques et le poids moléculaire (Qi et al., 2005; Zhang et al., 2003). Ainsi, les polysaccharides de faibles poids moléculaires sont plus actifs que les polysaccharides de hauts poids moléculaires. Il a notamment été démontré que les dextrans sulfatés avec un poids moléculaire de 10 à 500 kDa ont une activité anti-VIH (Sun et al., 2009). De plus, Gargouch et al. (2021) a montré que deux fragments du PM possèdent une activité anti-proliférative sur les cellules cancéreuses du sein plus importante que le polysaccharide. Cette activité serait attribuée à leurs faibles masses molaires et par conséquent leurs faibles viscosités, augmentant ainsi leur capacité d'absorption et de perméation (Gargouch et al., 2021).

Nous avons vu que le PM semble agir en fixant sur les cellules-hôtes, il nous a semblé intéressant de rechercher des glycanes qui cibleraient à l'inverse les spores microsporidiennes. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de cribler d'autres polysaccharides, dont certains d'origine animale qui sont présents à la surface des cellules animales et qui pourraient servir de leurres pour *E. cuniculi*, les empêchant d'utiliser ces mêmes composés comme portes d'entrée. De plus, si nous envisageons une application de nos recherches, il nous semble plus intéressant de cibler spécifiquement les spores microsporidiennes plutôt que les cellules-hôtes. En effet, des glycanes qui fixeraient les cellules-hôtes pourraient engendrer de la toxicité ou des modifications physiologiques des cellules. Les polysaccharides ont donc été testés *in vivo* sur des abeilles infectées par *N. ceranae*. Les résultats obtenus montrent une diminution significative de la charge parasitaire pour trois polysaccharides : le dextrane sulfate, le succinoglycane et l'arabinogalactane (P3, P5 et P6) ainsi que pour le PM et la fumagilline. Cependant, le traitement avec la fumagilline semble plus efficace. L'analyse de la survie n'a, en revanche, montré aucune amélioration par rapport au contrôle infecté non traité, y compris la fumagilline pourtant active contre *N. ceranae*. Ceci indiquerait qu'un facteur extérieur (virus, bactérie par exemple) à l'infection par *N. ceranae* serait en partie responsable des mortalités observées. Ces polysaccharides ont fait l'objet de nombreuses études notamment pour leur

activité biologique. En ce qui concerne le dextrane sulfate, un carbohydrate polysulfaté issu de microorganismes du sol, est connu notamment pour son effet inhibiteur sur l'infection de *T. gondii* (Ishiwa et al., 2013; Kato et al., 2016) ou encore pour leur activité anti-VIH (Sun et al. 2009). Le succinoglycane quant à lui est un exopolysaccharide, acide, soluble dans l'eau, produit principalement par un nombre important de micro-organismes des genres *Agrobacterium*, *Rhizobium* ou encore *Pseudomonas* (Halder et al., 2017). Il est utile notamment pour l'infection de la luzerne par la bactérie *Rhizonium meliloti* pour établir une symbiose avec la plante. Enfin, les arabinogalactanes sont une catégorie de polysaccharides particulièrement intéressante car ils sont retrouvés chez de nombreuses plantes comme le radis, le tamarillo ou encore le thé vert (Tang et al., 2019). Les arabinogalactanes issus du Mélèze d'Europe (espèce d'arbre) ont été étudiés pour leur activité immunostimulatrice (Currier et al., 2003).

Nous avons émis l'hypothèse que les polysaccharides pouvaient agir sur le processus d'adhésion des spores microsporidiennes, il serait ainsi intéressant d'utiliser le PM fluorescent sur des abeilles infectées pour suivre et localiser ce composé dans les tissus de l'abeille et principalement au niveau intestinal. Cependant, il n'est pas exclu que le PM puisse avoir d'autres modes d'action comme l'immunostimulation. Il est connu que ces composés peuvent stimuler les défenses immunitaires à la fois chez les vertébrés et les invertébrés (De Jesus Raposo et al., 2015). Il serait donc intéressant lors des prochaines expériences de suivre les gènes de l'abeille impliqués dans les voies humorale et cellulaire de l'immunité par qRT-PCR. Ces travaux permettraient de mieux comprendre le potentiel anti-microsporidien des polysaccharides, et du PM en particulier.

Conclusion

Conclusion

Malgré les nombreuses études portant sur les microsporidies, le processus d'infection ainsi que les acteurs moléculaires impliqués demeurent à l'heure actuelle mal connus. Mes travaux de thèse ont permis de contribuer et d'approfondir la compréhension des mécanismes d'adhésion et d'infection d'*E. cuniculi* et d'*A. algerae* par l'identification et la caractérisation de nouvelles protéines de paroi et du tube polaire de la spore. Ces travaux ont notamment permis d'identifier des protéines *EcRBLL-1*, *AaRBL-1* et *AaRBLL-2* et de valider leur implication fonctionnelle dans le processus d'infection chez *E. cuniculi* et *A. algerae*. Ils ouvrent également de nouvelles perspectives d'étude sur le rôle des protéines de type Ricin B like, impliquées dans les interactions hôtes/parasites chez plusieurs organismes, et qui pourraient comme l'a montré notre étude, contribuer activement chez les microsporidies à la reconnaissance hôte/parasite et à l'invasion des cellules. Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication en cours de révision dans *Parasitology International*. Les résultats obtenus de la sélection de protéines potentiellement impliquées dans les processus d'infection basée sur la littérature (*EcSWP7*, *EcSWP9*, *EcSWP12* et *EcSWP26*) sont également prometteurs. En effet, la localisation des protéines *EcSWP9*, *EcSWP12* et *EcSWP26* au niveau de la paroi et au tube polaire de la spore, laisse présager des résultats encourageants quant à leur rôle dans les processus d'infection, et feront l'objet d'une seconde valorisation par la publication d'un article.

L'approche surfomics s'est révélée être une approche adaptée à l'identification de protéines de surfaces impliquées dans l'adhésion, et a notamment permis, en complément d'une approche *in silico*, de sélectionner 6 protéines (*AaRBLL-1*, *AaP6BE05*, *AaP13YM*, *AaP696T*, *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP03248*) potentiellement impliquées dans l'adhésion. La validation du rôle de ces protéines candidates dans le processus d'infection est en cours de réalisation par des tests fonctionnels d'inhibition, et les résultats au terme de cette étude devront faire l'objet d'une valorisation sous la forme d'une publication.

L'ensemble de mes travaux ouvrent de nombreuses perspectives quant à la compréhension du processus d'infection chez les microsporidies. Notamment, l'identification et la caractérisation des récepteurs cellulaires de l'hôte, cibles des RBLLs microsporidiennes, devraient contribuer à mieux comprendre les voies d'entrée des parasites, et pourraient

permettre d'envisager à long terme des approches prophylactiques. Dans ce but, des approches de type « pull-down » seront développées pour la purification des récepteurs cellulaires cibles. En parallèle, des approches fonctionnelles basées sur l'ARN interférence pourraient aider à mieux comprendre le rôle de ces protéines RBLL dans les processus d'adhésion et d'infection chez les microsporidies. Huang en 2018 a démontré qu'*A. algerae* fait partie des espèces de microsporidies possédant le système d'ARN interférence et pourrait donc constituer un modèle approprié pour une telle approche (Huang, 2018). Quelques études ont étudié l'efficacité de l'utilisation de siRNA ciblant des gènes spécifiques chez les microsporidies, principalement chez *N. cerenae* et *Heterosporis saurida*, microsporidies parasites d'abeille et de poissons-lézards respectivement (Kim et al., 2020; Saleh et al., 2016).

Les polysaccharides présentent un intérêt certain de part de leur potentiel actif et leurs possibles applications dans de nombreux domaines tels que la cosmétique (Campos et al., 2014), l'industrie (agro-alimentaire, industrie du papier par exemple) (Di Donato et al., 2014), ou encore dans le domaine biomédical (Prybylski et al., 2020). Bien qu'il a été démontré les activités antiparasitaires de certains polysaccharides, le mécanisme d'action de ces molécules reste peu exploré. C'est dans ce contexte que nous avons initié une approche visant à mieux comprendre l'action d'un exopolysaccharide produit par la microalgue *Porphyridium marinum* identifiée et caractérisée dans le cadre du projet ANR SUPOBEE. Les premiers résultats de mes travaux de thèse ont permis de montrer, pour la première fois, que le polysaccharide de *P. marinum* agirait en formant une barrière au niveau des cellules-hôtes empêchant probablement la fixation des spores d'*E. cuniculi*. Le mécanisme d'action n'étant pas complètement élucidé, des pistes intéressantes sont envisagées afin de déterminer les paramètres structuraux associés/responsables de son activité antiparasitaire. La génération d'oligosaccharides sera envisagée afin de déterminer l'effet de la taille du polysaccharide, de même que la modulation de la charge globale du polysaccharide qui nous permettra de considérer l'implication d'interactions ioniques entre le polysaccharide et la surface de la cellule hôte. L'identification de récepteurs membranaires de la cellule hôte sera également mise en œuvre par des approches de greffage du polysaccharide sur colonne de sepharose afin de purifier les cibles protéiques à partir d'extraits de protéines de surface de la cellule hôte. Enfin, en parallèle de l'étude du PM, la recherche de nouveaux actifs polysaccharidiques anti-microsporidiens a permis de sélectionner de nouvelles molécules (dextrane sulfate, succinoglycane et arabinogalactane) possédant une activité particulièrement intéressante sur

la charge parasitaire d'abeilles infectées par *N. ceranae*. Ces premières données ouvrent des perspectives d'études prometteuses quant à la caractérisation des mécanismes d'action au même titre que celles développées pour le polysaccharide de *Porphyridium marinum*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- A.P.H.A, 1971. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, in: Public Health. American Public Health Association., pp. 237–239.
- Adams, J.H., Blair, P.L., Kaneko, O., Peterson, D.S., 2001. An expanding ebl family of Plasmodium falciparum. Trends Parasitol. 17, 297–299. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01948-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01948-1)
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. Molecular Biology of the Cell, 4th editio. ed.
- Alvarado, J.J., Nemkal, A., Sauder, J.M., Russel, M., Akiyoshi, D.E., Shi, W., Almo, S.C., Weiss, L.M., 2009. Structure of a microsporidian methionine aminopeptidase type 2 complexed with fumagillin and TNP470. Mol Biochem Parasitol 168, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.07.008.STRUCTURE>
- Alvarez-Domínguez, C., Vázquez-Boland, J.A., Carrasco-Marín, E., López-Mato, P., Leyva-Cobián, F., 1997. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of Listeria monocytogenes, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. Infect. Immun. 65, 78–88. <https://doi.org/10.1128/iai.65.1.78-88.1997>
- Amna Kashif, S., Hwang, Y.J., Park, J.K., 2018. Potent biomedical applications of isolated polysaccharides from marine microalgae Tetraselmis species. Bioprocess Biosyst. Eng. 41, 1611–1620. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1987-z>
- Arad, S., Levy-Ontman, O., 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: Biotechnological aspects. Curr. Opin. Biotechnol. 21, 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.008>
- Armistead, J.S., Wilson, I.B.H., Van Kuppevelt, T.H., Dinglasan, R.R., 2011. A role for heparan sulfate proteoglycans in Plasmodium falciparum sporozoite invasion of anopheline mosquito salivary glands. Biochem. J. 438, 475–483. <https://doi.org/10.1042/BJ20110694>
- Audi, J., Belson, M., Patel, M., Schier, J., Osterloh, J., 2005. Ricin Poisoning. Jama 294, 2342–2351. <https://doi.org/10.1001/jama.294.18.2342>
- Bacchi, C.J., Rattendi, D., Faciane, E., Yarlett, N., Weiss, L.M., Frydman, B., Woster, P., Wei, B.,

- Marton, L.J., Wittner, M., 2004. Polyamine metabolism in a member of the phylum Microspora (*Encephalitozoon cuniculi*): effects of polyamine analogues. *Microbiol.* 150, 1215–1224. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26889-0>. Polyamine
- Bacchi, C.J., Yarlett, N., Weiss, L.M., 2003. Polyamine metabolism in the Microsporidia. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 420–423. <https://doi.org/10.1042/BST0310420>
- Balbani, G., 1882. Sur les microsporidies ou les sporospermies des articules. *C. R. Acad. Sci.* 95, 1168–1178.
- Bambino-Medeiros, R., Oliveira, F.O., Calvet, C.M., Vicente, D., Toma, L., Krieger, M.A., Meirelles, M.N., Pereira, M.C., 2011. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. *Parasitology* 138, 593–601. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001678>
- Becnel, J.J., Andreadis, T.G., 1999. Microsporidia in insects. The microsporidia and microsporidiosis 447–501.
- Beznoussenko, G. V., Dolgikh, V. V., Seliverstova, E. V., Semenov, P.B., Tokarev, Y.S., Trucco, A., Micaroni, M., Di Giandomenico, D., Auinger, P., Senderskly, I. V., Skarlato, S.O., Snigirevskaya, E.S., Komissarchik, Y.Y., Pavelka, M., De Matteis, M.A., Luini, A., Sokolova, Y.Y., Mironov, A.A., 2007. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: Structure and vesicular mechanisms of function. *J. Cell Sci.* 120, 1288–1298. <https://doi.org/10.1242/jcs.03402>
- Bhat, S.A., Bashir, I., Kamili, A.S., 2009. Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera-Bombycidae): A review, *African Journal of Agricultural Research*.
- Bhella, D., 2015. The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0035>
- Bigliardi, E., Riparbelli, M.G., Selmi, M.G., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04621.x>
- Bigliardi, E., Sacchi, L., 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect.* 3, 373–379. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01393-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01393-4)
- Blumenschein, T.M.A., Friedrich, N., Childs, R.A., Saouros, S., Carpenter, E.P., Campanero-Rhodes, M.A., Simpson, P., Chai, W., Koutroukides, T., Blackman, M.J., Feizi, T., Soldati-Favre, D., Matthews, S., 2007. Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* 26, 2808–2820. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601704>

- Bohne, W., Böttcher, K., Groß, U., 2011. The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: Biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.006>
- Bohne, W., Ferguson, D.J.P., Kohler, K., 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.2268-2275.2000>
- Bouzahzah, B., Nagajyothi, F., Ghosh, K., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Weiss, L.M., 2010. Interactions of *encephalitozoon cuniculi* polar tube proteins. *Infect. Immun.* 78, 2745–2753. <https://doi.org/10.1128/IAI.01205-09>
- Bouzahzah, B., Weiss, L.M., 2010. Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol Res* 107, 761–764. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1950-7>.Glycosylation
- Brecht, S., Carruthers, V.B., Ferguson, D.J.P., Giddings, O.K., Wang, G., Jäkle, U., Harper, J.M., Sibley, L.D., Soldati, D., 2001. The *Toxoplasma* Micronemal Protein MIC4 Is an Adhesin Composed of Six Conserved Apple Domains. *J. Biol. Chem.* 276, 4119–4127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008294200>
- Bronnvall, A.M., Larsson, J.I., 1995. Description of *Binucleospora elongata* gen. et sp. nov. (microspora, caudosporidae), a microsporidian parasite of ostracods of the genus *Candona* (crustacea, cyprididae) in Sweden. *Eur. J. Protistol.* 31, 63–72. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80358-5](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80358-5)
- Brosson, D., Kuhn, L., Prensier, G., Vivarès, C.P., Texier, C., 2005. The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: A surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 247, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.031>
- Cali, A., Becnel, J.J., Takvorian, P.M., 2017. *Microsporidia*, 2nd ed. ed, *Handbook of the Protists*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_27-1
- Cali, A., Kotler, D.P., Orenstein, J.M., 1993. *Septata intestinalis* N.G., N. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J. Euk. Microbiol.* 40, 101–112. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04889.x>
- Cali, A., Neafie, R., Weiss, L.M., Ghosh, K., Vergara, R.B., Gupta, R., Takvorian, P.M., 2010. Human Vocal Cord Infection with the Microsporidium *Anncaliia algerae*. *J Eukaryot*

- Microbiol 57, 562–567. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2010.00510.x>
- Cali, A., Takvorian, P.M., 2014. Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia, in: Weiss, L.M., Becnel, J.J. (Eds.), *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 71–133. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch2>
- Campbell, S.E., Williams, T.A., Yousuf, A., Soanes, D.M., Paszkiewicz, K.H., Williams, B.A.P., 2013. The Genome of *Spraguea lophii* and the Basis of Host-Microsporidian Interactions. *PLoS Genet.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003676>
- Campos, M.P., de Melo, M., de Camargo, J.F., Junior, D.C., 2014. Effects of polysaccharide-based formulations on human skin, Ramawat K. ed, *Polysaccharides*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6>
- Carruthers, V.B., Giddings, O.K., Sibley, L.D., 1999. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell. Microbiol.* 1, 225–235. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00023.x>
- Carruthers, V.B., Håkansson, S., Giddings, O.K., David Sibley, L., 2000. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infect. Immun.* 68, 4005–4011. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4005-4011.2000>
- Carruthers, V.B., Sibley, L.D., 1997. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 114–23.
- Casadevall, A., 2008. Evolution of intracellular pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 19–33. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093305>
- Cawse, P.A., 1967. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrometry. *Analyst.* 62, 311–315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/AN9679200311>
- Cérède, O., Dubremetz, J.F., Bout, D., Lebrun, M., 2002. The *toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *EMBO J.* 21, 2526–2536. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2526>
- Charron, A.J., Sibley, L.D., 2004. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic* 5, 855–867. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00228.x>
- Chen, J., Geng, L., Long, M., Li, T., Li, Z., Yang, D., Ma, C., Wu, H., Ma, Z., Li, C., Pan, G., Zhou, Z., 2013. Identification of a novel chitin-binding spore wall protein (NbSWP12) with a BAR-2 domain from *Nosema bombycis* (microsporidia). *Parasitology* 140, 1394–1402.

<https://doi.org/10.1017/S0031182013000875>

- Chen, L., Li, R., You, Y., Zhang, K., Zhang, L., 2017. A Novel Spore Wall Protein from *Antonospora locustae* (Microsporidia: Nosematidae) Contributes to Sporulation. *J. Eukaryot. Microbiol.* 64, 779–791. <https://doi.org/10.1111/jeu.12410>
- Chioralia, G., Trammer, T., Maier, W.A., Seitz, H.M., 1997. Morphologic changes in *Nosema algerae* (Microspora) during extrusion. *Parasitol. Res.* 84, 123–131. <https://doi.org/10.1007/s004360050368>
- Cohen, M., Varki, A., 2010. The sialome—far more than the sum of its parts. *Omi. A J. Integr. Biol.* 14, 455–464. <https://doi.org/10.1089/omi.2009.0148>
- Costa, S.F., Weiss, L.M., 2000. Drug treatment of microsporidiosis. *Drug Resist. Updat.* 3, 384–399. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0174>
- Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R., Zimmerli, S., 2000. Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 68, 6939–6945. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6939-6945.2000>
- Coyle, C.M., Wittner, M., Kotler, D.P., Noyer, C., Orenstein, J.M., Tanowitz, H.B., Weiss, L.M., 1996. Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: Determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. *Clin. Infect. Dis.* 23, 1002–1006. <https://doi.org/10.1093/clinids/23.5.1002>
- Cummings, R.D., Schnaar, R.L., 2017. R-Type Lectins, in: Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY). <https://doi.org/10.1101/glycobiology.3e.031>
- Currier, N.L., Lejtenyi, D., Miller, S.C., 2003. Effect over time of in-vivo administration of the polysaccharide arabinogalactan on immune and hemopoietic cell lineages in murine spleen and bone marrow. *Phytomedicine* 10, 145–153. <https://doi.org/10.1078/094471103321659852>
- Damonte, E., Matulewicz, M., Cerezo, A., 2012. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Antiviral Agents. *Curr. Med. Chem.* 11, 2399–2419. <https://doi.org/10.2174/0929867043364504>
- Danelishvili, L., Chinison, J.J.J., Pham, T., Gupta, R., Bermudez, L.E., 2017. The Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) of *Mycobacterium avium* phagosome are associated with bacterial survival and lipid export in macrophages. *Sci. Rep.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06700-3>

- Dang, X., Pan, G., Li, T., Lin, L., Ma, Q., Geng, L., He, Y., Zhou, Z., 2013. Characterization of a subtilisin-like protease with apical localization from microsporidian *Nosema bombycis*. *J. Invertebr. Pathol.* 112, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.10.009>
- Davidse, L.C., 1986. Benzimidazole Fungicides; mechanism of action and biological impact. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 43–65. <https://doi.org/10.1002/9783527664412.ch9>
- de Graaf, D.C., Raes, H., Jacobs, F.J., 1994. Spore dimorphism in *Nosema apis* (Microsporidia, Nosematidae) developmental cycle, *J. Invertebr. Pathol.* 63 (1994) 92–94. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 92–94.
- De Jesus Raposo, M., De Morais, A., De Morais, R., 2015. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar. Drugs* 13, 2967–3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P., 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 34, 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
- Delbac, F., Peuvrel, I., Metenier, G., Peyretailade, E., Vivares, C.P., 2001. Microsporidian invasion apparatus: Identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of *ptp1* and *ptp2* genes in three *Encephalitozoon* species. *Infect. Immun.* 69, 1016–1024. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.1016-1024.2001>
- Delbac, F., Peyret, P., Méténier, G., David, D., Danchin, A., Vivarès, C.P., 1998. On proteins of the microsporidian invasive apparatus: Complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Microbiol.* 29, 825–834. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00975.x>
- Delbac, F., Polonais, V., 2008. The microsporidian polar tube and its role in invasion. *Subcell. Biochem* 47, 208–220. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_17
- Desjardins, C.A., Sanscrainte, N.D., Goldberg, J.M., Heiman, D., Young, S., Zeng, Q., Madhani, H.D., Becnel, J.J., Cuomo, C.A., 2015. Contrasting host-pathogen interactions and genome evolution in two generalist and specialist microsporidian pathogens of mosquitoes. *Nat. Commun.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms8121>
- Desportes, I., Charpentier, Y., Le, Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P., Modigliani, R., 1985. Occurrence of a New Microsporidian: *Enterocytozoon bienersi* n. g., n. sp., in the Enterocytes of a Human Patient with AIDS. *J. Protozool.* 32, 250–254. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb03046.x>

- Di Donato, P., Poli, A., Taurisano, V., Nicolaus, B., 2014. Polysaccharides: Applications in Biology and Biotechnology/Polysaccharides from bioagro-waste new biomolécules-life, Ramawat K. ed, Polysaccharides. Springer International Publishing Switzeland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6>
- Didier, E.S., Snowden, K.F., Shadduck, J.A., 1998. Biology of microsporidian species infecting mammals, Advances in Parasitology. Academic Press Limited. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60125-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60125-6)
- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2011. Microsporidiosis: Not just in AIDS patients. Curr. Opin. Infect. Dis. 24, 490–495. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834aa152>
- Didier, P.J., Didier, E.S., Orenstein, J.M., Shadduck, J.A., 1991. Fine Structure of a new human microsporidian *Encephalitozoon hellem*, in culture. J. protozool 38, 502–507. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5764-9_10
- Ding, Z., Pan, J., Huang, H., Jiang, G., Chen, J., Zhu, X., Wang, R., Xu, G., 2018. An integrated metabolic consequence of *Hepatospora eriocheir* infection in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Fish Shellfish Immunol. 72, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.028>
- Donovan, M.J., Maciuba, B.Z., Mahan, C.E., McDowell, M.A., 2009. Leishmania infection inhibits cycloheptide-induced macrophage apoptosis in a strain dependent manner. Exp. Parasitol. 123, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.012>.Leishmania
- dos Santos Amorim, R. das N., Rodrigues, J.A.G., Holanda, M.L., Quinderé, A.L.G., de Paula, R.C.M., Melo, V.M.M., Benevides, N.M.B., 2012. Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. Brazilian Arch. Biol. Technol. 55, 171–181. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000200001>
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal Chem 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dunn, A.M., Smith, J.E., 2001. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. Microbes Infect. 3, 381–388. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01394-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01394-6)
- Dwek, R.A., 1995. Glycobiology: “Towards understanding the function of sugars.” Biochem. Soc. Trans. 23, 1–25. <https://doi.org/10.1042/bst0230001>
- Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M.F., Tomavo, S., 2000. Targeted disruption of

- the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Mol. Microbiol.* 37, 574–582. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02014.x>
- El Alaoui, H., Grésoviac, S.J., Vivarès, C.P., 2006. Occurrence of the microsporidian parasite *Nucleospora salmonis* in four species of salmonids from the Massif Central of France. *Folia Parasitol. (Praha)*. 53, 37–43. <https://doi.org/10.14411/fp.2006.002>
- Esko, J.D., Sharon, N., 2009. Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins., in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Fasshauer, V., Gross, U., Bohne, W., 2005. The parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. *Eukaryot. Cell* 4, 221–224. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.221-224.2005>
- Favila, M.A., Geraci, N.S., Jayakumar, A., Hickerson, S., Mostrom, J., Turco, S.J., Beverley, S.M., McDowell, M.A., 2015. Differential impact of LPG-and PG-deficient *Leishmania major* mutants on the immune response of human dendritic cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004238>
- Fedorko, D.P., Nelson, N.A., Cartwright, C.P., 1995. Identification of Microsporidia in Stool Specimens by Using PCR and Restriction Endonucleases, *Journal of Clinical Microbiology*.
- Field, A.S., Paik, J.Y., Stark, D., Qiu, M.R., Morey, A., Plit, M.L., Canning, E.U., Glanville, A.R., 2012. Myositis due to the microsporidian *Anncaliia (Brachiola) algerae* in a lung transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* 14, 169–176. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2012.00724.x>
- Font, R.L., Samaha, A.N., Keener, M.J., Chevez-Barrios, P., Goosey, J.D., 2000. Corneal microsporidiosis: Report of case, including electron microscopic observations. *Ophthalmology* 107, 1769–1775. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(00\)00285-2](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(00)00285-2)
- Forestier, C.L., Gao, Q., Boons, G.J., 2014. *Leishmania* lipophosphoglycan: How to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00193>
- Forestier, C.L., MacHu, C., Loussert, C., Pescher, P., Späth, G.F., 2011. Imaging host cell-*leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and

- host cell wounding in the infection process. *Cell Host Microbe* 9, 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.011>
- Foucault, C., Drancourt, M., 2000. Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. *Microb. Pathog.* 28, 51–58. <https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0329>
- Franzen, C., 2005. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol. (Praha)*. 52, 36–40. <https://doi.org/10.14411/fp.2005.005>
- Franzen, C., 2004. Microsporidia: How can they invade other cells? *Trends Parasitol.* 20, 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.04.009>
- Franzen, C., Fischer, S., Schroeder, J., Schölmerich, J., Schneuwly, S., 2005. Morphological and molecular investigations of *Tubulinosema ratisbonensis* gen. nov., sp. nov. (microsporidia: tubulinosematidae fam. nov.), a parasite infecting a laboratory colony of *Drosophila melanogaster* (diptera: drosophilidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 141–152. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.04-3324.x>
- Franzen, C., Nasonova, E.S., Schölmerich, J., Issi, I. V., 2006. Transfer of the members of the genus *Brachiola* (Microsporidia) to the genus *Anncaliia* based on ultrastructural and molecular data. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 26–35. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00066.x>
- Free, S.J., 2013. *Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis*, 1st ed, *Advances in Genetics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>
- Frixione, E., Ruiz, L., Cerbón, J., Undeen, A.H., 1997. Germination of *Nosema algerae* (microspora) spores: Conditional inhibition by D₂O, ethanol and Hg²⁺ suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44, 109–116. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05946.x>
- Frixione, E., Ruiz, L., Santillán, M., de Vargas, L. V., Tejero, J.M., Undeen, A.H., 1992. Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motil. Cytoskeleton* 22, 38–50. <https://doi.org/10.1002/cm.970220105>
- Frixione, E., Ruiz, L., Undeen, A.H., 1994. Monovalent cations induce microsporidian spore germination in vitro. *J. Euk. Microbiol.* 41, 464–468. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1994.tb06043.x>
- Galindo, J.L., Torruella, G., Moreira, D., Timpano, H., Paskerova, G., Smirnov, A., Nasonova, E.,

- Lopez-Garcia, P., 2018. Evolutionary Genomics of *Metchnikovella incurvata* (Metchnikovellidae): An Early Branching Microsporidium. *Genome Biol. Evol.* 10, 2736–2748. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy205>
- Gargouch, N., Elleuch, F., Karkouch, I., Tabbene, O., Pichon, C., Gardarin, C., Rihouey, C., Picton, L., Abdelkafi, S., Fendri, I., Laroche, C., 2021. Potential of Exopolysaccharide from *Porphyridium marinum* to Contend with Bacterial Proliferation, Biofilm Formation, and Breast Cancer. *Mar. Drugs* 19. <https://doi.org/10.3390/md19020066>
- Garrido, E.F., Rocha, R.L., Burgos, L.C., 2017. Heparan sulfate and chondroitin sulfate: general aspects of their participation during *Plasmodium falciparum* development. *Biosalud* 16, 80–90. <https://doi.org/10.17151/biosa.2017.16.1.9>
- Ghosh, K., Cappiello, C.D., McBride, S.M., Occi, J.L., Cali, A., Takvorian, P.M., McDonald, T. V., Weiss, L.M., 2006. Functional characterization of a putative aquaporin from *Encephalitozoon cuniculi*, a microsporidia pathogenic to humans. *Int. J. Parasitol.* 36, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.08.013>
- Ghosh, K., Weiss, L.M., 2009. Molecular Diagnostic Tests for Microsporidia. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 1–13. <https://doi.org/10.1155/2009/926521>
- Ghoshal, U., Khanduja, S., Pant, P., Prasad, K., Dhole, T., Sharma, R., Ghoshal, U., 2015. Intestinal microsporidiosis in renal transplant recipients: Prevalence, predictors of occurrence and genetic characterization. *Indian J. Med. Microbiol.* 33, 357–363. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.158551>
- Gupta, S., 2005. Parasite immune escape: New views into host-parasite interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.011>
- Guzman-Murillo, M.A., Ascencio, F., 2000. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 473–478. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00751.x>
- Hacker, C., Howell, M., Bhella, D., Lucocq, J., 2014. Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: Direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC. *Cell. Microbiol.* 16, 565–579. <https://doi.org/10.1111/cmi.12240>
- Hackstadt, T., 2000. Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic* 1, 93–99. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010201.x>

- Halder, U., Banerjee, A., Bandopadhyay, R., 2017. Structural and Functional Properties, Biosynthesis, and Patenting Trends of Bacterial Succinoglycan: A Review. *Indian J. Microbiol.* 57, 278–284. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0655-3>
- Han, B., Moretto, M., Weiss, L., 2018. Encephalitozoon: Tissue Culture, Cryopreservation, and Murine Infection. *Curr. Protoc. Microbiol.* 52, 1–19. <https://doi.org/10.1002/cpmc.72>
- Han, B., Pan, G., Weiss, L.M., 2021. Microsporidiosis in Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 34. <https://doi.org/10.1128/cmr.00010-20>
- Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P.M., Cali, A., Maier, K., Long, M., Levy, M., Tanowitz, H.B., Pan, G., Delbac, F., Zhou, Z., Weiss, L.M., 2017. The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLoS Pathog.* 13, 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006341>
- Han, B., Takvorian, P.M., Weiss, L.M., 2020. Invasion of Host Cells by Microsporidia. *Front. Microbiol.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00172>
- Han, B., Weiss, L.M., 2018. Therapeutic targets for the treatment of microsporidiosis in humans. *Expert Opin. Ther. Targets* 22, 903–915. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1538360>
- Han, Bi., Ma, Y., Tu, V., Tomita, T., Mayoral, J., Williams, T., Horta, A., Huang, H., Weiss, L.M., 2019. Microsporidia Interact with Host Cell Mitochondria via voltage-dependent anion channels using sporoplasm surface protein 1. *MBio* 10, 1–24.
- Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., Kojima, I., 1996. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* 59, 83–87. <https://doi.org/10.1021/np960017o>
- Hayman, J.R., Hayes, S.F., Amon, J., Nash, T.E., 2001. Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect. Immun.* 69, 7057–7066. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.7057-7066.2001>
- Hayman, J.R., Southern, T.R., Nash, T.E., 2005. Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infect. Immun.* 73, 841–848. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.841-848.2005>
- He, F., Yang, Y., Yang, G., Yu, L., 2010. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control* 21, 1257–1262. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.013>
- Herrero, A., Padrós, F., Pflaum, S., Matthews, C., del-Pozo, J., Rodger, H.D., Dagleish, M.P.,

- Thompson, K.D., 2020. Comparison of histologic methods for the detection of *Desmozoon lepeophtherii* spores in the gills of Atlantic salmon. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 32, 142–146. <https://doi.org/10.1177/1040638719887707>
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.001>
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010. *Nosema ceranae* in Europe: An emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392. <https://doi.org/10.1051/apido/2010019>
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R., 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 17–29. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12024>
- Hodder, A.N., Czabotar, P.E., Ubaldi, A.D., Clarke, O.B., Lin, C.S., Healer, J., Smith, B.J., Cowman, A.F., 2012. Insights into duffy binding-like domains through the crystal structure and function of the merozoite surface protein MSPDBL2 from *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 287, 32922–32939. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.350504>
- Hoepelman, A.I.M., Tuomanen, E.I., 1992. Consequences of microbial attachment: Directing host cell functions with adhesins. *Infect. Immun.* 60, 1729–1733. <https://doi.org/10.1128/iai.60.5.1729-1733.1992>
- Holt, H.L., Aronstein, K.A., Grozinger, C.M., 2013. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-799>
- Hoogenboom, B.W., Suda, K., Engel, A., Fotiadis, D., 2007. The Supramolecular Assemblies of Voltage-dependent Anion Channels in the Native Membrane. *J. Mol. Biol.* 370, 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.073>
- Höök, M., 1984. Cell-surface glycosaminoglycans. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 847–869. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.004215>
- Horta, M.F., Andrade, L.O., Martins-Duarte, É.S., Castro-Gomes, T., 2020. Cell invasion by intracellular parasites - the many roads to infection. *J. Cell Sci.* 133. <https://doi.org/10.1242/jcs.232488>
- Hu, X., Addlagatta, A., Lu, J., Matthews, B.W., Liu, J.O., 2006. Elucidation of the function of type 1 human methionine aminopeptides during cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

- S. A. 103, 18148–18153. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608389103>
- Huang, Q., 2018. Evolution of Dicer and Argonaute orthologs in microsporidian parasites. *Infect. Genet. Evol.* 65, 329–332. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.08.011>
- Huang, Q., Wu, Z.H., Li, W.F., Guo, R., Xu, J.S., Dang, X.Q., Ma, Z.G., Chen, Y.P., Evans, J.D., 2021. Genome and Evolutionary Analysis of *Nosema ceranae*: A Microsporidian Parasite of Honey Bees. *Front. Microbiol.* 12, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645353>
- Huang, W.F., Solter, L.F., Yau, P.M., Imai, B.S., 2013. *Nosema ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. *PLoS Pathog.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003185>
- Huheihe, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad, S., 2002. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *J. Biochem. Biophys. Methods* 50, 189–200. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00186-5)
- Huynh, M.H., Rabenau, K.E., Harper, J.M., Beatty, W.L., Sibley, L.D., Carruthers, V.B., 2003. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO J.* 22, 2082–2090. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg217>
- Ishiwa, A., Kobayashi, K., Takemae, H., Sugi, T., Gong, H., Recuenco, F.C., Murakoshi, F., Inomata, A., Horimoto, T., Kato, K., 2013. Effects of dextran sulfates on the acute infection and growth stages of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 112, 4169–4176. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3608-8>
- Isnard, A., Shio, M.T., Olivier, M., 2012. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 72. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00072>
- Jacquet, A., Coulon, L., De Nève, J., Daminet, V., Haumont, M., Garcia, L., Bollen, A., Jurado, M., Biemans, R., 2001. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116, 35–44. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00297-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00297-3)
- James, E.R., Green, D.R., 2004. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction. *Trends Parasitol.* 20, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.04.004>
- Jaroenlak, P., Boakye, D.W., Vanichviriyakit, R., Williams, B.A.P., Sritunyalucksana, K., Itsathitphaisarn, O., 2018. Identification, characterization and heparin binding capacity of a spore-wall, virulence protein from the shrimp microsporidian, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *Parasites and Vectors* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2758-z>

- Jaronski, S.T., 1979. Role of the larval mosquito midgut in determining host susceptibility to *Nosema algerae* (Microsporidia). Cornell University.
- Jaskiewicz, E., Jodłowska, M., Kaczmarek, R., Zerka, A., 2019. Erythrocyte glycoporphins as receptors for *Plasmodium* merozoites. *Parasites and Vectors* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3575-8>
- Kane, M.M., Mosser, D.M., 2000. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 26–31. <https://doi.org/10.1097/00062752-200001000-00006>
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillott, E., Méténler, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoul, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414, 450–453. <https://doi.org/10.1038/35106579>
- Katiyar, S.K., Gordon, V.R., McLaughlin, G.L., Edlind, T.D., 1994. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with β - tubulin sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2086–2090. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.2086>
- Kato, K., Murata, Y., Horiuchi, N., Inomata, A., Terkawi, M.A., Ishiwa, A., Ogawa, Y., Fukumoto, S., Matsuhisa, F., Koyama, K., 2016. Dextran sulfate inhibits acute *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Parasites and Vectors* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1421-9>
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Heise, W., Löscher, T., Rinder, H., 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Heal.* 1, 373–378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1996.d01-51.x>
- Keeling, P.J., Fast, N.M., 2002. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 93–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>
- Keeling, P.J., Slamovits, C.H., 2004. Simplicity and Complexity of Microsporidian Genomes. *Society* 3, 1363–1369. <https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1363>
- Kent, M.L., Shaw, R.W., Sanders, J.L., 2014. Chapter 20: Microsporidia in Fish, *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch20>
- Keohane, E.M., Orr, G.A., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Wittner, M., Weiss, L.M., 1996. Purification and characterization of human microsporidian polar tube proteins. *J.*

- Eukaryot. Microbiol. 43, 100S. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb05023.x>
- Keohane, E.M., Orr, G.A., Zhang, H.S., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Wittner, M., Weiss, L.M., 1998. The molecular characterization of the major polar tube protein gene from *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite of humans. *Mol Biochem Parasitol* 94, 227–236.
- Khan, N., Gowthaman, U., Pahari, S., Agrewala, J.N., 2012. Manipulation of Costimulatory Molecules by Intracellular Pathogens: Veni, Vidi, Vici!! *PLOS Pathog.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002676>
- Kim, I.H., Kim, D.J., Gwak, W.S., Woo, S.D., 2020. Increased survival of the honey bee *Apis mellifera* infected with the microsporidian *Nosema ceranae* by effective gene silencing. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 105, 1–12. <https://doi.org/10.1002/arch.21734>
- Kobayashi, K., Takano, R., Takemae, H., Sugi, T., Ishiwa, A., Gong, H., Recuenco, F.C., Iwanaga, T., Horimoto, T., Akashi, H., Kato, K., 2013. Analyses of interactions between heparin and the apical surface proteins of *plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* 3. <https://doi.org/10.1038/srep03178>
- Koch, M., Wright, K.E., Otto, O., Herbig, M., Salinas, N.D., Tolia, N.H., Satchwell, T.J., Guck, J., Brooks, N.J., Baum, J., 2017. *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigen 175 triggers a biophysical change in the red blood cell that facilitates invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 4225–4230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620843114>
- Lacey, E., 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today* 6, 112–115. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90227-U](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90227-U)
- Lee, J.B., Hayashi, K., Hirata, M., Kuroda, E., Suzuki, E., Kubo, Y., Hayashi, T., 2006. Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep-sea water in Toyama Bay. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 2135–2139. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2135>
- Lee, J.B., Srisomporn, P., Hayashi, K., Tanaka, T., Sankawa, U., Hayashi, T., 2001. Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina Platensis*, on antiviral activity. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 108–110. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.108>
- Leitch, G.J., Ceballos, C., 2008. Effects of host temperature, and gastric and duodenal environments on microsporidia spore germination and infectivity of intestinal epithelial cells. *Parasitol. Res. Res* 104, 35–42. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1156-4>
- Leitch, G.J., He, Q., Wallace, S., Visvesvara, G.S., 1993. Inhibition of the Spore Polar Filament

- Extrusion of the Microsporidium, *Encephalitozoon hellem*, Isolated from an AIDS Patient. *J. Euk. Microbiol.* 40, 711–717. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04463.x>
- Leitch, G.J., Scanlon, M., Visvesvara, G.S., Wallace, S., 1995. Calcium and Hydrogen Ion Concentrations in the Parasitophorous Vacuoles of Epithelial Cells Infected with the Microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 445–451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1995.tb05889.x>
- Lekutis, C., Ferguson, D.J.P., Grigg, M.E., Camps, M., Boothroyd, J.C., 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: Variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* 31, 1285–1292. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00261-2)
- Leonard, C.A., Hayman, J.R., 2017. Role of host cell integrins in the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis* adherence and infection in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx169>
- Li, J.S.Y., Winslow, G.M., 2003. Survival, replication, and antibody susceptibility of *Ehrlichia chaffeensis* outside of host cells. *Infect. Immun.* 71, 4229–4237. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4229-4237.2003>
- Li, S., Ji, L., Shi, Q., Wu, H., Fan, J., 2019. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. *Bioresour. Technol.* 292, 122048. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122048>
- Li, Y., Wu, Z., Pan, G., He, W., Zhang, R., Hu, J., Zhou, Z., 2009. Identification of a novel spore wall protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombycis*. *Int. J. Parasitol.* 39, 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.011>
- Li, Z., Pan, G., Li, T., Huang, W., Chen, J., Geng, L., Yang, D., Wang, L., Zhou, Z., 2012. SWP5, a spore wall protein, interacts with polar tube proteins in the parasitic microsporidian *nosema bombycis*. *Eukaryot. Cell* 11, 229–237. <https://doi.org/10.1128/EC.05127-11>
- Li, Z., Wang, Y., Wang, L., Zhou, Z., 2018. Molecular and biochemical responses in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with *Nosema bombycis*. *Parasites and Vectors* 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2755-2>
- Lin, M.Y., Yuan, Z.L., Hu, D.D., Hu, G.H., Zhang, R.L., Zhong, H., Yan, L., Jiang, Y.Y., Su, J., Wang, Y., 2019. Effect of loureirin A against *Candida albicans* biofilms. *Chin. J. Nat. Med.* 17, 616–623. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(19\)30064-0](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(19)30064-0)
- Liu, D., Uzonna, J.E., 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 83.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>

- Liu, H., Li, M., Cai, S., He, X., Shao, Y., Lu, X., 2016. Ricin-B-lectin enhances microsporidia *Nosema bombycis* infection in BmN cells from silkworm *Bombyx mori*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 48, 1050–1057. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw093>
- Lopez-Perez, M., Van Der Puije, W., Castberg, F.C., Ofori, M.F., Hviid, L., 2020. Binding of human serum proteins to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and its association with malaria clinical presentation. *Malar. J.* 19, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03438-8>
- Lourenço, E. V., Pereira, S.R., Faça, V.M., Coelho-Castelo, A.A.M., Mineo, J.R., Roque-Barreira, M.C., Greene, L.J., Panunto-Castelo, A., 2001. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology* 11, 541–547. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.7.541>
- Ma, Z., Li, C., Pan, G., Li, Z., Han, B., Xu, J., Lan, X., Chen, J., Yang, D., Chen, Q., Sang, Q., Ji, X., Li, T., Long, M., Zhou, Z., 2013. 1DUMMY Genome-wide transcriptional response of silkworm (*Bombyx mori*) to infection by the microsporidian *Nosema bombycis*. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084137>
- Macêdo, A.G., Cunha, J.P., Cardoso, T.H., Silva, M. V., Santiago, F.M., Silva, J.S., Pirovani, C.P., Silva, D.A., Mineo, J.R., Mineo, T.W., 2013. SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. *Parasites and Vectors* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-163>
- Maciej-Hulme, M.L., Skidmore, M.A., Price, H.P., 2018. The role of heparan sulfate in host macrophage infection by *Leishmania* species. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 789–796. <https://doi.org/10.1042/BST20170398>
- Marchant, J., Cowper, B., Liu, Y., Lai, L., Pinzan, C., Marq, J.B., Friedrich, N., Sawmynaden, K., Liew, L., Chai, W., Childs, R.A., Saouros, S., Simpson, P., Barreira, M.C.R., Feizi, T., Soldati-Favre, D., Matthews, S., 2012. Galactose recognition by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 287, 16720–16733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325928>
- Marth, J.D., 2008. A unified vision of the building blocks of life. *Nat. Cell Biol.* 10, 1015–1016. <https://doi.org/10.1038/ncb0908-1015>
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M.A., Soroker, V., Higes, M., 2018. *Nosema ceranae*

- in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environ. Microbiol.* 20, 1302–1329.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14103>
- Mayack, C., Naug, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 185–188.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.12.001>
- Melo, T.G., Coutinho, E.A., Pereira, M.C.S., 2020. Heparan sulfate proteoglycan triggers focal adhesion kinase signaling during *trypanosoma cruzi* invasion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 115, 1–23. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200143>
- Menzio, F.D., Reddy, V.M., Cayet, D., Raze, D., Debie, A.S., Dehouck, M.P., Cecchelli, R., Locht, C., 2006. *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. *Microbes Infect.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.03.023>
- Merida-de-Barros, D.A., Chaves, S.P., Belmiro, C.L.R., Wanderley, J.L.M., 2018. Leishmaniasis and glycosaminoglycans: a future therapeutic strategy? *Parasit. Vectors* 11, 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s13071-018-2953-y>
- Messina, A., Reina, S., Guarino, F., De Pinto, V., 2012. VDAC isoforms in mammals. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818, 1466–1476.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.005>
- Michael, T.M., John, M.M., Jack, P., 2002. Brock microbiology of microorganism. New Jersey. ISBN 10, 130662712.
- Mikhailov, K. V, Simdyanov, T.G., Aleoshin, V. V, 2016. Genomic Survey of a Hyperparasitic Microsporidian *Amphiblyps* sp. (Metchnikovellidae). *Genome Biol. Evol.* 9, 454–467.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evw235>
- Mo, L., Drancourt, M., 2004. Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 1060–1063.
<https://doi.org/10.1128/CDLI.11.6.1060-1063.2004>
- Nakjang, S., Williams, T.A., Heinz, E., Watson, A.K., Foster, P.G., Sendra, K.M., Heaps, S.E., Hirt, R.P., Martin Embley, T., 2013. Reduction and Expansion in Microsporidian Genome Evolution: New Insights from Comparative Genomics. *Genome Biol. Evol.* 5, 2285–2303.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evt184>
- Nans, A., Ford, C., Hayward, R.D., 2015. Host-pathogen reorganisation during host cell entry by *Chlamydia trachomatis*. *Microbes Infect.* 17, 727–731.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.08.004>

- Nelson, M.M., Jones, A.R., Carmen, J.C., Sinai, A.P., Burchmore, R., Wastling, J.M., 2008. Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 76, 828–844. <https://doi.org/10.1128/IAI.01115-07>
- Ngo, D.H., Kim, S.K., 2013. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.036>
- Ning, M., Wei, P., Shen, H., Wan, X., Jin, M., Li, X., Shi, H., Qiao, Y., Jiang, G., Gu, W., Wang, W., Wang, L., Meng, Q., 2019. Proteomic and metabolomic responses in hepatopancreas of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* infected by microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Fish Shellfish Immunol.* 87, 534–545. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.051>
- Nogueira, P.M., Assis, R.R., Torrecilhas, A.C., Saraiva, E.M., Pessoa, N.L., Campos, M.A., Marialva, E.F., Ríos-Velasquez, C.M., Pessoa, F.A., Secundino, N.F., Rugani, J.N., Nieves, E., Turco, S.J., Melo, M.N., Soares, R.P., 2016. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004848>
- Norkin, L.C., 1995. Virus receptors: Implications for pathogenesis and the design of antiviral agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 293–315. <https://doi.org/10.1128/cmr.8.2.293>
- Nowotarski, S.L., Woster, P.M., Jr, R.A.C., 2013. Polyamines and cancer: Implications for chemoprevention and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med* 1–28. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.3.Polyamines>
- Ofek, I., Beachey, E.H., Sharon, N., 1978. Surface sugars of animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence. *Trends Biochem. Sci.* 3, 159–160. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(78\)90294-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(78)90294-3)
- Olaya-Abril, A., Jiménez-Munguía, I., Gómez-Gascón, L., Rodríguez-Ortega, M.J., 2014. Surfomics: Shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins. *J. Proteomics* 97, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.035>
- Oliveira, F.O.R. de, Alves, C.R., Calvet, C.M., Toma, L., Bouças, R.I., Nader, H.B., Castro Côrtes, L.M. de, Krieger, M.A., Meirelles, M. de N.S.L., Souza Pereira, M.C. de, 2008. Trypanosoma cruzi heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. *Microb. Pathog.* 44, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.10.003>

- Olsnes, S., 2004. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* 44, 361–370.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.003>
- Orenstein, J.M., Dieterich, D.T., Kotler, D.P., 1992. Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. *AIDS* 6, 1143–1150.
<https://doi.org/10.1097/00002030-199210000-00013>
- Palenzuela, O., Redondo, M.J., Cali, A., Takvorian, P.M., Alonso-Naveiro, M., Alvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A., 2014. A new intranuclear microsporidium, *Enterospora nucleophila* n. sp., causing an emaciative syndrome in a piscine host (*Sparus aurata*), prompts the redescription of the family Enterocytozoonidae. *Int. J. Parasitol.* 44, 189–203.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.10.005>
- Pan, G., Bao, J., Ma, Z., Song, Y., Han, B., Ran, M., Li, C., Zhou, Z., 2018. Invertebrate host responses to microsporidia infections. *Dev. Comp. Immunol.* 83, 104–113.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.02.004>
- Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R., 2012. Adherence of *Clostridium difficile* spores to Caco-2 cells in culture. *J. Med. Microbiol.* 61, 1208–1218. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.043687-0>
- Pasteur, L., 1870. Etudes sur la maladie des vers à soie: moyen pratique assuré de la combattre et d'en prévenir.
- Persson, K.E.M., McCallum, F.J., Reiling, L., Lister, N.A., Stubbs, J., Cowman, A.F., Marsh, K., Beeson, J.G., 2008. Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J. Clin. Invest.* 118, 342–351.
<https://doi.org/10.1172/JCI32138>
- Peterson, J.W., 1996. Bacterial pathogenesis, in: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Petri, W.A., Haque, R., Mann, B.J., 2002. The bittersweet interface of parasite and host: Lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Ann.Rev. Microbio.* 56, 39–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160959>
- Petri, W.A., Smith, R.D., Schlesinger, P.H., Murphy, C.F., Ravdin, J.I., 1987. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 80, 1238–1244. <https://doi.org/10.1172/JCI113198>
- Peuvel-Fanget, I., Polonais, V., Brosson, D., Texier, C., Kuhn, L., Peyret, P., Vivarès, C., Delbac, F., 2006. EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. *Int. J. Parasitol.* 36,

- 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.10.005>
- Peuvel, I., Peyret, P., Méténier, G., Vivarès, C.P., Delbac, F., 2002. The microsporidian polar tube: Evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00073-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00073-7)
- Peyretailade, E., El Alaoui, H., Diogon, M., Polonais, V., Parisot, N., Biron, D.G., Peyret, P., Delbac, F., 2011. Extreme reduction and compaction of microsporidian genomes. *Res. Microbiol.* 162, 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.03.004>
- Pierre, G., Sopena, V., Juin, C., Mastouri, A., Graber, M., Maugard, T., 2011. Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16, 937–945. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0224-2>
- Pino, P., Soldati-Favre, D., 2011. Invasion et réplication chez les apicomplexes tous les chemins mènent à ROM. *Medecine/Sciences* 27, 576–578. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011276005>
- Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A., Cossart, P., 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian: An updated view. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010009>
- Pleshinger, J., Weidner, E., 1985. The microsporidian spore invasion tube. IV. discharge activation begins with pH-triggered Ca^{2+} influx. *J. Cell Biol.* 100, 1834–1838. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.6.1834>
- Poole, C.L., Kimberlin, D.W., 2017. Antiviral Drugs in Newborn and Children. *Pediatr. Clin. North Am.* 64, 1403–1415. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.08.014>
- Portes, J., Barrias, E., Travassos, R., Attias, M., de Souza, W., 2020. *Toxoplasma gondii* Mechanisms of Entry Into Host Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00294>
- Prasad, S.M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E.I., Robert Measure, H., 1993. Identification of a Carbohydrate Recognition Domain in Filamentous Hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 61, 2780–2785. <https://doi.org/10.1128/iai.61.7.2780-2785.1993>
- Procop, G.W., 2007. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 45, 99–111. <https://doi.org/10.1086/519259>
- Prybylski, N., Toucheteau, C., El Alaoui, H., Bridiau, N., Maugard, T., Abdelkafi, S., Fendri, I.,

- Delattre, C., Dubessay, P., Pierre, G., Michaud, P., 2020. Bioactive polysaccharides from microalgae, Handbook of Microalgae-Based Processes and Products. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818536-0.00020-8>
- Qazi, S.N.A., Harrison, S.E., Self, T., Williams, P., Hill, P.J., 2004. Real-Time Monitoring of Intracellular *Staphylococcus aureus* Replication. *J. Bacteriol.* 186, 1065–1077. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1065-1077.2004>
- Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X., Li, Z., 2005. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *Int. J. Biol. Macromol.* 37, 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.10.008>
- Radonić, A., Thulke, S., Achenbach, J., Kurth, A., Vreemann, A., König, T., Walter, C., Possinger, K., Nitsche, A., 2010. Anionic Polysaccharides From Phototrophic Microorganisms Exhibit Antiviral Activities to Vaccinia Virus. *J. Antivirals Antiretrovir.* 2, 051–055. <https://doi.org/10.4172/jaa.1000023>
- Raposo, M.F.D.J., De Morais, A.M.M.B., De Morais, R.M.S.C., 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci.* 101, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.02.013>
- Raze, D., Verwaerde, C., Deloison, G., Werkmeister, E., Coupin, B., Loyens, M., Brodin, P., Rouanet, C., Locht, C., 2018. Heparin-binding hemagglutinin adhesin (HBHA) is involved in intracytosolic lipid inclusions formation in mycobacteria. *Front. Microbiol.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02258>
- Reichert, M., Bergmann, S.M., Hwang, J., Buchholz, R., Lindenberger, C., 2017. Antiviral activity of exopolysaccharides from *Arthrospira platensis* against koi herpesvirus. *J. Fish Dis.* 40, 1441–1450. <https://doi.org/10.1111/jfd.12618>
- Rittig, M.G., Bogdan, C., 2000. Leishmania-host-cell interaction: Complexities and alternative views. *Parasitol. Today* 16, 292–297. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01692-6](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01692-6)
- Rogers, G.N., Paulson, J.C., 1983. Receptor Determinants of Human and Animal Influenza Virus Isolates : Differences in Receptor Specificity of the H3 Hemagglutinin Based on Species of Origin. *Virology* 127, 361–373. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90150-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90150-2)
- Romero, R.V., Osicka, R., Sebo, P., 2014. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: A key adhesin with immunomodulatory properties? *Futur. Microbiol.* 9, 1339–1360. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.77>

- Rönnebäumer, K., Gross, U., Bohne, W., 2008. The nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. *Eukaryot. Cell* 7, 1001–1008. <https://doi.org/10.1128/EC.00004-08>
- Rostand, K.S., Esko, J.D., 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect. Immun.* 65, 1–8. <https://doi.org/10.1128/iai.65.1.1-8.1997>
- Rostovtseva, T.K., Tan, W., Colombini, M., 2005. On the role of VDAC in apoptosis: Fact and fiction. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 129–142. <https://doi.org/10.1007/s10863-005-6566-8>
- Roussel, M., Villay, A., Delbac, F., Michaud, P., Laroche, C., Roriz, D., El Alaoui, H., Diogon, M., 2015. Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydr. Polym.* 133, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.022>
- Ruiz-Herrera, J., San-Blas, G., 2003. Chitin synthesis as a target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets - Infect. Disord.* 3, 77–91. <https://doi.org/10.2174/1568005033342064>
- Sahni, S.K., Narra, H.P., Sahni, A., Walker, D.H., 2013. Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. *Future Microbiol.* 8, 1265–1288. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.102>
- Saleh, M., Kumar, G., Abdel-Baki, A.A., Dkhil, M.A., El-Matbouli, M., Al-Quraishy, S., 2016. In Vitro Gene Silencing of the Fish Microsporidian *Heterosporis saurida* by RNA Interference. *Nucleic Acid Ther.* 26, 250–256. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0613>
- Sandvig, K., 2000. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J.* 19, 5943–5950. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.22.5943>
- Sardinha-Silva, A., Mendonça-Natividade, F., Pinzan, C., Lopes, C., Costa, D., Jacot, D., Fernandes, F., Zorzetto-Fernandes, A., Gay, N., Sher, A., Jankovic, D., Soldati-Favre, D., Grigg, M., Roque-Barreira, M.C., 2019. The lectin-specific activity of *Toxoplasma gondii* microneme proteins 1 and 4 binds Toll-like receptor 2 and 4 N-glycans to regulate innate immune priming. *PLoS Pathog.* 15, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007871>
- Scanlon, M., Leitch, G.J., Visvesvara, G.S., Shaw, A.P., 2004. Relationship between the Host Cell Mitochondria and the Parasitophorous Vacuole in Cells Infected with *Encephalitozoon Microsporidia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51, 81–87. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00166.x>
- Schottelius, J., Schmetz, C., Kock, N.P., Schüler, T., Sobottka, I., Fleischer, B., 2000. Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus

- Encephalitozoon. *Microbes Infect.* 2, 1401–1406. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01293-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01293-4)
- Scorzoni, L., de Paula e Silva, A.C.A., Marcos, C.M., Assato, P.A., de Melo, W.C.M.A., de Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Mendes-Giannini, M.J.S., Fusco-Almeida, A.M., 2017. Antifungal therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis. *Front. Microbiol.* 8, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00036>
- Shadduck, J.A., 1969. *Nosema cuniculi*: In vitro isolation. *Science (80-)*. 166, 516–517.
- Shadduck, J.A., Polley, M.B., 1978. Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. *J. protozool* 25, 491–496. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1978.tb04174.x>
- Shannon, E., Abu-Ghannam, N., 2016. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Mar. Drugs* 14. <https://doi.org/10.3390/md14040081>
- Sharma, S., Das, S., Joseph, J., Vemuganti, G.K., Murthy, S., 2011. Microsporidial keratitis: Need for increased awareness. *Surv. Ophthalmol.* 56, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2010.03.006>
- Shertz, C.A., Bastidas, R.J., Li, W., Heitman, J., Cardenas, M.E., 2010. Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. *BMC Genomics* 11, 1471–2164. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-510>
- Sibley, L.D., 2011. Invasion and Intracellular Survival by Protozoan Parasites. *Immunol. Rev.* 240, 72–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x>
- Sibley, L.D., 2004. Intracellular Parasite Invasion Strategies. *Science (80-)*. 304, 248–253. <https://doi.org/10.1126/science.1094717>
- Slamovits, C.H., Williams, B.A.P., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00547.x>
- Soanen, N., Da Silva, E., Gardarin, C., Michaud, P., Laroche, C., 2016. Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresour. Technol.* 213, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.075>
- Sobottka, I., Bartscht, K., Schäfer, P., Weitzel, T., Schottelius, J., Kock, N., Laufs, R., 2002. In vitro activity of polyoxin D and nikkomycin Z against *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol. Res.*

- 88, 451–453. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0592-9>
- Sokolova, Y.Y., Bowers, L.C., Alvarez, X., Didier, E.S., 2019. Encephalitozoon cuniculi and Vittiforma corneae (Phylum Microsporidia) inhibit staurosporine-induced apoptosis in human THP-1 macrophages in vitro. *Parasitology* 146, 569–579. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001968>
- Soldati, D., Dubremetz, J.F., Lebrun, M., 2001. Microneme proteins: Structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1293–1302. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00257-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00257-0)
- Southern, T.R., Jolly, C.E., Lester, M.E., Hayman, J.R., 2007. EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro. *Euk. Cell* 6, 1354–1362. <https://doi.org/10.1128/EC.00113-07>
- Southern, T.R., Jolly, C.E., Lester, M.E., Hayman, J.R., 2006. Identification of a microsporidia protein potentially involved in spore adherence to host cells. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 68–69. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00176.x>
- Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A.P., Bjornson, S., Kent, M.L., Freeman, M.A., Brown, M.J.F., Troemel, E.R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K.F., Solter, L., 2016. Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitol.* 32, 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.004>
- Sun, L., Wang, C., Shi, Q., Ma, C., 2009. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 45, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.03.013>
- Takvorian, P.M., Cali, A., 1986. The Ultrastructure of Spores (Protozoa: Microsporida) from *Lophius americanus*, the Angler Fish. *J. Protozool.* 33, 570–575. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1986.tb05664.x>
- Talyshinsky, M.M., Souprun, Y.Y., Huleihel, M.M., 2002. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell Int.* 2, 14–17. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-2-8>
- Tamim El Jarkass, H., Reinke, A.W., 2020. The ins and outs of host-microsporidia interactions during invasion, proliferation and exit. *Cell. Microbiol.* 22, 1–12. <https://doi.org/10.1111/cmi.13247>
- Tang, S., Wang, T., Huang, C., Lai, C., Fan, Y., Yong, Q., 2019. Sulfated modification of

- arabinogalactans from *Larix principis-rupprechtii* and their antitumor activities. *Carbohydr. Polym.* 215, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.069>
- Taupin, V., Garenaux, E., Mazet, M., Maes, E., Denise, H., Prensier, G., Vivarès, C.P., Guérardel, Y., Méténier, G., 2007. Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing α -1,2 linkages. *Glycobiology* 17, 56–67. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl050>
- Taupin, V., Méténier, G., Vivarès, C.P., Prensier, G., 2006. An improved procedure for Percoll gradient separation of sporogonial stages in *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitol. Res.* 99, 708–714. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0231-y>
- Terry, R.S., Smith, J.E., Bouchon, D., Rigaud, T., Duncanson, P., Sharpe, R.G., Dunn, A.M., 1999. Ultrastructural Characterisation and Molecular Taxonomic Identification of *Nosema granulosis* n. sp., a transovarially transmitted feminising (TTF) microsporidium. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb06066.x>
- Texier, C., Vidau, C., Viguès, B., El Alaoui, H., Delbac, F., 2010. Microsporidia: A model for minimal parasite-host interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.005>
- Tham, W.H., Healer, J., Cowman, A.F., 2012. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 28, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.002>
- Thellier, M., Breton, J., 2008. *Enterocytozoon bienersi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15, 349–358. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153349>
- Thélohan, P., 1894. Sur la présence d’une capsule à filament dans les spores des microsporidies. *C. R. Acad. Sci.* 118, 1425–1427.
- Thompson, A.J., Cao, L., Ma, Y., Wang, X., Diedrich, J.K., Kikuchi, C., Willis, S., Worth, C., McBride, R., Yates, J.R., Paulson, J.C., 2020. Human Influenza Virus Hemagglutinins Contain Conserved Oligomannose N-Linked Glycans Allowing Potent Neutralization by Lectins. *Cell Host Microbe* 27, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.009>
- Thompson, B.M., Binkley, J.M., Stewart, G.C., 2011. Current physical and SDS extraction methods do not efficiently remove exosporium proteins from *Bacillus anthracis* spores. *J. Microbiol. Methods* 85, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.009>
- Tunçbilek, M., Kiper, T., Altanlar, N., 2009. Synthesis and in vitro antimicrobial activity of some

- novel substituted benzimidazole derivatives having potent activity against MRSA. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 1024–1033. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.06.026>
- Tuomanen, E., Towbin, H., Rosenfelder, G., Braun, D., Larson, G., Gunnar, S., Hansson, C., Hilli, R., 1988. Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella Pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Exp. Med.* 168, 267–277. <https://doi.org/10.184/jem.168.1.267>
- Undeen, A.H., 1983. The germination of *Vavraia culicis* spores. *J. protozool* 30, 274–277. <https://doi.org/10.1083/jcb.61.3.591>
- Undeen, A.H., Vander Meer, R.K., 1994. Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista: Microspora) spores: A quantitative study. *J. Eukaryot. Microbiol.* 4, 129–132. https://doi.org/10.1007/978-3-540-48996-2_2148
- Van Gool, T., Luderhoff, E., Nathoo, K.J., Kiire, C.F., Dankert, J., Mason, P.R., 1995. High prevalence of enterocytozoon *bieneusi* infections among hiv-positive individuals with persistent diarrhoea in Harare, Zimbabwe. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 478–480. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90073-X)
- Van Gool, T., Snijders, F., Reiss, P., Eeftinck Schattenkerk, J.K.M., Van Den Bergh Weerman, M.A., Bartelsman, J.F.W.M., Bruins, J.J.M., Canning, E.U., Dankert, J., 1993. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J. Clin. Pathol.* 46, 694–699. <https://doi.org/10.1136/jcp.46.8.694>
- Varki, A., 2017. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 27, 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J., 2009. Part IV, Glucan-binding Proteins, in: Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vávra, J., Dahbiova, R., Hollister, W., Canning, E., 1993. Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidiosis. *Folia Parasitol. (Praha)*. 40, 267–272.
- Vávra, J., Kamler, M., Modrý, D., Koudela, B., 2011. Opportunistic nature of the mammalian microsporidia: Experimental transmission of *Trachipleistophora extenrec* (Fungi: Microsporidia) between mammalian and insect hosts. *Parasitol. Res.* 108, 1565–1573. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2213-3>

- Vávra, J., Larsson, J.I.R., 2014. Chapter 1: Structure of Microsporidia, in: Weiss, L.M., Becnel, J.J. (Eds.), *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–70. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch1>
- Vávra, J., Lukeš, J., 2013. Microsporidia and ‘The Art of Living Together,’ in: Rollinson, D. (Ed.), *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd, pp. 253–319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00004-6>
- Vavra, J., Undeen, A.H., 1970. “*Nosema Algerae* N. Sp. (Cnidospora, Microsporida) a Pathogen in a Laboratory Colony of *Anopheles Stephensi* Liston (Diptera, Culicidae).” *J. protozool* 17, 240–249.
- Visvesvara, G.S., 2002. In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 401–413. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.401-413.2002>
- Visvesvara, G.S., Leitch, G.J., Da Silva, A.J., Croppo, G.P., Moura, H., Wallace, S., Slemenda, S.B., Schwartz, D.A., Moss, D., Bryan, R.T., Pieniazek, N.J., 1994. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2760–2768. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2760-2768.1994>
- Vossbrinck, C.R., Maddox, J. V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B.A., Woese, C.R., 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326, 411–414. <https://doi.org/10.1038/326411a0>
- Vossbrinck, C.R., Woese, C.R., 1986. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* 320, 287–288. <https://doi.org/10.1038/320287a0>
- Voynow, J.A., Rubin, B.K., 2009. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 135, 505–512. <https://doi.org/10.1378/chest.08-0412>
- Wadi, L., Reinke, A.W., 2020. Evolution of microsporidia: An extremely successful group of eukaryotic intracellular parasites. *PLoS Pathog.* 16, e1008276. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008276>
- Wang, Y., Dang, X., Ma, Q., Liu, F., Pan, G., Li, T., Zhou, Z., 2015. Characterization of a novel spore wall protein NbSWP16 with proline-rich tandem repeats from *Nosema bombycis* (microsporidia). *Parasitology* 145, 534–542. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001565>
- Wang, Y., Geng, H., Dang, X., Xiang, H., Li, Ti., Pan, G., Zhou, Z., 2017. Comparative analysis of the proteins with tandem repeats from 8 microsporidia and characterization of a novel

- endospore wall protein colocalizing with polar tube from *Nosema bombycis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 64, 707–715. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Watson, A.K., Williams, T.A., Williams, B.A.P., Moore, K.A., Hirt, R.P., Embley, T.M., 2015. Transcriptomic profiling of host-parasite interactions in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *BMC Genomics* 16, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1989-z>
- Weber, R., Bryan, Ralph, T., Schwartz, David, A., Owen, Robert, L., 1994. Human microsporidial infections. *Online J. Heal. Allied Sci.* 7, 426–461. <https://doi.org/10.1128/cmr.7.4.426-461.1994>
- Weber, R., Kuster, H., Visvesvara, G.S., Bryan, R.T., Schwartz, D.A., Lüthy, R., 1993. Disseminated Microsporidiosis Due to *Encephalitozoon hellem*: Pulmonary Colonization, Microhematuria, and Mild Conjunctivitis in a Patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 17, 415–419. <https://doi.org/10.1093/clinids/17.3.415>
- Weidner, E., 1972. Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Zeitschrift für Parasitenkd.* 40, 227–242. <https://doi.org/10.1007/BF00329623>
- Weidner, E., Byrd, W., Scarborough, A., Pleshinger, J., Sibley, D., 1984. Microsporidian Spore Discharge and the Transfer of Polaroplast Organelle Membrane into Plasma Membrane. *J. Protozool.* 31, 195–198. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb02948.x>
- Weidner, E., Manale, S.B., Halonen, S.K., Lynn, J.W., 1994. Microsporidian Spore Invasion Tubes as Revealed by Fluorescent Probes. *Biol. Bull.* 187, 255–256. <https://doi.org/10.1086/BBLv187n2p255>
- Weidner, E., Sokolova, Y.Y., Overstreet, R.M., 2020. Microsporidia Can Acquire Lamin-like Intermediate Filaments and Cell Adhesion Catenin-cadherin Complexes from the Host (?). *J. Eukaryot. Microbiol.* 67, 583–592. <https://doi.org/10.1111/jeu.12811>
- Weiss, L.M., Hayman, J.R., Pan, G., Delbac, F., Dang, X., Zhou, Z., 2014. The Microsporidian Polar Tube and Spore Wall. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch10>
- Witvrouw, M., De Clercq, E., 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.* 29, 497–511. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(96\)00563-0](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00563-0)
- Wu, D., Struwe, W.B., Harvey, D.J., Ferguson, M.A.J., Robinson, C. V., 2018. N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 8763–8768. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807439115>

- Wu, Z., Li, Y., Pan, G., Tan, X., Hu, J., Zhou, Z., Xiang, Z., 2008. Proteomic analysis of spore wall proteins and identification of two spore wall proteins from *Nosema bombycis* (Microsporidia). *Proteomics* 8, 2447–2461. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700584>
- Wu, Z., Li, Y., Pan, G., Zhou, Z., Xiang, Z., 2009. SWP25, a novel protein associated with the *Nosema bombycis* endospore. *J. Euk. Microbiol.* 56, 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00375.x>
- Xu, Y., Takvorian, P., Cali, A., Wang, F., Zhang, H., Orr, G., Weiss, L.M., 2006. Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect. Immun.* 74, 239–247. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.239-247.2006>
- Xu, Y., Takvorian, P., Cali, A., Weiss, L.M., 2003. Lectin Binding of the Major Polar Tube Protein (PTP1) and its Role in Invasion. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, 600–601. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00644.x>
- Xu, Y., Takvorian, P.M., Cali, A., Orr, G., Weiss, L.M., 2004. Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infect. Immun.* 72, 6341–6350. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6341-6350.2004>
- Yang, B., Ma, T., Dong, J.Y., Verkman, A.S., 2000. Partial correction of the urinary concentrating defect in aquaporin-1 null mice by adenovirus-mediated gene delivery. *Hum. Gene Ther.* 11, 567–575. <https://doi.org/10.1089/10430340050015752>
- Yang, D., Pan, G., Dang, X., Shi, Y., Li, C., Peng, P., Luo, B., Bian, M., Song, Y., Ma, C., Chen, J., Ma, Z., Geng, L., Li, Z., Tian, R., Wei, C., Zhou, Z., 2015. Interaction and assembly of two novel proteins in the spore wall of the microsporidian species *Nosema bombycis* and their roles in adherence to and infection of host cells. *Infect. Immun.* 83, 1715–1731. <https://doi.org/10.1128/IAI.03155-14>
- Yang, D., Pan, L., Chen, Z., Du, H., Luo, B., Luo, J., Pan, G., 2018. The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes. *Exp. Parasitol.* 187, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.007>
- Yang, D., Pan, L., Peng, P., Dang, X., Li, C., Li, T., Long, M., Chen, J., Wu, Y., Du, H., Luo, B., Song, Y., Tian, R., Luo, J., Zhou, Z., Pana, G., 2017. Interaction between SWP9 and polar tube proteins of the microsporidian *Nosema bombycis* and function of SWP9 as a scaffolding protein contribute to polar tube tethering to the spore wall. *Infect. Immun.* 85, 1–14. <https://doi.org/10.1128/IAI.00872-16>

- Yu, Y., Shen, M., Song, Q., Xie, J., 2018. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydr. Polym.* 183, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.009>
- Zhang, N., Kima, P.E., 2016. Leishmania infection engages non-receptor protein kinases differentially to persist in infected hosts. *Front. Immunol.* 7, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00146>
- Zhang, Q., Yu, P., Li, Z., Zhang, H., Xu, Z., Li, P., 2003. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanensis*. *J. Appl. Phycol.* 15, 305–310. <https://doi.org/10.1023/A:1025137728525>
- Zhao, W., Hao, Y., Wang, L., Zhou, Z., Li, Z., 2015. Development of a strategy for the identification of surface proteins in the pathogenic microsporidian *Nosema bombycis*. *Parasitology* 142, 865–878. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000190>
- Zhou, Y., Xu, J., Zhu, Y., Duan, Y., Zhou, M., 2016. Mechanism of action of the benzimidazole fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with polymerization of monomeric tubulin but not polymerized microtubule. *Phytopathology* 106, 807–813. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0186-R>
- Zhu, F., Shen, Z., Hou, J., Zhang, J., Geng, T., Tang, X., Xu, L., Guo, X., 2013. Identification of a protein interacting with the spore wall protein SWP26 of *Nosema bombycis* in a cultured BmN cell line of silkworm. *Infect. Genet. Evol.* 17, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.029>

Annexes

Annexe 1 :

Données brutes des résultats obtenus par spectrométrie de masse

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

											7939(SDS10mn)		7940(SDS1h)		7941(PBS1h)						
											147		158		168						
											195										
Accession	Description	ZCov	# Protéi ns	# Unique Peptides	# Peptid es	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptides B2	# PSM B2	Score C2	Coverage C2	# Peptides C2	# PSM C2
>AasWP7_K IOAEA11YB0 6AHM1	>AasWP7_KIOAE A11YB06AHM1:c(78-899)_Undeen	32,97	3	4	4	18	273	29,5	5,20	62,06	12,45	2	3	237,86	21,98	3	8	194,03	32,97	4	7
>KIOAAA9Y1 I1RM1	>KIOAAA9Y1J1R M1:2051-3294	38,74	1	6	8	32	413	45,7	9,50	257,34	33,66	6	9	290,75	34,87	6	11	375,54	36,56	7	12
>KIOAAD35 CC01FM1	>KIOAAD35CC01F M1:621-1507	53,06	1	7	16	71	294	33,9	5,86	694,80	52,38	14	28	527,91	37,41	11	21	563,16	45,92	11	22
>KIOAAD3A E03FM1	>KIOAAD3AE03F M1:267-1025	30,43	1	4	4	13	253	29,2	7,49	73,44	24,51	3	3	83,39	24,51	3	3	115,08	30,43	4	7
>KIOAAD45 CE04FM1	>KIOAAD45CE04F M1:2-472	19,87	3	3	3	7	156	18,4	4,50					77,85	19,87	3	4	68,68	10,90	2	3
>KIOAAD54 DA12FM1	>KIOAAD54DA12F M1:c(972-1715)	31,58	2	5	5	18	247	26,7	10,35	171,68	31,58	5	6	191,10	31,58	5	6	205,05	28,74	4	6
>KIOAAD5A F04AHM1	>KIOAAD5AF04A HM1:c(1130-2026)	16,78	2	4	6	13	298	35,1	5,08									113,84	16,78	6	13
>KIOAAD72 CC05FM1	>KIOAAD72CC05F M1:901-1590	34,93	1	4	4	15	229	25,7	5,99	82,96	15,72	2	3	75,59	22,71	3	5	177,57	34,93	4	7
>KIOAAD8B E06AHM1	>KIOAAD8BE06A HM1:c(1428-1871)	57,82	1	10	10	56	147	16,6	11,06	416,97	36,73	8	17	448,78	57,14	9	17	493,33	57,82	10	22
>KIOABA24 YP20FM1	>KIOABA24YP20F M1:c(2107-2556)	36,91	2	5	5	18	149	16,7	9,73	198,21	32,21	4	6	220,30	32,89	4	6	233,61	24,16	3	6
>KIOABA46 YJ18FM1	>KIOABA46YJ18F M1:c(2267-2827)	24,73	2	4	4	16	186	21,8	9,01	223,69	24,73	3	6	171,05	18,28	2	4	219,96	24,73	3	6
>KIOABA53 YJ17RM1	>KIOABA53YJ17R M1:303-989	51,75	1	13	13	46	228	27,2	7,72	318,41	45,18	10	16	334,09	50,44	10	14	300,10	46,49	11	16
>KIOABA54 YL10FM1	>KIOABA54YL10F M1:c(694-1074)	18,25	3	4	4	4	126	14,6	10,48									101,67	18,25	4	4
>KIOABA57 YA11FM1	>KIOABA57YA11F M1:c(642-2246)	21,35	1	10	10	51	534	62,2	5,62	322,42	15,92	7	14	343,32	15,36	6	17	443,42	18,91	8	20
>KIOAEA10Y F06AHM1	>KIOAEA10YF06A HM1:c(2096-2830)	19,67	1	3	3	9	244	27,2	5,74	129,61	12,30	2	3	136,63	12,30	2	3	99,25	14,34	2	3

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

											7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)								
											147	158	168								
											195										
Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
>KIOAEAI1YED1F M1	>KIOAEAI1YED1FM1 :540-962	26,43	1	3	3	7	140	15,2	10,15	105,70	19,29	2	2	124,11	19,29	2	2	130,63	26,43	3	3
>KIOAEAI1YJ13A HM1	>KIOAEAI1YJ13AHM 1:c(777-2225)	40,87	2	16	17	66	482	52,9	8,91	578,43	39,63	15	24	476,26	34,65	13	20	502,11	33,40	15	22
>KIOAEAI1YM04F M1	>KIOAEAI1YM04FM1 :612-1133	19,08	2	3	3	19	173	20,2	7,43	153,99	12,14	2	6	158,90	12,14	2	6	202,44	19,08	3	7
>KIOAEAI3YCI7A HM1	>KIOAEAI3YCI7AH M1:1768-2214	33,78	1	4	4	11	148	16,9	10,52	126,87	22,97	3	5	65,64	12,84	2	2	98,33	23,65	3	4
>KIOAEAI4YD09F M1	>KIOAEAI4YD09FM1 :242-877	16,11	2	2	2	2	211	25,2	9,64									105,07	16,11	2	2
>KIOAEAI5YN20F M1	>KIOAEAI5YN20FM1 :559-1242	26,87	2	4	4	8	227	25,6	5,06	186,95	14,98	2	3	73,18	16,30	2	2	150,32	18,06	3	3
>KIOAEAI6YCI4F M1	>KIOAEAI6YCI4FM1 :324-824	24,70	1	5	5	9	166	19,3	10,49	131,70	14,46	3	4	71,39	12,65	2	2	83,31	18,07	3	3
>KIOAEAI8YJ23F M1	>KIOAEAI8YJ23FM1: 2601-3107	38,10	2	4	4	11	168	18,1	9,73	85,11	29,76	3	3	105,60	38,10	4	4	97,15	29,76	3	4
>KIOAEA20YI04F M1	>KIOAEA20YI04FM1: 1708-3270	7,69	3	3	3	6	520	58,0	8,35	106,48	5,58	2	3					98,98	4,81	2	3
>KIOAEA22YB09F M1	>KIOAEA22YB09FM1 :c(323-1294)	20,74	4	4	4	12	323	35,9	5,29	172,36	8,98	2	3	122,72	20,74	4	4	255,03	11,46	3	5
>KIOAEA4YEI6AH M1	>KIOAEA4YEI6AHM1 :2028-2426	34,09	2	4	4	10	132	15,3	10,56					117,76	34,09	4	5	145,83	24,24	3	5
>KIOAEA7YF20FM 1	>KIOAEA7YF20FM1: c(2933-3760)	37,82	1	10	10	37	275	31,2	7,15	669,14	37,82	10	16	513,78	29,45	7	10	558,76	29,45	7	11
>KIOAEA7YK08F M1	>KIOAEA7YK08FM1: 545-1489	18,15	4	3	3	3	314	37,1	5,22									90,86	18,15	3	3
>KIOAEA8YD23A HM1	>KIOAEA8YD23AHM 1:115-822	10,64	2	2	2	4	235	26,8	8,62	50,33	10,64	2	2					52,11	10,64	2	2
>KIOAEA8YND09A HM1	>KIOAEA8YND09AHM 1:1373-1912	22,35	4	2	2	2	179	20,7	7,64					55,83	22,35	2	2				
>KIOEAF5DG12F M1	>KIOEAF5DG12FM1: c(2847-3884)	48,99	1	11	20	87	345	39,7	5,94	840,23	48,99	18	30	749,52	44,93	16	27	932,37	44,93	16	30

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

											7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)								
											147	158	168								
											195										
Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
>KIOAFABE05FM1	>KIOAFABE05FM1: c(3781-4389)	79,21	2	12	12	58	202	22,5	4,81	517,16	55,94	9	14	721,76	52,48	8	22	645,24	75,74	11	22
>KIOAFA8CG01F M1	>KIOAFA8CG01FM1: c(110-904)	20,08	1	4	4	24	264	30,3	4,96	107,61	15,15	3	7	158,63	20,08	4	9	177,08	20,08	4	8
>KIOAGA11BB01F M1	>KIOAGA11BB01FM1: c(870-1538)	11,26	2	2	2	3	222	24,8	5,30					134,94	11,26	2	3				
>KIOAGA16AB12 AHM1	>KIOAGA16AB12AH M1:2031-2963	27,74	1	18	19	100	310	35,8	10,32	401,25	22,58	14	27	586,64	27,74	19	37	583,28	26,77	17	36
>KIOAGA16DB05 AHM1	>KIOAGA16DB05AH M1:2033-2671	12,74	2	2	2	2	212	24,3	9,16									41,87	12,74	2	2
>KIOAGA18AC05F M1	>KIOAGA18AC05FM1: :1311-1974	11,76	1	3	3	4	221	26,2	9,50					59,27	11,76	3	4				
>KIOAGA4AB01A HM1	>KIOAGA4AB01AHM 1:2123-3049	46,75	1	11	11	75	308	35,4	7,30	774,92	39,61	10	27	640,52	41,23	9	23	834,83	44,48	10	25
>KIOAGA4AF09F M1	>KIOAGA4AF09FM1: c(1698-2786)	2,76	2	1	2	8	362	40,6	8,48					41,33	2,76	2	4	33,95	2,76	2	4
>KIOAGA5CF04A HM1	>KIOAGA5CF04AHM 1:c(281-895)	15,69	2	3	3	6	204	22,7	7,66					140,85	15,69	3	4	104,34	12,25	2	2
>KIOAGA8AB05A HM1	>KIOAGA8AB05AHM 1:c(274-942)	41,89	1	6	6	14	222	26,0	6,52	242,50	27,03	4	5	149,66	19,82	3	3	217,01	41,89	5	6
>KIOAHA17YD09F M1	>KIOAHA17YD09FM1: :293-793	84,34	1	12	12	73	166	19,7	5,30	930,08	80,12	11	23	971,43	84,34	12	24	1173,15	84,34	12	26
>KIOAHA18YF09F M1	>KIOAHA18YF09FM1: :c(595-1383)	15,27	2	1	4	16	262	30,4	6,54					247,87	15,27	4	8	274,49	15,27	4	8
>KIOAHA21Y121A HM1	>KIOAHA21Y121AHM 1:c(1115-1579)	11,69	3	2	2	2	154	18,1	10,02					39,50	11,69	2	2				
>KIOAHA23YF24A HM1	>KIOAHA23YF24AH M1:c(342-1157)	21,77	2	4	4	13	271	30,5	9,58	96,50	16,61	3	4	113,05	18,08	3	4	130,12	18,08	3	5
>KIOAHA23Y001F FM1	>KIOAHA23Y001FM 1:c(877-1935)	11,08	2	1	2	3	352	39,5	6,00									197,93	11,08	2	3
>KIOAHA25Y102F M1	>KIOAHA25Y102FM1: :1340-2320	38,04	2	7	7	17	326	36,3	10,02	219,40	38,04	7	7	160,21	27,61	5	6	158,26	14,42	3	4

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

											7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)									
											147	158	168									
											195											
Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2	
>KIOAHA26YB10F M1	>KIOAHA26YB10FM1 :3774-5711	31,94	2	3	14	75	645	74,9	6,87	577,61	25,58	11	21	867,58	30,39	13	28	896,61	29,61	12	26	
>KIOAHA9YD2JF M1	>KIOAHA9YD2JFM1: c(2209-2811)	13,50	2	2	2	5	200	22,9	5,16	40,94	13,50	2	2					71,14	13,50	2	3	
>KIOAIA10YB11A HM1	>KIOAIA10YB11AHM 1:c(2072-2506)	16,67	1	2	2	8	144	16,3	9,96	99,78	16,67	2	2	204,90	16,67	2	4	113,62	16,67	2	2	
>KIOAIA10YH19F M1	>KIOAIA10YH19FM1 :18-455	62,76	1	10	10	36	145	16,7	7,87	298,62	53,79	7	11	377,16	50,34	8	13	350,66	59,31	9	12	
>KIOAIA13YP22A HM1	>KIOAIA13YP22AHM 1:2361-3788	21,26	2	7	7	17	475	52,8	5,45	178,93	13,05	5	6	238,44	16,21	4	6	185,85	10,74	3	5	
>KIOAIA19YI15F M1	>KIOAIA19YI15FM1: c(1572-2093)	45,66	2	6	6	19	173	20,0	8,35	188,94	38,15	4	6	231,23	44,51	5	7	227,19	39,88	5	6	
>KIOAIA21Y008A HM1	>KIOAIA21Y008AH M1:c(1722-2648)	25,32	3	5	5	17	308	34,5	6,71	117,27	19,16	4	5	126,56	19,16	4	5	283,22	21,43	4	7	
>KIOAIA25YH11A HM1	>KIOAIA25YH11AHM 1:c(212-526)	27,88	3	2	2	4	104	11,4	4,46					64,53	27,88	2	2	59,15	27,88	2	2	
>KIOAIA4YI03AH M1	>KIOAIA4YI03AHM1 :1703-2026	54,21	1	3	3	8	107	11,9	9,60	133,32	54,21	3	3	163,05	29,91	2	3	109,72	29,91	2	2	
>KIOAIA4YI03AH M1	>KIOAIA4YI03AHM1 :c(365-1384)	42,48	1	4	10	35	339	38,4	8,32	385,35	38,94	8	12	396,28	39,23	8	12	355,12	29,79	8	11	
>KIOAIA5YE23AH M1	>KIOAIA5YE23AHM1 :c(610-1101)	20,86	3	2	2	3	163	19,1	10,58	93,18	20,86	2	3									
>KIOAKA10YJ03F M1	>KIOAKA10YJ03FM1 :217-630	40,88	1	4	4	17	137	15,9	9,76	156,96	27,74	3	5	174,38	40,88	4	6	159,58	40,88	4	6	
>KIOAKA11YE13F M1	>KIOAKA11YE13FM1 :351-2900	25,80	1	15	15	39	849	95,0	6,34	191,93	12,72	7	8	408,00	21,08	11	16	379,16	16,02	10	15	
>KIOAKA19YN23 AHM1	>KIOAKA19YN23AH M1:789-1355	14,36	1	3	3	3	188	21,6	5,22					63,25	14,36	3	3					
>KIOAKA24YD10F M1	>KIOAKA24YD10FM1 :98-355	57,65	1	2	2	2	85	9,9	5,22									76,54	57,65	2	2	
>KIOAKA26YPI4F M1	>KIOAKA26YPI4FM1 :4072-5388	15,30	2	3	3	7	438	48,0	6,83					303,18	10,05	2	4	187,50	15,30	3	3	

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)
147	158	168

Accession	Description	ΣCover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs AAs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2	
																						195
>KIOALA10YM04AHM1	>KIOALA10YM04AHM1:c(2215-2913)	12,07	3	3	3	4	232	27,3	5,85	33,74	9,91	2	2	33,25	8,19	2	2					
>KIOALA14YF22AHM1	>KIOALA14YF22AHM1:c(181-501)	45,28	1	7	7	39	106	11,5	10,80	203,55	45,28	7	11	350,75	45,28	7	16	293,92	45,28	7	12	
>KIOALA15YI13FM1	>KIOALA15YI13FM1:c(2240-3841)	20,83	1	9	9	25	533	64,2	8,98	347,73	14,82	6	9	240,69	13,13	6	7	296,03	19,51	8	9	
>KIOALA21YO03AHM1	>KIOALA21YO03AHM1:3214-3729	26,90	3	3	3	9	171	19,7	6,77	101,21	26,90	3	5	78,28	17,54	2	4					
>KIOALA2YI11FM1	>KIOALA2YI11FM1:405-887	20,63	2	2	2	5	160	18,7	9,96					62,31	20,63	2	2	74,97	20,63	2	3	
>KIOALA5YH02FM1	>KIOALA5YH02FM1:c(620-1765)	15,75	2	5	5	12	381	42,8	9,98	154,46	9,97	4	5	103,80	7,09	3	3	114,56	14,96	4	4	
>KIOAMB32YB08FM1	>KIOAMB32YB08FM1:c(1162-3681)	16,69	1	4	8	27	839	97,9	5,96	414,76	16,69	8	10	345,32	9,65	6	9	315,57	13,11	7	8	
>KIOAMB35YD07FM1	>KIOAMB35YD07FM1:c(26-1090)	60,17	2	17	17	105	354	40,7	9,38	1138,82	60,17	17	35	1254,25	60,17	17	35	1255,45	60,17	17	35	
>KIOANB10YG11FM1	>KIOANB10YG11FM1:c(2190-2573)	14,96	3	2	2	2	127	14,6	9,72	51,19	14,96	2	2									
>KIOANB25YA19FM1	>KIOANB25YA19FM1:c(1211-3730)	67,10	1	54	54	281	839	95,0	9,17	2901,90	62,81	47	94	3011,35	65,32	48	95	3002,64	61,98	47	92	
>KIOANB26YD05AHM1	>KIOANB26YD05AHM1:c(2211-4190)	47,19	1	21	21	80	659	74,5	5,31	989,24	42,49	17	28	902,58	36,87	17	26	903,25	37,48	17	26	
>KIOANB7YD11AHM1	>KIOANB7YD11AHM1:1:643-1539	13,09	1	3	3	19	298	33,7	6,14	171,79	11,07	2	5	221,58	13,09	3	7	180,01	13,09	3	7	
>KIOANB7YEI6AHM1	>KIOANB7YEI6AHM1:c(131-697)	42,02	2	5	5	15	188	21,7	7,84	284,07	27,13	3	5	258,56	42,02	5	6	201,67	27,13	3	4	
>KIOANB9YJ17FM1	>KIOANB9YJ17FM1:890-1303	19,71	1	2	2	3	137	16,3	4,79					94,83	19,71	2	3					
>KIOAPB13YM20FM1	>KIOAPB13YM20FM1:c(434-1237)	43,82	1	16	16	75	267	29,3	5,97	478,76	39,33	8	17	766,29	43,82	15	32	655,90	43,82	13	26	
>KIOAPB15YK12AHM1	>KIOAPB15YK12AHM1:1804-2289	15,53	2	2	2	7	161	19,1	9,47	166,38	15,53	2	3	104,55	15,53	2	2	103,72	15,53	2	2	

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

											7939(SDS10mn)		7940(SDS1h)		7941(PBS1h)						
											147		158		168						
											195										
Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
>K10APB17YED5F M1	>K10APB17YED5FM1 :1117-1704	24,62	1	3	3	15	195	21,8	9,96	324,32	24,62	3	6	201,13	24,62	3	4	289,30	24,62	3	5
>K10APB3YL08AH M1	>K10APB3YL08AHM1 :c(1-2034)	21,24	1	3	10	14	678	71,8	5,14	410,73	21,24	10	14								
>K10APB9YL08AH M1	>K10APB9YL08AHM1 :c(265-642)	61,60	1	9	9	55	125	13,7	9,89	661,00	49,60	7	16	661,16	61,60	9	18	717,89	49,60	8	21
>K10AQA3YF15F M1	>K10AQA3YF15FM1: c(1-390)	46,51	1	5	5	15	129	13,9	9,76	101,59	40,31	4	4	142,25	38,76	4	5	161,71	46,51	5	6
>K10AQA3YH06A HM1	>K10AQA3YH06AHM 1:c(137-646)	28,99	2	3	3	11	169	19,3	6,55	181,97	28,99	3	4	170,06	28,99	3	4	126,19	28,99	3	3
>K10AQA7YF17F M1	>K10AQA7YF17FM1: 810-1550	38,62	1	8	8	29	246	27,1	9,80	266,29	34,96	7	9	292,29	38,62	8	11	232,13	34,15	7	9
>K10AQA7Y105F M1	>K10AQA7Y105FM1: c(3870-4184)	25,00	2	2	2	7	104	11,9	8,44	73,35	25,00	2	3	51,39	25,00	2	2	54,98	25,00	2	2
>K10ARB20YF22A HM1	>K10ARB20YF22AH M1:c(145-1320)	32,23	2	10	11	36	391	45,9	9,16	209,67	20,97	8	11	232,57	18,93	6	10	312,02	32,23	11	15
>K10ARB22YG20 AHM1	>K10ARB22YG20AH M1:c(1536-1850)	47,12	1	3	3	13	104	11,7	10,45	118,29	32,69	2	4	144,15	47,12	3	5	120,68	47,12	3	4
>K10ARB22YMW06 AHM1	>K10ARB22YMW06AH M1:c(5110-5523)	19,71	2	3	3	12	137	16,1	9,25	108,88	11,68	2	3	150,59	19,71	3	5	127,32	19,71	3	4
>K10ARB23YL14F M1	>K10ARB23YL14FM1 :c(317-673)	50,00	1	5	5	19	118	12,9	9,36	219,57	33,05	3	6	285,59	38,98	4	7	209,69	44,07	4	6
>K10ARB25YO15 FM1	>K10ARB25YO15FM 1:c(699-1484)	18,77	2	4	4	12	261	29,2	8,90	46,85	13,41	2	2	79,85	13,41	3	3	126,19	18,77	4	7
>K10ARB6YD14F M1	>K10ARB6YD14FM1: 1-1332	8,58	4	2	2	2	443	51,2	8,70					71,45	8,58	2	2				
198-908_Undeen	198-908_Undeen	89,14	1	23	23	137	236	27,2	8,25	1000,68	80,08	20	40	1319,16	88,14	22	49	1367,01	84,75	20	48
666-1553_Undeen	666-1553_Undeen	54,58	1	9	36	404	295	33,2	9,44	3088,87	54,58	34	121	3754,16	53,56	34	148	3789,45	53,56	34	135

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)
147	158	168
195		

Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverag e B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
KCZ80420.1	6- phosphofructokinase [Anncalia algerae PRA339]	3,39	1	2	2	2	826	91,4	6,87									84,17	3,39	2	2
AaPTP2_K10AKA2 3YJ18FM1_Undeen partial	AaPTP2_K10AKA23YJ 18FM1_Undeenpartial	66,50	1	14	14	106	200	22,5	9,39	365,99	61,00	8	10	1545,52	66,50	13	55	1274,81	66,00	12	41
AaPTP3_K10APB2 3YG12FM1_Undeen n	AaPTP3_K10APB23Y G12FM1_Undeen	5,24	1	3	3	4	#	128,7	5,82									126,45	5,24	3	4
KCZ80346.1	actin-1 [Anncalia algerae PRA339]	39,25	2	10	10	40	372	41,2	5,85	365,94	20,70	7	12	386,56	26,61	7	11	587,92	39,25	10	17
KCZ81477.1	asparagine-tRNA ligase [Anncalia algerae PRA339]	15,92	1	4	4	6	446	51,8	6,02	156,68	15,92	4	4					85,38	7,40	2	2
c(6455- 7720)_Undeen	c(6455- 7720)_Undeen	10,45	1	6	6	13	421	49,1	9,14	100,41	8,31	5	5	125,76	6,89	4	4	91,07	5,94	3	4
KCZ81173.1	glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase, type I [Anncalia algerae PRA339]	25,77	1	6	6	33	326	36,1	7,08	383,83	25,77	6	12	257,04	18,10	4	9	376,04	23,31	5	12
H311_00209T0	H311_00209 Anncalia algerae PRA109 hypothetical protein (121 aa)	27,27	4	2	2	2	121	13,4	8,87					31,23	27,27	2	2				
H311_00215T0	H311_00215 Anncalia algerae PRA109 methionine aminopeptidase, type II (353 aa)	15,63	1	2	3	8	352	39,5	5,07	112,39	9,38	2	2	252,84	9,38	2	3	113,53	15,63	3	3

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)
147	158	168

195

Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
H311_01175T0	H311_01175 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (149 aa)	35,81	2	3	3	17	148	16,6	10,39	229,42	35,81	3	6	250,35	35,81	3	6	201,50	35,81	3	5
H311_01212T0	H311_01212 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (165 aa)	51,83	1	6	6	19	164	19,2	7,84	149,66	31,10	3	5	170,13	44,51	5	7	163,77	45,12	5	7
H311_01232T0	H311_01232 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (177 aa)	33,52	2	4	4	13	176	20,0	10,02	153,10	13,07	2	3	200,87	33,52	4	5	202,53	33,52	4	5
H311_01489T0	H311_01489 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (330 aa)	17,02	2	3	3	18	329	37,6	6,32	233,68	17,02	3	10	222,31	8,51	2	5	189,36	8,51	2	3
H311_01551T0	H311_01551 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (161 aa)	31,87	1	3	3	9	160	17,9	5,10					86,86	31,87	3	5	97,57	21,25	2	4
H311_01614T0	H311_01614 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (238 aa)	8,44	2	2	2	2	237	27,6	5,55					80,51	8,44	2	2				
H311_01659T0	H311_01659 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (202 aa)	27,36	4	3	3	13	201	22,7	5,72	124,00	17,41	2	3	178,93	27,36	3	4	227,24	27,36	3	6

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)
147	158	168
195		

Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
H311_01690T0	H311_01690 Anncaliia algerae PRA109 T-complex protein 1, eta subunit (419 aa)	6,44	1	2	2	4	419	47,0	6,24	92,95	6,44	2	2					72,49	6,44	2	2
H311_01696T0	H311_01696 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (103 aa)	57,84	1	6	6	30	102	10,3	9,80	320,68	57,84	6	9	430,92	57,84	6	10	488,96	57,84	6	11
H311_01862T0	H311_01862 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (125 aa)	83,87	1	3	30	287	124	14,7	9,96	1964,40	83,87	28	89	2429,17	81,45	28	115	1865,95	81,45	28	83
H311_02428T0	H311_02428 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (144 aa)	24,48	2	3	3	11	143	16,4	9,63	65,94	24,48	3	3	115,78	24,48	3	4	107,96	24,48	3	4
H311_02679T0	H311_02679 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (306 aa)	31,05	1	3	9	46	306	35,0	5,47	430,51	31,05	9	16	430,97	30,07	8	16	351,38	31,05	8	14
H311_02726T0	H311_02726 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (223 aa)	29,73	2	3	3	10	222	24,8	5,19					161,77	19,37	2	4	185,82	29,73	3	6
H311_02755T0	H311_02755 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (182 aa)	81,22	1	14	14	119	181	20,0	5,34	1077,62	81,22	13	30	1346,25	81,22	14	40	1502,15	81,22	14	49

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)

147

7940(SDS1h)

158

7941(PBS1h)

168

195

Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
H311_02789T0	H311_02789 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (737 aa)	38,53	1	5	27	148	737	83,0	8,48	1639,89	35,14	25	50	1694,47	32,02	22	48	1882,92	35,01	24	50
H311_02821T0	H311_02821 Anncaliia algerae PRA109 trehalose- phosphatase (700 aa)	14,45	1	1	8	29	699	81,0	7,43	238,69	11,02	6	8	257,58	14,45	7	9	343,80	14,45	8	12
H311_02840T0	H311_02840 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (528 aa)	45,92	1	3	25	132	527	60,5	9,16	1261,88	41,75	24	46	1270,11	36,81	20	41	1404,60	40,99	22	45
H311_02925T0	H311_02925 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (563 aa)	5,16	2	2	2	3	562	63,4	9,20	86,82	5,16	2	3								
H311_03104T0	H311_03104 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (557 aa)	10,77	1	5	5	17	557	63,2	6,49	148,33	8,08	4	7	139,00	10,77	5	6	138,82	6,64	3	4
H311_03178T0	H311_03178 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (254 aa)	17,79	2	4	4	11	253	28,2	8,40					160,24	17,79	4	6	127,87	17,79	4	5
H311_03182T0	H311_03182 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (141 aa)	38,57	1	2	4	19	140	15,6	9,94	110,05	38,57	4	6	148,13	38,57	4	7	110,60	38,57	4	6

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)
147	158	168

195

Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2	
H311_03210T0	H311_03210 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (315 aa)	13,69	3	3	3	11	314	34,6	7,93	127,94	8,92	2	3	173,44	13,69	3	5	148,57	8,92	2	3	
H311_03285T0	H311_03285 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (183 aa)	20,88	2	2	2	2	182	21,0	9,41									82,33	20,88	2	2	
H311_03349T0	H311_03349 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (188 aa)	28,88	1	5	5	26	187	20,9	7,37	275,62	28,88	5	8	268,81	25,67	4	9	328,62	28,88	5	9	
H311_03569T0	H311_03569 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (417 aa)	19,18	1	8	8	23	417	49,3	9,29	210,23	19,18	8	11	125,27	13,91	6	6	148,57	12,23	5	6	
H311_03764T0	H311_03764 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (421 aa)	13,06	2	2	2	2	421	46,1	7,56	65,48	13,06	2	2									
H311_03777T0	H311_03777 Anncaliia algerae PRA109 ribosomal protein L10e (190 aa)	11,58	2	2	2	4	190	21,7	10,21	72,89	11,58	2	2					56,52	11,58	2	2	
H311_03800T0	H311_03800 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (101 aa)	33,00	2	2	2	8	100	11,8	5,55									191,27	33,00	2	8	

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)
147	158	168
195		

Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
H311_03826T0	H311_03826 Anncalia algerae PRA109 hypothetical protein (377 aa)	9,81	3	2	2	4	377	44,0	6,87					68,29	9,81	2	2	78,59	9,81	2	2
H311_04039T0	H311_04039 Anncalia algerae PRA109 hypothetical protein (185 aa)	36,22	2	6	6	22	185	20,5	9,39	152,00	33,51	4	5	317,67	33,51	4	8	241,22	36,22	6	9
H311_04084T0	H311_04084 Anncalia algerae PRA109 hypothetical protein (124 aa)	54,47	1	6	13	67	123	14,2	9,48	564,97	54,47	12	24	488,56	54,47	13	21	505,13	54,47	13	22
H311_04192T0	H311_04192 Anncalia algerae PRA109 hypothetical protein (219 aa)	19,27	1	3	3	14	218	25,3	8,85	77,06	14,68	2	2	197,94	19,27	3	6	175,82	19,27	3	6
H311_04346T0	H311_04346 Anncalia algerae PRA109 hypothetical protein (149 aa)	83,22	1	2	13	94	149	17,2	8,06	665,71	79,19	11	21	1226,73	83,22	13	41	936,79	81,21	12	32
H311_04348T0	H311_04348 Anncalia algerae PRA109 hypothetical protein (155 aa)	41,56	1	4	6	30	154	17,4	9,10	272,23	27,92	4	7	445,33	41,56	6	12	361,80	35,71	5	11
H311_04408T0	H311_04408 Anncalia algerae PRA109 ribosomal protein L30P (240 aa)	30,96	3	5	6	17	239	27,7	9,69	239,21	24,27	4	6	138,93	15,06	3	5	213,18	23,43	4	6

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)
147	158	168
195		

Accession	Description	%Cover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2	
H311_04410T0	H311_04410 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (241 aa)	27,50	2	6	6	21	240	27,9	5,00	227,81	17,08	4	8	162,26	20,42	5	7	176,85	21,25	4	6	
H311_04605T0	H311_04605 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (222 aa)	71,95	1	22	22	374	221	25,8	5,12	1987,02	71,95	22	85	3983,49	71,95	22	171	3037,80	71,95	22	118	
H311_04705T0	H311_04705 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (174 aa)	29,31	3	2	3	4	174	19,2	8,70	124,58	29,31	3	4					60,25	21,97	2	3	
H311_04797T0	H311_04797 Anncaliia algerae PRA109 ribosomal protein L22 (132 aa)	21,97	2	2	2	3	132	15,3	10,35													
H311_05031T0	H311_05031 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (161 aa)	55,28	1	2	5	16	161	18,1	4,73	326,29	55,28	5	7					317,74	39,75	4	9	
H311_05206T0	H311_05206 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (102 aa)	33,66	3	4	4	13	101	11,4	9,85	112,80	29,70	3	4	132,75	33,66	4	5	132,85	33,66	4	4	
KCZ82450.1	hypothetical protein H312_00108, partial [Anncaliia algerae PRA339]	7,88	2	3	3	6	419	48,5	5,31	173,66	7,64	2	3					129,89	7,88	2	3	

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

Accession	Description	ΣCoverage	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	7939(SDS10mn)		7940(SDS1h)		7941(PBS1h)								
										Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptides B2	# PSM B2	Score C2	Coverage C2	# Peptides C2	# PSM C2	
KCZ8289.1	hypothetical protein H312_00312 [Anncalia algerae PRA339]	17,52	2	5	5	9	548	61,2	8,06	226,46	13,14	4	5									
KCZ82316.1	hypothetical protein H312_00339 [Anncalia algerae PRA339]	20,34	1	4	4	15	236	26,3	5,24	184,44	20,34	4	5	153,30	20,34	4	4	218,39	20,34	4	6	
KCZ82155.1	hypothetical protein H312_00432, partial [Anncalia algerae PRA339]	17,24	1	2	4	18	319	36,1	9,63	122,31	12,23	3	5	183,07	17,24	4	7	154,01	17,24	4	6	
KCZ82156.1	hypothetical protein H312_00433 [Anncalia algerae PRA339]	40,74	1	3	19	101	405	46,0	8,09	874,12	40,74	18	37	720,24	30,12	16	32	759,92	37,53	16	32	
KCZ82157.1	hypothetical protein H312_00434 [Anncalia algerae PRA339]	20,06	1	2	9	16	344	39,4	7,23	330,30	20,06	9	16									
KCZ81994.1	hypothetical protein H312_00476 [Anncalia algerae PRA339]	22,14	1	2	2	4	140	15,7	10,13	46,71	22,14	2	2					70,36	22,14	2	2	
KCZ81998.1	hypothetical protein H312_00480 [Anncalia algerae PRA339]	57,47	1	22	22	74	475	53,9	6,76	628,96	35,16	13	20	752,39	42,11	16	22	876,56	51,37	18	32	

147

158

195

168

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

Accession	Description	ΣCoverage	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	7939(SDS10mn)		7940(SDS1h)		7941(PBS1h)								
										Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptides B2	# PSM B2	Score C2	Coverage C2	# Peptides C2	# PSM C2	
KCZ81938.1	hypothetical protein H312_00581 [Anncalia algerae PRA339]	11,33	1	2	6	7	847	98,7	6,04	256,39	11,33	6	7									
KCZ81956.1	hypothetical protein H312_00599 [Anncalia algerae PRA339]	24,73	1	6	6	12	368	42,2	5,17	213,66	11,41	3	4	268,80	18,48	4	5	187,99	11,68	2	3	
KCZ81883.1	hypothetical protein H312_00642 [Anncalia algerae PRA339]	28,42	2	3	3	8	183	20,9	7,24	67,38	18,58	2	2	56,22	28,42	3	3	115,04	18,58	2	3	
KCZ81862.1	hypothetical protein H312_00761 [Anncalia algerae PRA339]	28,06	1	1	13	25	645	74,9	6,95					804,62	28,06	13	25					
KCZ81720.1	hypothetical protein H312_00899 [Anncalia algerae PRA339]	12,50	1	2	2	3	104	10,8	10,13									98,18	12,50	2	3	
KCZ81552.1	hypothetical protein H312_01005, partial [Anncalia algerae PRA339]	2,82	1	2	2	2	921	108,1	5,38	73,51	2,82	2	2									
KCZ81388.1	hypothetical protein H312_01143 [Anncalia algerae PRA339]	42,36	1	9	9	26	144	16,5	10,49	231,88	30,56	6	10	173,22	31,94	6	8	182,36	31,94	6	8	

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

Accession	Description	ΣCoverage	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	7939(SDS10mn)		7940(SDS1h)		7941(PBS1h)							
										Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptides B2	# PSM B2	Score C2	Coverage C2	# Peptides C2	# PSM C2
KCZ81423.1	hypothetical protein H312_01178 [Anncalia algerae PRA339]	32,74	1	1	7	10	339	38,4	8,15												
KCZ81368.1	hypothetical protein H312_01249 [Anncalia algerae PRA339]	10,50	1	2	2	2	457	50,8	7,61				133,06	10,50	2	2	336,32	32,74	7	10	
KCZ81250.1	hypothetical protein H312_01328 [Anncalia algerae PRA339]	35,64	1	1	6	10	202	23,4	6,70	245,70	35,64	6	10								
KCZ81251.1	hypothetical protein H312_01329 [Anncalia algerae PRA339]	17,75	1	3	3	11	169	19,8	9,11	80,49	13,61	2	2	131,95	17,75	3	5	110,58	13,61	2	4
KCZ81255.1	hypothetical protein H312_01333 [Anncalia algerae PRA339]	54,62	1	3	14	70	249	28,6	7,83					1025,26	54,62	14	39	870,50	47,39	12	31
KCZ81259.1	hypothetical protein H312_01337 [Anncalia algerae PRA339]	13,99	1	7	7	13	629	71,1	7,81	99,30	5,25	3	4	150,27	11,92	6	6	77,26	4,93	3	3
KCZ81260.1	hypothetical protein H312_01338 [Anncalia algerae PRA339]	14,42	2	3	3	6	215	24,6	9,99	62,24	14,42	2	2					134,00	13,49	2	4

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

Accession	Description	ΣCoverage	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	7939(SDS10mn)		7940(SDS1h)		7941(PBS1h)							
										Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptides B2	# PSM B2	Score C2	Coverage C2	# Peptides C2	# PSM C2
KCZ81170.1	hypothetical protein H312_01380 [Anncalia algerae PRA339]	33,49	2	4	4	12	218	25,2	9,94	185,59	33,49	4	5	202,77	27,06	3	4	100,90	25,69	3	3
KCZ81185.1	hypothetical protein H312_01395 [Anncalia algerae PRA339]	17,43	1	5	5	21	373	40,4	6,52	192,38	13,14	3	5	275,62	17,43	5	8	282,50	13,40	4	8
KCZ81197.1	hypothetical protein H312_01407 [Anncalia algerae PRA339]	13,02	3	3	3	4	361	40,1	8,15					37,10	9,42	2	2	58,20	8,31	2	2
KCZ80883.1	hypothetical protein H312_01711 [Anncalia algerae PRA339]	50,28	1	7	7	32	177	20,6	5,76	152,71	48,59	6	8	329,97	44,63	6	13	317,99	44,63	6	11
KCZ80754.1	hypothetical protein H312_01812, partial [Anncalia algerae PRA339]	53,19	2	4	4	9	94	10,2	4,61					98,19	53,19	4	4	228,39	45,74	3	5
KCZ80641.1	hypothetical protein H312_01968 [Anncalia algerae PRA339]	35,94	1	18	18	58	768	85,8	5,73	671,83	29,17	15	22	642,07	29,56	14	18	665,18	22,27	11	18
KCZ80148.1	hypothetical protein H312_02450 [Anncalia algerae PRA339]	36,54	1	15	16	50	665	74,2	5,45	580,52	30,53	13	16	632,74	27,22	11	16	605,53	26,47	10	18

147

158

195

168

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)
147	158	168

195

Accession	Description	ΣCover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
KCZ80044.1	hypothetical protein H312_02562 [Anncalia algerae PRA339]	55,15	2	8	8	31	165	18,6	9,32	349,45	55,15	7	12	278,03	32,12	5	10	274,96	44,85	5	9
KCZ79867.1	hypothetical protein H312_02738 [Anncalia algerae PRA339]	23,70	1	13	21	56	#	119,4	5,24					726,50	20,85	16	26	697,30	20,67	18	30
KCZ79628.1	hypothetical protein H312_02984 [Anncalia algerae PRA339]	16,67	1	3	3	11	186	21,4	6,84					138,99	16,67	3	6	164,51	16,67	3	5
KCZ79491.1	hypothetical protein H312_03115 [Anncalia algerae PRA339]	76,43	1	10	10	71	140	15,3	9,86	686,16	75,71	9	21	865,84	76,43	10	24	917,26	76,43	10	26
KCZ79357.1	hypothetical protein H312_03248 [Anncalia algerae PRA339]	4,42	1	2	2	2	814	91,1	5,48					57,47	4,42	2	2				
KCZ79304.1	hypothetical protein H312_03309 [Anncalia algerae PRA339]	12,76	3	5	5	10	588	67,5	5,90					76,26	9,52	4	5	90,43	9,52	4	5

Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)
147	158	168
195		

Accession	Description	ΣCover age	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score A2	Coverage A2	# Peptid es A2	# PSM A2	Score B2	Coverage B2	# Peptid es B2	# PSM B2	Score C2	Covera ge C2	# Peptides C2	# PSM C2
KCZ9102.1	hypothetical protein H312_03514 [Anncalia algerae PRA339]	48,50	1	15	15	203	266	30,2	5,33	1723,83	32,33	9	56	3448,96	47,74	14	83	2261,56	46,62	13	64
KCZ9027.1	hypothetical protein H312_03589 [Anncalia algerae PRA339]	40,09	1	14	14	54	469	55,2	9,89	383,32	15,78	8	14	408,20	32,62	13	18	335,86	28,14	10	22
KCZ78997.1	hypothetical protein H312_03621, partial [Anncalia algerae PRA339]	29,27	3	2	2	2	82	9,6	5,69					39,07	29,27	2	2				
KCZ78970.1	hypothetical protein H312_03647 [Anncalia algerae PRA339]	20,24	1	8	8	30	336	39,3	5,34	343,95	18,15	6	10	285,10	15,18	5	8	373,50	17,26	7	12
KCZ81076.1	phosphopyruvate hydratase [Anncalia algerae PRA339]	31,30	1	3	7	26	409	45,2	6,07	520,77	31,30	7	11	405,77	21,03	4	7	445,03	21,03	4	8
KCZ81299.1	ribosomal protein L13, partial [Anncalia algerae PRA339]	26,84	2	3	3	15	190	22,0	9,61	206,62	26,84	3	5	235,78	26,84	3	5	262,95	26,84	3	5
KCZ81786.1	ribosomal protein S19 [Anncalia algerae PRA339]	26,35	2	2	2	8	148	16,9	10,04	126,81	26,35	2	3	109,80	26,35	2	3	79,03	26,35	2	2

**Résultats analyses LC MS/MS ID0359 - Identifications protéines -
 Comparaison 3 modes de préparation**

Nombre de protéines par échantillon :

Nombre de protéines totales :

	7939(SDS10mn)	7940(SDS1h)	7941(PBS1h)																		
	147	158	168																		
	195																				
KCZ80036.1	trehalose- phosphatase [Anncalia algerae PRA339]	13,67	1	1	8	29	724	83,9	8,12	255,47	10,36	6	8	291,10	13,67	7	9	368,37	13,67	8	12
KCZ79571.1	V-type proton ATPase subunit B [Anncalia algerae PRA339]	21,99	1	5	5	10	482	53,6	5,11	137,49	12,66	3	3	127,81	12,24	3	3	219,21	18,67	4	4

Annexe 2 :

Analyse des résultats MS pour la recherche d'orthologues

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A.algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
>AaSWP7_KIOAEA11YB06AHM1	>AaSWP7_KIOAEA11YB06AHM1:c(78-899)_Undeen			
>KIOAAA9YJ11RM1	>KIOAAA9YJ11RM1:2051-3294			
>KIOAAD35CC01FM1	>KIOAAD35CC01FM1:621-1507			
>KIOAAD3AE03FM1	>KIOAAD3AE03FM1:267-1025			
>KIOAAD45CE04FM1	>KIOAAD45CE04FM1:2472			
>KIOAAD54DA12FM1	>KIOAAD54DA12FM1:c(972-1715)			
>KIOAAD5AF04AHM1	>KIOAAD5AF04AHM1:c(1130-2026)			
>KIOAAD72CC05FM1	>KIOAAD72CC05FM1:901-1590			
>KIOAAD8BE06AHM1	>KIOAAD8BE06AHM1:c(1428-1871)			
>KIOABA24YP20FM1	>KIOABA24YP20FM1:c(2107-2556)			
>KIOABA46YJ18FM1	>KIOABA46YJ18FM1:c(2267-2827)			
>KIOABA53YJ17RM1	>KIOABA53YJ17RM1:303-989			
>KIOABA54YL10FM1	>KIOABA54YL10FM1:c(694-1074)			
>KIOABA57YA11FM1	>KIOABA57YA11FM1:c(642-2246)			
>KIOAEA10YF06AHM1	>KIOAEA10YF06AHM1:c(2096-2830)			
>KIOAEA11YE01FM1	>KIOAEA11YE01FM1:540-962			
>KIOAEA11YJ13AHM1	>KIOAEA11YJ13AHM1:c(777-2225)			
>KIOAEA11YM04FM1	>KIOAEA11YM04FM1:612-1133			
>KIOAEA13YC17AHM1	>KIOAEA13YC17AHM1:1768-2214			
>KIOAEA14YD09FM1	>KIOAEA14YD09FM1:242-877			
>KIOAEA15YN20FM1	>KIOAEA15YN20FM1:559-1242			
>KIOAEA16YC14FM1	>KIOAEA16YC14FM1:324-824			
>KIOAEA18YJ23FM1	>KIOAEA18YJ23FM1:2601-3107			
>KIOAEA20YI04FM1	>KIOAEA20YI04FM1:1708-3270			
>KIOAEA22YB09FM1	>KIOAEA22YB09FM1:c(323-1294)			
>KIOAEA4YE16AHM1	>KIOAEA4YE16AHM1:2028-2426			
>KIOAEA7YF20FM1	>KIOAEA7YF20FM1:c(2933-3760)			
>KIOAEA7YK08FM1	>KIOAEA7YK08FM1:545-1489			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A.algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
>KIOAEA8YD23AHM1	>KIOAEA8YD23AHM1:115-822			
>KIOAEA8YN09AHM1	>KIOAEA8YN09AHM1:1373-1912			
>KIOAFA5DG12FM1	>KIOAFA5DG12FM1:c(2847-3884)			
>KIOAFA6BE05FM1	>KIOAFA6BE05FM1:c(3781-4389)			SWP
>KIOAFA8CG01FM1	>KIOAFA8CG01FM1:c(110-904)			
>KIOAGA11BB01FM1	>KIOAGA11BB01FM1:c(870-1538)			
>KIOAGA16AB12AHM1	>KIOAGA16AB12AHM1:2031-2963			
>KIOAGA16DB05AHM1	>KIOAGA16DB05AHM1:2033-2671			
>KIOAGA18AC05FM1	>KIOAGA18AC05FM1:1311-1974			
>KIOAGA4AB01AHM1	>KIOAGA4AB01AHM1:2123-3049			
>KIOAGA4AF09FM1	>KIOAGA4AF09FM1:c(1698-2786)			
>KIOAGA5CF04AHM1	>KIOAGA5CF04AHM1:c(281-895)			
>KIOAGA8AB05AHM1	>KIOAGA8AB05AHM1:c(274-942)			
>KIOAHA17YD09FM1	>KIOAHA17YD09FM1:293-793			
>KIOAHA18YF09FM1	>KIOAHA18YF09FM1:c(595-1383)			
>KIOAHA21YI21AHM1	>KIOAHA21YI21AHM1:c(1115-1579)			
>KIOAHA23YF24AHM1	>KIOAHA23YF24AHM1:c(342-1157)			
>KIOAHA23YO01FM1	>KIOAHA23YO01FM1:c(877-1935)			
>KIOAHA25YI02FM1	>KIOAHA25YI02FM1:1340-2320			
>KIOAHA26YB10FM1	>KIOAHA26YB10FM1:3774-5711			
>KIOAHA9YD21FM1	>KIOAHA9YD21FM1:c(2209-2811)			
>KIOAIA10YB11AHM1	>KIOAIA10YB11AHM1:c(2072-2506)			
>KIOAIA10YH19FM1	>KIOAIA10YH19FM1:18-455			
>KIOAIA13YP22AHM1	>KIOAIA13YP22AHM1:2361-3788			
>KIOAIA19YI15FM1	>KIOAIA19YI15FM1:c(1572-2093)			
>KIOAIA21YO08AHM1	>KIOAIA21YO08AHM1:c(1722-2648)			
>KIOAIA25YH11AHM1	>KIOAIA25YH11AHM1:c(212-526)			
>KIOAIA4YI03AHM1	>KIOAIA4YI03AHM1:1703-2026			
>KIOAIA4YI03AHM1	>KIOAIA4YI03AHM1:c(365-1384)			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A. algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
>KIOAIA5YE23AHM1	>KIOAIA5YE23AHM1:c(610-1101)			
>KIOAKA10YJ03FM1	>KIOAKA10YJ03FM1:217-630			
>KIOAKA11YE13FM1	>KIOAKA11YE13FM1:351-2900			
>KIOAKA19YN23AHM1	>KIOAKA19YN23AHM1:789-1355			
>KIOAKA24YD10FM1	>KIOAKA24YD10FM1:98-355			
>KIOAKA26YP14FM1	>KIOAKA26YP14FM1:4072-5388			
>KIOALA10YM04AHM1	>KIOALA10YM04AHM1:c(2215-2913)			
>KIOALA14YF22AHM1	>KIOALA14YF22AHM1:c(181-501)			
>KIOALA15YI13FM1	>KIOALA15YI13FM1:c(2240-3841)			
>KIOALA21YO03AHM1	>KIOALA21YO03AHM1:3214-3729			
>KIOALA2YI11FM1	>KIOALA2YI11FM1:405-887			
>KIOALA5YH02FM1	>KIOALA5YH02FM1:c(620-1765)			
>KIOAMB32YB08FM1	>KIOAMB32YB08FM1:c(1162-3681)			
>KIOAMB35YD07FM1	>KIOAMB35YD07FM1:c(26-1090)			
>KIOANB10YG11FM1	>KIOANB10YG11FM1:c(2190-2573)			
>KIOANB25YA19FM1	>KIOANB25YA19FM1:c(1211-3730)			
>KIOANB26YD05AHM1	>KIOANB26YD05AHM1:c(2211-4190)			
>KIOANB7YD11AHM1	>KIOANB7YD11AHM1:643-1539			
>KIOANB7YE16AHM1	>KIOANB7YE16AHM1:c(131-697)			
>KIOANB9YJ17FM1	>KIOANB9YJ17FM1:890-1303			
>KIOAPB13YM20FM1	>KIOAPB13YM20FM1:c(434-1237)			
>KIOAPB15YK12AHM1	>KIOAPB15YK12AHM1:1804-2289			
>KIOAPB17YE05FM1	>KIOAPB17YE05FM1:117-1704			
>KIOAPB3YL08AHM1	>KIOAPB3YL08AHM1:c(1-2034)			PTP3
>KIOAPB9YL08AHM1	>KIOAPB9YL08AHM1:c(265-642)			
>KIOAQA3YF15FM1	>KIOAQA3YF15FM1:c(1-390)			
>KIOAQA3YH06AHM1	>KIOAQA3YH06AHM1:c(137-646)			
>KIOAQA7YF17FM1	>KIOAQA7YF17FM1:810-1550			
>KIOAQA7YJ05FM1	>KIOAQA7YJ05FM1:c(3870-4184)			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A.algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
>KIOARB20YF22AHM1	>KIOARB20YF22AHM1:c(145-1320)			
>KIOARB22YG20AHM1	>KIOARB22YG20AHM1:c(1536-1850)			
>KIOARB22YM06AHM1	>KIOARB22YM06AHM1:c(5110-5523)			
>KIOARB23YL14FM1	>KIOARB23YL14FM1:c(317-673)			
>KIOARB25YO15FM1	>KIOARB25YO15FM1:c(699-1484)			
>KIOARB6YD14FM1	>KIOARB6YD14FM1:1-1332			
198-908_Undeen	198-908_Undeen			SWP12
666-1553_Undeen	666-1553_Undeen			
KCZ80420.1	6-phosphofructokinase [Anncaliia algerae PRA339]			
AaPTP2_KI0AKA23YJ18FM1_Undeen partial	AaPTP2_KI0AKA23YJ18FM1_Undeen partial	PTP2		PTP2
AaPTP3_KI0APB23YG12FM1_Undeen	AaPTP3_KI0APB23YG12FM1_Undeen	PTP3		PTP3
KCZ80346.1	actin-1 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81477.1	asparagine-tRNA ligase [Anncaliia algerae PRA339]			
c(6455-7720)_Undeen	c(6455-7720)_Undeen			
KCZ81173.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I [Anncaliia algerae PRA339]			
H311_00209T0	H311_00209 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (121 aa)			
H311_00215T0	H311_00215 Anncaliia algerae PRA109 methionine aminopeptidase, type II (353 aa)			
H311_00228T0	H311_00228 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (62 aa)			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A.algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
H311_00323T0	H311_00323 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (203 aa)			
H311_00579T0	H311_00579 Anncaliia algerae PRA109 ribosomal protein S4 (187 aa)			
H311_00764T0	H311_00764 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (249 aa)			
H311_00968T0	H311_00968 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (118 aa)			
H311_01033T0	H311_01033 Anncaliia algerae PRA109 thymidylate kinase (209 aa)			
H311_01164T0	H311_01164 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (265 aa)			PTP3
H311_01175T0	H311_01175 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (149 aa)			
H311_01212T0	H311_01212 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (165 aa)			
H311_01232T0	H311_01232 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (177 aa)			
H311_01489T0	H311_01489 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (330 aa)			
H311_01551T0	H311_01551 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (161 aa)			
H311_01614T0	H311_01614 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (238 aa)			
H311_01659T0	H311_01659 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (202 aa)			
H311_01690T0	H311_01690 Anncaliia algerae PRA109 T-complex protein 1, eta subunit (419 aa)			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A.algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
H311_01696T0	H311_01696 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (103 aa)			
H311_01862T0	H311_01862 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (125 aa)			
H311_02428T0	H311_02428 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (144 aa)			
H311_02679T0	H311_02679 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (306 aa)			
H311_02726T0	H311_02726 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (223 aa)			
H311_02755T0	H311_02755 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (182 aa)			
H311_02789T0	H311_02789 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (737 aa)			
H311_02821T0	H311_02821 Anncaliia algerae PRA109 trehalose-phosphatase (700 aa)			
H311_02840T0	H311_02840 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (528 aa)			
H311_02925T0	H311_02925 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (563 aa)			
H311_03104T0	H311_03104 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (557 aa)			
H311_03178T0	H311_03178 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (254 aa)			
H311_03182T0	H311_03182 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (141 aa)			
H311_03210T0	H311_03210 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (315 aa)			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A.algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
H311_03285T0	H311_03285 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (183 aa)			
H311_03349T0	H311_03349 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (188 aa)			
H311_03569T0	H311_03569 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (417 aa)			
H311_03764T0	H311_03764 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (421 aa)			
H311_03777T0	H311_03777 Anncaliia algerae PRA109 ribosomal protein L10.e (190 aa)			
H311_03800T0	H311_03800 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (101 aa)			
H311_03826T0	H311_03826 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (377 aa)			
H311_04039T0	H311_04039 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (185 aa)			
H311_04084T0	H311_04084 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (124 aa)			
H311_04192T0	H311_04192 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (219 aa)			
H311_04346T0	H311_04346 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (149 aa)			
H311_04348T0	H311_04348 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (155 aa)			
H311_04408T0	H311_04408 Anncaliia algerae PRA109 ribosomal protein L30P (240 aa)			
H311_04410T0	H311_04410 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (241 aa)			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A.algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
H311_04605T0	H311_04605 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (222 aa)			
H311_04705T0	H311_04705 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (174 aa)			
H311_04797T0	H311_04797 Anncaliia algerae PRA109 ribosomal protein L22 (132 aa)			
H311_05031T0	H311_05031 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (161 aa)			
H311_05206T0	H311_05206 Anncaliia algerae PRA109 hypothetical protein (102 aa)			
KCZ82450.1	hypothetical protein H312_00108, partial [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ82289.1	hypothetical protein H312_00312 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ82316.1	hypothetical protein H312_00339 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ82155.1	hypothetical protein H312_00432, partial [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ82156.1	hypothetical protein H312_00433 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ82157.1	hypothetical protein H312_00434 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81994.1	hypothetical protein H312_00476 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81998.1	hypothetical protein H312_00480 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81938.1	hypothetical protein H312_00581 [Anncaliia algerae PRA339]			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A.algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
KCZ81956.1	hypothetical protein H312_00599 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81883.1	hypothetical protein H312_00642 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81862.1	hypothetical protein H312_00761 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81720.1	hypothetical protein H312_00899 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81552.1	hypothetical protein H312_01005, partial [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81388.1	hypothetical protein H312_01143 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81423.1	hypothetical protein H312_01178 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81368.1	hypothetical protein H312_01249 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81250.1	hypothetical protein H312_01328 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81251.1	hypothetical protein H312_01329 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81255.1	hypothetical protein H312_01333 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81259.1	hypothetical protein H312_01337 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81260.1	hypothetical protein H312_01338 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81170.1	hypothetical protein H312_01380 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81185.1	hypothetical protein H312_01395 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81197.1	hypothetical protein H312_01407 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ80883.1	hypothetical protein H312_01711 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ80754.1	hypothetical protein H312_01812, partial [Anncaliia algerae PRA339]			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Accession	Description	Annotation des protéines à partir des données brutes de MS	Annotation des protéines issues du BLAST sur <i>A.algerae</i>	Annotation des protéines issues du BLAST sans sélection d'espèces
KCZ80641.1	hypothetical protein H312_01968 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ80148.1	hypothetical protein H312_02450 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ80044.1	hypothetical protein H312_02562 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ79867.1	hypothetical protein H312_02738 [Anncaliia algerae PRA339]			PTP3
KCZ79628.1	hypothetical protein H312_02984 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ79491.1	hypothetical protein H312_03115 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ79357.1	hypothetical protein H312_03248 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ79304.1	hypothetical protein H312_03309 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ79102.1	hypothetical protein H312_03514 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ79027.1	hypothetical protein H312_03589 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ78997.1	hypothetical protein H312_03621, partial [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ78970.1	hypothetical protein H312_03647 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81076.1	phosphopyruvate hydratase [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81299.1	ribosomal protein L13, partial [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ81786.1	ribosomal protein S19 [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ80036.1	trehalose-phosphatase [Anncaliia algerae PRA339]			
KCZ79571.1	V-type proton ATPase subunit B [Anncaliia algerae PRA339]			

Fonction identifiée
N° accession seul
Hypothetical proteins

Annexe 3 :

Article : Ricin B Lectin-like proteins of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* and *Anncaliia algerae* are involved in host-cell invasion
En révision dans Parasitology International

1 **Ricin B Lectin-Like proteins of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi***
2 **and *Anncaliia algerae* are involved in host-cell invasion.**

3 Nastasia Prybylski ^{a, b}, Maurine Fayet ^a, Aurore Dubuffet ^a, Frédéric Delbac ^a, Ayhan
4 Kocer ^c, Christine Gardarin ^b, Philippe Michaud ^b, Hicham El Alaoui ^a, Pascal
5 Dubessay ^{b, ✉}

6
7 ^a Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire Microorganismes: Génomes et
8 Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Electronic address:
9 nastasia.prybylski@uca.fr; maurine.fayet@uca.fr; aurore.dubuffet@uca.fr;
10 frederic.delbac@uca.fr; hicham.el_alaoui@uca.fr

11 ^b Université Clermont Auvergne, SIGMA Clermont, Institut Pascal, F-63000 Clermont-
12 Ferrand, France. Electronic address: christine.gardarin@uca.fr;
13 philippe.michaud@uca.fr; pascal.dubessay@uca.fr

14 ^c GReD, Laboratoire "Génétique, Reproduction and Développement," UMR Centre
15 National de la Recherche Scientifique 6293, INSERM U1103, Université Clermont
16 Auvergne, Clermont-Ferrand, France. Electronic address: ayhan.kocer@uca.fr

17
18 ✉ Corresponding author: pascal.dubessay@uca.fr

19
20 **Abstract**

21 Microsporidia are obligate intracellular pathogens capable of infecting a wide
22 variety of hosts ranging from invertebrates to vertebrates. The infection process
23 requires a step of prior adherence of Microsporidia to the surface of host cells. A few
24 studies demonstrated the involvement of proteins containing a ricin-B lectin (RBL)
25 domain in parasite infection. In this study *Anncaliia algerae* and *Encephalitozoon*

26 *cuniculi* genomes were screened by bioinformatic analysis to identify proteins with an
27 extracellular prediction and possessing RBL-type carbohydrate-binding domains,
28 being both potentially relevant factors contributing to host cell adherence. Three
29 proteins named AaRBLL-1 and AaRBLL-2 from *A. algerae* and EcRBLL-1 from *E.*
30 *cuniculi*, were selected and comparative analysis of sequences suggested their
31 belonging to a multigenic family, with a conserved structural RBL domain despite a
32 significant amino acid sequence divergence. The production of recombinant proteins
33 and antibodies against the three proteins allowed their subcellular localization on the
34 spore wall and/or the polar tube. Adherence inhibition assays based on pre-treatments
35 with recombinant proteins or antibodies highlighted the significant decrease of the
36 proliferation of both *E. cuniculi* and *A. algerae*, strongly suggesting that these proteins
37 are involved in the infection process.

38

39 Key words: Microsporidia, *Encephalitozoon cuniculi*, *Anncaliia algerae*, invasion, Ricin-
40 B lectin, adherence

41

42 **1. Introduction**

43 Microsporidia are obligate intracellular eukaryotic parasites including over 200
44 genera and 1400 species that have been characterized [1]. Microsporidia were
45 identified more than 150 years ago as etiologic agent of the Pebrine disease in
46 silkworms with the identification of *Nosema bombycis* [2]. Microsporidia can infect a
47 wide variety of hosts ranging from invertebrates to vertebrates and have been reported
48 to be involved in protists and in all major groups of animals, including human [3,4].
49 Thus, Microsporidia can cause significant economic losses in fish and shrimp farming,
50 sericulture and beekeeping [5–7]. Microsporidia have been phylogenetically classified

51 to Fungi, either as a basal branch of the Fungi or as a sister group [8–10], and most
52 likely related to the Cryptomycota [11,12].

53 The life cycle of Microsporidia is divided into three phases including the infective
54 phase, the proliferative phase and the sporogonial phase. The spore constitutes the
55 infective stage, and the only extracellular form of the parasite, able to persist in the
56 environment for months thanks to a resistant thick two-layered wall and contributing to
57 the parasite dissemination [4,13,14]. Microsporidia infect host cells through a unique
58 and highly specialized invasion process, involving a tubular structure coiled within the
59 spore termed the polar tube. After spore discharge, the extruded polar tube is used for
60 inoculating the infective sporoplasm into the host cell cytoplasm, in which the parasite
61 proliferation takes place [15–17]. Spore discharge occurs in different steps, including
62 (i) an activation phase, (ii) the increase of the intrasporal osmotic pressure, (iii) the
63 eversion of the polar tube and (iv) the passage of the sporoplasm through the polar
64 tube. However, the exact mechanism(s) of this process is not well understood [18].
65 The conditions triggering spore activation widely differ according to species. Some
66 factors promoting spore discharge have been determined such as shift in
67 environmental pH [19,20] or the concentration of various cations or anions [20,21].

68 At least three major routes seem to be involved in host cell invasion by
69 Microsporidia, (i) adherence of spores to host cell receptors prior to polar tube
70 evagination, (ii) extrusion of polar tube piercing the host cell plasma membrane or (iii)
71 phagocytosis of the spore followed by the extrusion of the polar tube [22]. Several
72 studies have demonstrated the importance of some proteins in the infection process,
73 in particular in the adherence and spore germination processes. Both Spore Wall
74 Proteins (SWP) and Polar Tube Proteins (PTP) play a major role during the first
75 interactions between Microsporidia and host cell components. A few SWPs interacting

76 with heparin-like motifs and glycosaminoglycans were identified from several
77 microsporidian species such as *Encephalitozoon* spp., *N. bombycis* and *Antonospora*
78 *locustae* [23–28]. The spore wall EnP1 protein containing a heparin-binding domain in
79 both *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis*, was identified as a
80 major functional element of the adherence process to host cells. The use of exogenous
81 recombinant proteins EnP1 or rabbit anti-EnP1 antibodies decreased the adherence
82 of the spore to host cells and subsequent infection [27]. In addition, a variety of
83 exogenous sulfated glycans have been shown to inhibit *Encephalitozoon* spore
84 invasion into host cells, probably by blocking adherence process [25,27]. A gene
85 encoding a protein associated to the ADAM (disintegrin and metalloprotease) family of
86 type I transmembrane glycoprotein was also identified in the *E. cuniculi* genome.
87 ADAM proteins are known to be involved in a variety of biological processes such as
88 cell adherence and proteolysis. The use of exogenous recombinant MsADAM protein
89 (Microsporidia ADAM) inhibited the adherence of *E. intestinalis* spores to host cells but
90 also reduced host cell infection by ~20%, suggesting its role in both adherence and
91 infection processes [29].

92 Some studies were conducted to characterize receptors localized on host cell
93 surface. The NbSWP26 in *N. bombycis* was demonstrated to interact with the
94 immunoglobulin-like protein BmTLP of silkworm *Bombyx mori*, highlighting its crucial
95 role in spore invasion of silkworm cells [30]. The *Encephalitozoon hellem* Polar Tube
96 Protein PTP4 was shown to be able to bind *in vitro* to the host cell surface via the host
97 transferrin receptor 1 (TfR1) protein. Interestingly, interfering with the interactions
98 between PTP4 and TfR1 led to a decrease in the infection of host cells [31]. In a few
99 microsporidian species such as *Spraguea lophii* and *N. bombycis*, proteins containing
100 a Ricin-B Lectin (RBL) domain were identified and their involvement in parasite

101 infection has been suggested or demonstrated [32,33]. Ricin is a lectin glycoprotein
102 composed of a chain A and a chain B linked by a disulfide bond [34]. The B chain is a
103 lectin that binds to cells through interactions with glycolipids and glycoproteins in
104 particular with β -linked galactose or *N*-acetylgalactosamine containing glycans
105 localized at the cell surface [35,36]. The functionality of the *NbRBL* on the adherence
106 and infection was demonstrated by incubating anti-*NbRBL* antibodies with host cells
107 and *N. bombycis* spores. The results showed a significant reduction of the spore
108 infectivity associated to a decreased adherence of spores to host cells [33].

109 Lectins are biologically active proteins isolated from humans, animals, plants and
110 microorganisms. Their ability to specifically bind different types of carbohydrates and
111 their widespread occurrence suggests their importance in various cellular processes
112 such as cell adherence, apoptosis and proliferation [37]. For example, the bacteria
113 *Bordetella pertussis*, responsible of a highly contagious respiratory infectious disease,
114 possesses a filamentous hemagglutinin that promotes strong attachment of the
115 bacteria to host cells [38–40]. The attachment of *Plasmodium falciparum* merozoites
116 to erythrocytes, leading to invasion, is mediated by a parasite adhesin called EBA-175
117 [41,42]. Regarding viruses, the influenza virus also possesses hemagglutinin involved
118 in binding to sialic acids at the host cell surface. Endocytosis is a prerequisite before
119 the fusion of the viral envelope with host endosomal membrane followed by the uptake
120 of the virus into the cell [42–44]. All these data argue for an important role of pathogen
121 adherence prior to host cell invasion.

122 In this study, by using bioinformatic tools and preliminary experimental data, we
123 selected some proteins predicted to be extracellular and possessing carbohydrate-
124 binding domains that constitute good candidates for host cell adherence in *E. cuniculi*,
125 parasite of mammals including humans and *Anncaliia algerae*, parasite of humans and

126 mosquitoes. Thus, two Ricin B Lectin-Like (RBLL) proteins from *A. algerae*, AaRBLL-
127 1 and AaRBLL-2 and one from *E. cuniculi*, EcRBLL-1 were selected, partly on the basis
128 of the occurrence of a Ricin-B Lectin domain in their amino acid sequences.
129 Recombinant proteins were produced in bacteria or yeast in order to obtain specific
130 antibodies that were used to localize these proteins on the microsporidian spore.
131 Recombinant proteins and mouse polyclonal antibodies were then used to evaluate
132 the involvement of microsporidian RBLL proteins in adherence and infection using
133 adherence inhibition assays.

134

135 **2. Materials and methods**

136 **2.1 Cells, reagents and parasite culture**

137 Human Fetal Fibroblasts (MRC-5) cells (ATCC CCL-171) and Human Foreskin
138 Fibroblasts (HFF) cells (ATCC SCRC-1041) were cultured in Minimum Essential
139 Medium Eagle (MEM) (Invitrogen) supplemented with 10% inactivated Fetal Bovine
140 Serum (FBS) (Invitrogen), 2 mM glutamine (Gibco), 2.5 µg mL⁻¹ amphotericin B
141 (Dutscher), 100 µg mL⁻¹ kanamycin (Pan Biotech), 25 µg mL⁻¹ gentamicin (Gibco) at
142 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

143 *E. cuniculi* and *A. algerae* cultures were maintained in Madin-Darby Canine Kidney
144 (MDCK) cells (ATCC CCL-34) and Rabbit kidney (RK13) cells (ATCC CCL-37)
145 respectively. Confluent monolayers of cells were infected with 5x10⁵ spores of either
146 *E. cuniculi* or *A. algerae* in T75 flasks. The spores were collected from culture media,
147 purified by passing through 3 µm size filters (Millipore) for *E. cuniculi* and washed with
148 sterile water for *A. algerae* to remove host cells. Spores were then concentrated at
149 1600 x g, and stored in phosphate buffered saline (PBS) at 4°C. Spores used in these
150 experiments were counted using a Kova-cell chamber.

151

152 **2.2 Bioinformatics analysis**

153 *E. cuniculi* and *A. algerae* local and online protein databases
154 (<https://microsporidiadb.org/micro/>) (version June 2020) were screened using cellular
155 localization prediction tools. The selection of proteins with a potential localization at
156 cell surface was based on the presence of a predicted signal peptide (SignalP
157 algorithm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)) and/or subcellular localization
158 (WoLF PSORT algorithm (<https://wolfpsort.hgc.jp>) (version June 2020). Protein motif
159 prediction (carbohydrate binding domain) was carried out using ExPaSy proteomic
160 tools such as InterPro (<http://www.expasy.org/tools/>). Prediction of the structure and
161 function of the selected proteins was done using free software such as Phyre2 tool
162 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>). 3D model were
163 obtained using Ezmol tool (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/>).

164 However, AaRBLL-1 was not selected by informatics tools as no peptide signal was
165 detected and no extracellular location was predicted. Indeed, this protein was obtained
166 from a shaving approach consisting of surface protein recovering using soft SDS lysis
167 of spore combining with mass spectrometry analysis (Prybylski *et al.*, *in preparation*).

168

169 **2.3 Recombinant RBLL protein production and purification**

170 The recombinant proteins were produced in *Pichia pastoris* (strain KM71H, Invitrogen)
171 for EcRBLL-1 and in *Escherichia coli* BL21-λDE3 (PROMEGA) for AaRBLL-1
172 and AaRBLL-2.

173 The EcRBLL-1 gene (Gene Bank Accession N°: ECU08_1730) was PCR-amplified
174 from *E. cuniculi* genomic DNA using the forward primer 5'-
175 gggaattcGAAAATTCCTCATTAACAATAAC-3' and the reverse primer 5'-

176 ggctcgagccgcgTAAACAATGAGACAGTCACTA-3', containing respectively *EcoRI* and
177 *SacII* restriction sites (underlined). After digestion, the purified PCR product was
178 inserted into the corresponding sites of pPICZ α -A vector (Invitrogen) and transformed
179 into *E.coli* (DH5- α). Plasmids from positive clones were purified and sequenced. After
180 linearization with the *SacI* enzyme, plasmids were used to transform *P. pastoris*
181 *KMH71* using EasySelect Pichia kit (Invitrogen), and recombinant yeasts were
182 selected on YPDS- agar plates containing zeocin antibiotic (250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The culture
183 and production steps were carried out according to manufacturer recommendations
184 (Invitrogen). Briefly, recombinant yeasts were cultivated at 30°C in BMGY medium (1%
185 yeast extract; 2% peptone; 100 mM of potassium phosphate, pH 6.0; 1.34% YNB
186 (Yeast Nitrogen Base); $4\times 10^{-5}\%$ biotin; 1% glycerol) during 16h until reaching ~ 4
187 OD_{600} . BMGY medium was then removed by centrifugation, and yeast cells were re-
188 suspended in the induction medium, BMMY (identical to BMGY except that glycerol
189 was replaced with methanol 0.5%). The induction of the recombinant protein
190 expression was carried out for 72h with methanol addition every 24h. The supernatant
191 of the culture was collected by centrifugation at 4000 $\times g$ for 10 min, and the volume
192 was reduced to 20 ml on 3 kDa ultrafiltration membrane using Stirred Ultrafiltration Cell
193 (Millipore®), to concentrate the recombinant proteins. Proteins were then purified by
194 Ion Metal Chromatography Affinity (IMAC) (Protino® Ni-NTA, Macherey-Nagel®), and
195 analyzed by SDS-PAGE (12%, wt/vol.).

196 In support of GenBank sequence database related to *AaRBLL-1* (GenBank Accession
197 N°: MZ547653) and *AaRBLL-2* (GenBank Accession N°: MZ547654), the genes were
198 obtained by PCR amplification from *A. algerae* genomic DNA, using the primers 5'-
199 gggggatccATGCTGATATTTTTCTTAAGTATC-3' and 5'-
200 gggctcgagTTACATTCCCATTTGATTTAAAAACAT-3' for *AaRBLL-1* and 5'-

201 gggggatccATGCTGATATTTTTCTTAAGTATC-3' and 5'-
202 gggctcgagTTACATTCCCATTGATTTAAAAACAT-3' for *AaRBLL-2*. The *Bam*HI and
203 *Xho*I restriction sites (underlined) were added at the 5' end of both primers, allowing
204 the insertion of PCR products into the pET28a plasmid (Novagen) to generate pET28a-
205 *AaRBLL-1* and pET28a-*AaRBLL-2*. After transformation of *E. coli* DH5 α strain and
206 selection on LB-agar (kanamycin 30 μ g.mL⁻¹) plates, plasmid DNA of positive clones
207 were purified and sequenced, and then transformed into *E. coli* BL21- λ DE3 strain for
208 the expression of recombinant proteins. The expression was induced with
209 IsopropylThioGalactoside (IPTG) 1mM for 4h from a culture in exponential growth
210 (OD₆₀₀ ~ 0.4 - 0.6). Recombinant proteins were then purified by Ion Metal
211 Chromatography Affinity (IMAC) (Protino® Ni-NTA, Macherey-Nagel®), and analyzed
212 by SDS-PAGE (12%, wt/vol.).

213

214 **2.4 Polyclonal antibody production and immunoblotting**

215 Polyclonal antibodies against each recombinant *EcRBLL-1* (*recEcRBLL-1*); *AaRBLL-*
216 *1* (*recAaRBLL-1*) and *AaRBLL-2* (*recAaRBLL-2*) protein were obtained after
217 immunization of BALB/c mice. Mice were initially immunized with 100 μ g of each
218 purified protein emulsified with Freund's complete adjuvant (Sigma) in the peritoneum
219 followed by four other injections of each purified protein emulsified with Freund's
220 incomplete adjuvant (Sigma). The serum was collected one week after the last injection
221 and stored at -20°C. For immunoblotting, *E. cuniculi* and *A. algerae* proteins were
222 extracted as follows: spores in Laemmli buffer (10% Glycerol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-
223 Base pH 6.8, 0.0025% bromophenol blue, 100 mM DTT) were subjected to 10 cycles
224 of freezing-thawing cycles followed by 15 min of boiling. The sample was centrifuged
225 2 min at 14 000 xg . Total protein extract was collected by centrifugation at 14 000 xg

226 for 5 min. Proteins were then separated by SDS-PAGE 12%, transferred onto
227 polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck), and blocked with a solution of
228 PBS-milk 5% overnight at 4°C. Membranes were incubated with either anti-*Ec*RBLL-
229 1, anti-*Aa*RBLL-1 and anti-*Aa*RBLL-2 (1:200 dilution) for 2 hours at 37°C. The
230 secondary antibody, a goat anti-mouse IgG (H+L), HRP Conjugate (Promega) was
231 incubated for 1 hour at RT. Membranes were revealed by chemiluminescence using
232 the Clarity Western ECL Substrate kit (Biorad).

233

234 **2.5 Immunolocalization assays (IFA) on purified spores of *E. cuniculi* and *A.*** 235 ***algerae***

236 Purified spores were fixed in PFA 4% for 20 minutes at 4°C. Purified spores were
237 incubated with glycine 0.1M for 5 min at RT. After a quick wash with PBS, a saturation
238 step was performed with a blocking solution (PBS-bovine albumin serum (BSA) 1%,
239 (wt/vol)) for one hour at RT.

240 For purified *E. cuniculi* spores, a first immunolabeling was done by incubating the
241 samples with a 1:100 dilution of anti-*Ec*RBLL-1 mouse polyclonal antibodies for two
242 hours at RT, then washed with PBS and incubated for an additional hour at RT with a
243 1:1000 dilution of mouse IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor 555 conjugate
244 (Invitrogen). In a second time, the samples were incubated with a 1:500 dilution of anti-
245 *E. cuniculi* rabbit serum (from a naturally infected rabbit) for one hour at RT, then
246 washed with PBS and incubated for an additional hour at RT with a 1:1000 dilution of
247 rabbit IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen).

248 For purified *A. algerae* spores, samples were incubated with antibodies against
249 *Aa*RBLL-1 or *Aa*RBLL-2 at 1:100 for 2 hours at RT. Samples were then washed with

250 PBS and incubated for an hour at RT with a 1:1000 dilution of mouse IgG (H+L)
251 secondary antibody, Alexa Fluor 555 conjugate.

252 A staining of the genetic material of spores was performed with DAPI (4',6-diamidino-
253 2-phenylindole) at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for 5 min at RT. Coverslips were mounted with Prolong
254 Diamond Antifade Mounting (Invitrogen) and preparations were then observed with an
255 epifluorescence microscope, magnification factor x 100 (LEICA DM IRB).

256

257 **2.6 Cytotoxic assay**

258 Human Fibroblast (MRC-5 or HFF) cells were seeded in 96-well-microplates at a
259 density of 2×10^4 cells/well in MEM medium supplemented with 10% inactivated FBS,
260 2 mM glutamine, 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ amphotericin B, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
261 gentamicin at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere for approximately 48 h to reach
262 confluence. The medium was then replaced by fresh culture medium containing
263 different concentrations of the recombinant proteins recEcRBLL-1 and recAaRBLL-2
264 (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), or anti-EcRBLL-1, anti-AaRBLL-1 and anti-AaRBLL-2 mouse polyclonal
265 antibodies to evaluate their cytotoxicity on human cells. Negative control (cells with
266 culture medium only) and positive control (cells with 20% DMSO diluted in medium)
267 were also added to each 96-well culture plate. Each condition was tested in triplicate.
268 After incubation for 7 days at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, the medium
269 was removed and replaced by tetrazolium dye MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
270 diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich) at a 1:10 dilution in culture medium.
271 Microplates were then incubated at 37°C for 2 h under slight shaking. The dye and
272 medium were replaced by a solution of DMSO:Isopropanol (1/1, v/v) and incubated for
273 5 min at room temperature to dissolve the protein-bound dye for OD at 550 nm using
274 a microplate reader (Multiskan FC, ThermoScientific). The cytotoxic effect of the

275 recombinant proteins and polyclonal antibodies on host cells was analyzed by
276 comparing to the negative control corresponding to 100% cell growth using a Wilcox
277 test a non-parametric test with R studio software. Differences were considered
278 significant if the p value was <0.05 .

279

280 **2.7 *In vitro* growth inhibition assays**

281 The potential involvement of *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* and *AaRBLL-2* proteins in the
282 infection process was addressed through inhibition tests, aiming to block the
283 interaction between these proteins and their interactants at host cell surface, using
284 antibodies as blocking agents or recombinant proteins as competitors.

285

286 **2.7.1 Effects of Anti-*EcRBLL-1* and *recEcRBLL-1***

287 After validation of non-cytotoxic effect of *recEcRBLL-1* and anti-*EcRBLL-1* antibodies,
288 the anti-microsporidian assay was performed using non-cytotoxic concentrations of the
289 *recEcRBLL-1* ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) and anti-*EcRBLL-1* antibodies (1:100) on *E. cuniculi*-
290 infected MRC-5 cells. Host cells were first seeded in 48 well culture plates at a density
291 of 4×10^4 cells/well in the same culture medium described above. Cells were allowed
292 to grow at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Triplicates wells per condition
293 were created on the plate: (i) uninfected control group, (ii) infected control group, (iii)
294 infected group exposed to the diluted *recEcRBLL-1* and (iv) infected group exposed to
295 the diluted anti-*EcRBLL-1*. The uninfected control group in each plate allowed
296 measuring the background signal in the ELISA assay. When cells reached confluence,
297 the medium was replaced by fresh culture medium containing or not *recEcRBLL-1* for
298 one hour at 37°C . Meanwhile, *E. cuniculi* spores were pretreated with anti-*EcRBLL-1*
299 antibodies and incubated at 37°C for 1 h. After the incubation time, 2×10^5 spores of

300 *E. cuniculi* were added to the pretreated cells with recEcRBLL-1 for an hour. Pretreated
301 spores were also put in contact with host cells for one hour. Culture medium was
302 removed, cells were gently rinsed with PBS and fresh culture medium was added to
303 each well. After 7 days, the culture medium was removed and cells were fixed with
304 methanol at -20°C for 30 min. Methanol was removed and after a quick wash of the
305 cells with PBS, cells were saturated with 100 mM Tris-2% BSA (Sigma-Aldrich)
306 overnight. Then cells were incubated at 37°C for 1 h with an anti-*E. cuniculi* rabbit
307 serum (from naturally infected rabbit) diluted at 1:1000 in an antibody dilution buffer
308 (10 mM Tris pH = 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 0.2% BSA Sigma-Aldrich). Cells
309 were washed five times with washing buffer (10 mM Tris pH = 8, 0.05% Tween 20) and
310 incubated at 37°C for 1h with an anti-rabbit antibody (Anti-Rabbit IgG AP Conjugate,
311 Promega) diluted at 1:10 000 in antibody dilution buffer. The cells were washed five
312 times with washing buffer and the substrate solution (0.1 mM 4-méthylumbelliferyl
313 phosphate (MUP), 1 mM MgCl₂, 50 mM Na₂CO₃ pH = 9.8; Sigma-Aldrich) was added.
314 After incubation at 37°C for 30 min under slight shaking, the reaction was stopped by
315 the addition of 3 M NaOH and the fluorescence was measured with a Fluoroskan
316 Ascent FL, using excitation and detection wavelengths of 355 nm and 460 nm,
317 respectively.

318

319 **2.7.2 Effects of Anti-AaRBLL-1, anti-AaRBLL-2 and recAaRBLL-2**

320 HFF cells were seeded on coverslips at a density of 10⁵ cells per well in 24 well culture
321 plates in the same culture medium described above.

322 Once confluence was reached, on one side cells were pretreated with recAaRBLL-2
323 (25 µg mL⁻¹) for one hour at 30°C in culture medium. After the incubation time, cells
324 were put in contact with 3 x 10⁵ spores of *A. algerae* for one hour. Culture medium was

325 then removed, cells were gently rinsed with PBS and fresh culture medium was added
326 to each well.

327 On the other side, 3×10^5 spores were pretreated with either anti-AaRBLL-1 or anti-
328 AaRBLL-2 antibodies (1:100) for an hour at 30°C. Pretreated spores were then put in
329 contact with host cells for an hour. Culture medium was removed, cells were gently
330 rinsed with PBS and fresh culture medium was added to each well. Triplicate wells
331 were done on each plate.

332 After 7 days of incubation at 30°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, the culture
333 medium was removed and cells were fixed in PFA 4% at 4°C for 20 min. The
334 observation and quantification of infectious foci was done using fluorescence *in situ*
335 hybridization (FISH) method.

336 A post fixation was done in 50% ethanol for 15 min followed by ethanol 100M for 10
337 min. After two wash of 15 min in PBS, a pre-hybridization was done in a solution PBS:
338 hybridization buffer (TH) (20 mM Tris-HCl pH 7.8; 0.9 M NaCl; 1X Denhardt's solution
339 (VWR Life Science) and 0.01% SDS for 15 min at room temperature, followed by a 15
340 min incubation in TH solution. A last incubation in TH solution was done for 20 min at
341 45°C. TH solution was replaced by the hybridization solution containing 5'-Cy3-labeled
342 probe (Eurofins) GTACTATCCAGTCCGCTC-3' (ANN01-Cy3) (50 μM ANN01-Cy3
343 probe and 0.5 μM of warmed TH at 45°C). Plates were placed at 45°C for 3 h. After
344 this incubation, the hybridization solution was removed and 2 30 min-washes with
345 warmed TH solution were done. TH solution was replaced with PBS. DNA was stained
346 with DAPI for 30 min. Coverslips were mounted with Prolong Diamond Antifade
347 Mounting. The percentage of infected cells was assessed by counting cell nuclei and
348 infectious foci in 10 randomly chosen fields from each coverslip.

349

EcRBL-1 (ECU08_1730)

MMLIALCMMGVVLGFKITAKNNEGKFLINNNGKAVMSESGKPAEFKTDVSPGVKIVTDK
NTNKVLDIEGSKTNLIFYSRHGQENQRFTFVGEGDVIYIKSGDGCLEYSNGKMYRTTC
SAKDQQRFKIVYSLGDPGYKPPVEVPVPAAPENNPSTQDLLESSPSSQALSGSANAHAPPQV
LIFNGKKS~~HR~~**SH**SWHHNPNYEDESSIYGDSCLIV

AaRBL-1 (MZ547653)

MLIFFLSIKTLLIKVQNNLGFVAFDGTLYLQTPNIKEASEFEFIQNENGIDFYIQLAKTN
LVWDYPRQDFGGNIILYRFHGGSNQKWRLIFNKLGS LNIVNNDRRVVYNEYTNLFTTKKI
NEYMNGEEGFVIFDEKMHYFDFFNHVPVQNI MNVPSIEHLLPLGKELRKPSPNIGGP**SSA**
PPIMPLGPVNMHEQMFLNQMG

AaRBL-2 (MZ547654)

MTLTKYIIILSLFINYSISEFVIQERSTGRYLSSKNMGVVALVEDIRQASPYIIIRAVGNP
IDMAITDKKSKLALDFAADGPD LISYSYSSSTNQLFKLNLDENGYWQIIQGT~~E~~KYLYYDP
ETSKLKGGPYDVSKTVGFMLFADDGIGPFPVMKGAKLP**SP**IPPVYPEAPLLPENEASFAP
K*

Figure 1 : Protein sequences of *EcRBL-1*, *AaRBL-1*, *AaRBL-2*. The putative carbohydrate binding Ricin B Lectin superfamily (IPR035992) are indicated in blue. Peptide signals obtained with SignalP for *EcRBL-1* and *AaRBL-2* are underlined; O-glycosylation potential sites are indicated in bold and N-glycosylation in bold underlined.

350 **2.7.4 Growth inhibition analysis**

351 The effects of rec*Ec*RBLL-1 and rec*Aa*RBLL-2 or anti-*Ec*RBLL-1; anti-*Aa*RBLL-1 and
352 anti-*Aa*RBLL-2 polyclonal antibodies on the infection of host cells by either *E. cuniculi*
353 or *A. algerae* were analyzed by comparing to the infected control corresponding to
354 100% parasite growth of each independent experiment using a Wilcox test, a non-
355 parametric test with R studio software. For each independent experiment, infected
356 control was compared to each condition in order to determine if a significant difference
357 was observed. Differences were considered significant if the p value was <0.05 and
358 highly significant if the p value was <0.001 .

359


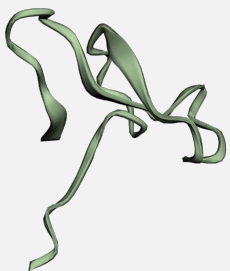

360 **3. Results**

361 **3.1 Bioinformatic characterization of *Ec*RBLL-1, *Aa*RBLL-1 and *Aa*RBLL-2**

362 Our strategy allows us to identify in *E. cuniculi* a hypothetical protein, composed of 214
363 amino acids with a predicted molecular weight (MW) of 23.4 kDa. The *Ec*RBLL-1
364 protein displayed a significant score of extracellular prediction, associated with the
365 identification of a cleavage site between the amino acids A19 and K20 related to a
366 probable peptide signal (Fig.1). A putative carbohydrate binding domain related to
367 RBLL (Ricin-B lectin like) was identified in the region extending from the amino acids
368 aa54 to aa133 (Fig. 1). The glycosylation pattern of *Ec*RBLL-1 has been analyzed and
369 has revealed the prediction of one and six potential sites for *N*-glycosylation and *O*-
370 glycosylation respectively (Fig. 1).

371 In the same way, two hypothetical proteins, named *Aa*RBLL-1 (Accession Number
372 MZ547653) and *Aa*RBLL-2 (Accession Number MZ547654), were identified in *A.*
373 *algerae*. *Aa*RBLL-1 and *Aa*RBLL-2 are composed of 202 and 181 amino acids
374 respectively, with a deduced molecular weight of 23.4 kDa for *Aa*RBLL-1 and 20.2 kDa

Table 1 : Structure and functional analysis of the RBLL proteins obtained with Phyre2 online software.

Proteins	3D model	Secondary structure	Superfamily / family /PDB molecule	Confidence	% identity
<i>EcRBLL-1</i> (ECU08_1730)		α helix (8%) β strand (41%)	β -glucanase	98.8	20
			Ricin-B-like lectin	98.6	17
			Sugar binding protein	98.4	16
			Hemagglutinin component	98.2	13
<i>AaRBLL-1</i> (MZ547653)		α helix (18%) β strand (47%)	Ricin-B-like lectin	96.1	32
			Agglutinin-1 b chain	95.5	20
			Hemagglutinin component	95.3	23
			β -glucanase	93.5	38
<i>AaRBLL-2</i> (MZ547654)		α helix (2%) β strand (50%)	β -glucanase	91.5	21
			Ricin-B-like lectin	91.4	24
			Hemagglutinin component	85.2	23
			Agglutinin	81.4	20

According to this algorithm, the likely accuracy of the model is determined by the percentage identity between our sequences and templates. Moreover, a low sequence identity (<15%) model can be useful as long as the confidence is high. A match with a confidence >90%, indicates that the protein adopts the overall fold shown in the 3D model.

375 for AaRBLL-2. No signal peptide was predicted for AaRBLL-1 whereas AaRBLL-2
376 displayed a peptide signal using the Microsporidia DB SignalP tool (version June
377 2020). WoLF PSORT online software predicted a nuclear and extracellular localization
378 for AaRBLL-1 and AaRBLL-2 respectively. Despite the results obtained for AaRBLL-
379 1, this protein was selected according to a shaving approach, aiming at identifying *A.*
380 *algerae* surface proteins (Prybylski et al., in preparation). The search of carbohydrate
381 binding domain highlighted a RBLL domain for both AaRBLL-1 and AaRBLL-2 protein,
382 localized between aa38 and aa102 and between aa65 and aa120, respectively (Fig.
383 1). As for *A. algerae*, putative glycosylation sites have been predicted including only
384 three O-glycosylation sites for AaRBLL-1, and one N-glycosylation and one O-
385 glycosylation site for AaRBLL-2.

386 The similarity between the three RBLL proteins was analyzed by sequence alignment
387 which revealed no significant homology between the protein sequences, suggesting
388 their membership to functionally distinct proteins. Hence, the identification of a RBLL
389 would not involve large amino acids sequence conservation, but might be associated
390 to specific secondary and tertiary structure organization. This hypothesis was
391 confirmed by modeling 3D structure using Phyre2 software. The three RBLL were
392 associated to similar 3D models of agglutinin and β -glucanase, and were shown to
393 comprise in majority of β -strands and a weak percentage of α -helix that are frequently
394 found in lectins (Table 1).

395

396 **3.2 Polar tube and spore wall localization of EcRBLL-1, AaRBLL-1 and AaRBLL-** 397 **2**

398 For immunolocalization experiments, polyclonal antibodies against EcRBLL-1,
399 AaRBLL-1 and AaRBLL-2 proteins were generated by immunization of mice with

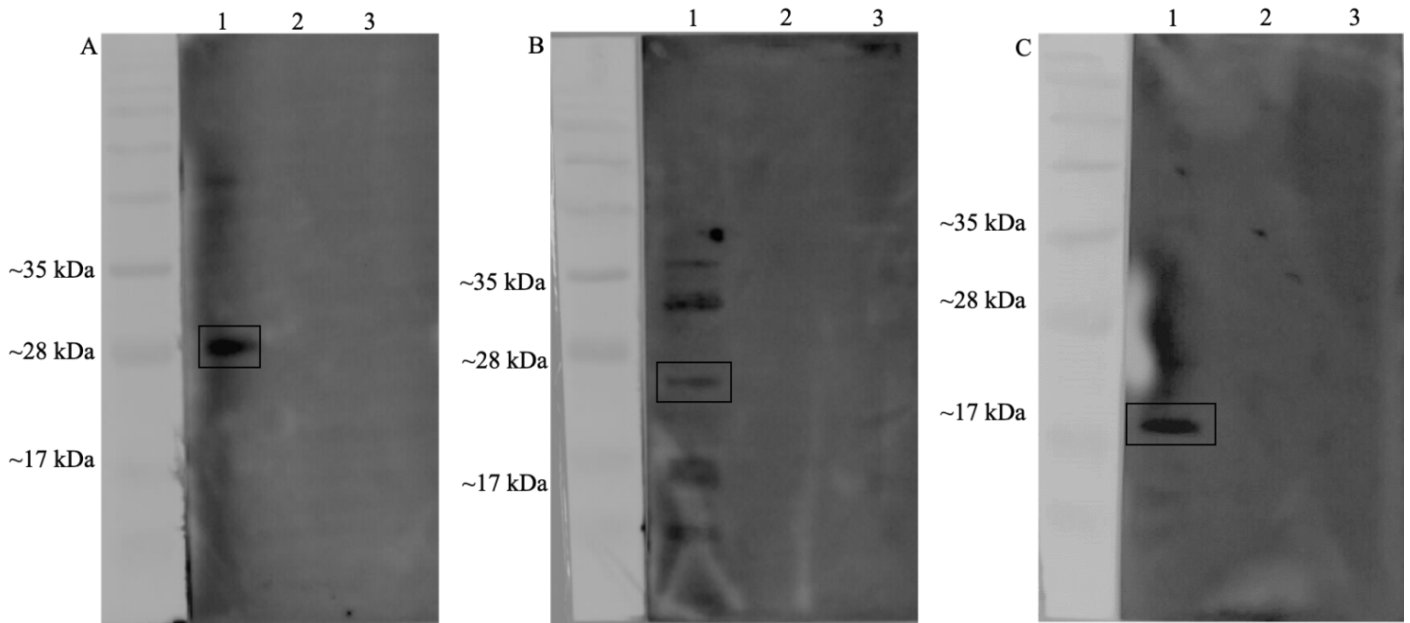


Figure 2 : Western Blot analysis. A) Anti- *EcRBLL-1* antibody. In lane 1, total *E. cuniculi* spore protein extract; lane 2, total host cell (MRC5) protein extract; lane 3, total *A. algerae* spore protein extract. A signal was obtained in lane 1 around 28 kDa. **B) Anti- *AaRBLL-1* antibody and C) Anti- *AaRBLL-2* antibody.** In lane 1, total *A. algerae* spore protein extract; lane 2, total host cell (HFF) protein extract; lane 3, total *E. cuniculi* spore protein extract. **B)** Three bands were obtained in lane 1, one around 25 kDa and two above the expected size and **C)** A single signal was obtained in lane 1 around 20 kDa. No cross reaction was observed between *E. cuniculi* and *A. algerae*.

400 recombinant proteins. The recombinant proteins were systematically performed both
401 in *E. coli* and *P. pastoris* systems, but only the expression system allowing high level
402 of expression and purification was retained. After purification by IMAC, the purified
403 proteins were analyzed in SDS-PAGE, and only single band was revealed with
404 expected sizes of about 20 kDa for recAaRBLL-2 and closed to 23 kDa for both
405 recEcRBLL-1 and recAaRBLL-1. However, as recAaRBLL-1 was insoluble and purified
406 under denaturing conditions, the recombinant protein was only used for antibody
407 production and not as competitor for growth inhibition tests.

408 Polyclonal antibodies specificity was analyzed by Western blot, both on spore proteins
409 extracts and total proteins extracted from host cells, used as negative controls. As
410 shown in figure 2, only a single protein band was detected at about 28 kDa with anti-
411 EcRBLL-1 antibodies in *E. cuniculi* sporal proteins, and close to 25 kDa and 20 kDa
412 with respectively anti-AaRBLL-1 and anti-AaRBLL-2 antibodies for spore proteins from
413 *A. algerae*. However, two extra bands were detected at about 35 kDa and 30 kDa with
414 anti-AaRBLL-1-antibodies that could potentially correspond to other RBL proteins.
415 Indeed, bio-informatics analysis reveals the presence of several RBL proteins in *A.*
416 *algerae* proteome close to these approximate weights (data not shown). Moreover, the
417 fact that the reactive bands sizes do not match the predicted molecular weights 23 kDa
418 for EcRBLL-1 and AaRBLL-2 may be attributed to their post-translational modifications
419 such as glycosylation that was predicted on these proteins. No cross hybridization with
420 each antibody was also observed between spore proteins from *E. cuniculi* and *A.*
421 *algerae*.

422 To investigate the localization of EcRBLL-1 in *E. cuniculi* spores, anti-EcRBLL-1
423 antibodies were used for immunofluorescence analysis (IFA). A first immunolabeling
424 was performed with the anti-EcRBLL-1 mouse polyclonal antibodies followed by a

Anti-*Ec*RBLL-1Anti- *E.cuniculi* rabbit
serum

Merged

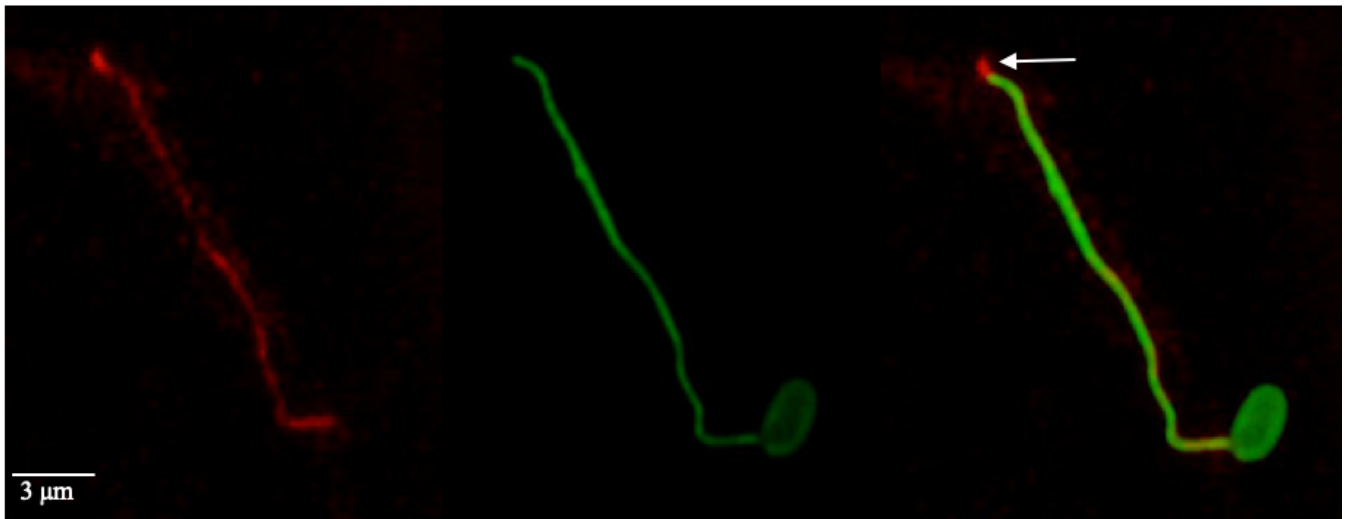


Figure 3: Localization of *Ec*RBLL-1 in *Encephalitozoon cuniculi*. Spores were visualized using a fluorescence microscope after a first incubation with mouse polyclonal antibodies against *Ec*RBLL-1 followed by a second immunolabelling using an anti-*E. cuniculi* rabbit serum (from naturally infected rabbit). Fluorescence labeling demonstrated that the anti- *Ec*RBLL-1 polyclonal antibodies reacted with the polar tube of the spore with an unequal labelling intensity along the polar tube. The anti-*E.cuniculi* rabbit serum reacted as expected with the spore wall as well as the polar tube of mature spore. However, when both labeling were merged, the tip of the polar tube only reacted with the anti- *Ec*RBLL-1 polyclonal antibody (white arrow).

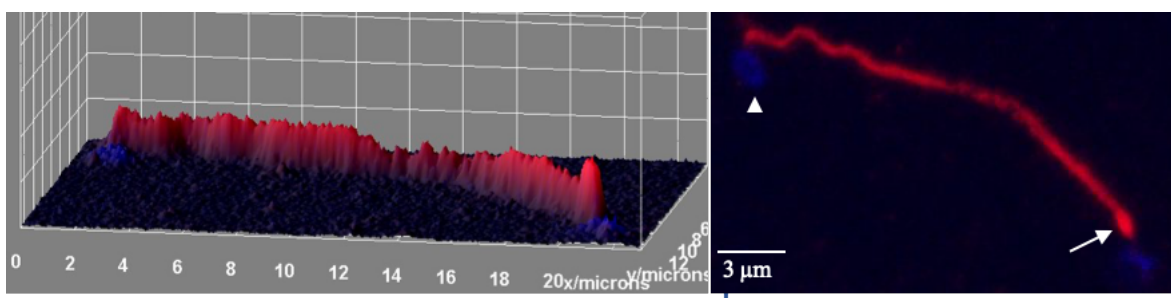


Figure 4: Intensity of pixels of the immuno-localization of *Ec*RBLL-1 in *E. cuniculi*. Spores were visualized using a confocal microscope after incubation with antibodies against *Ec*RBLL-1. Afterwards, a graph of the intensity of pixels from the image was obtained using Fiji ImageJ software to highlight the unequal localization of *Ec*RBLL-1 throughout the polar tube, in particular at the tip of the polar tube (white arrow). The arrowhead shows the labelling of the genetic material of the spore (in the same plane as the PT labeling) using DAPI, indicating that the sporoplasm was not yet transferred through the polar tube.

425 second immunolabeling using an anti-*E. cuniculi* rabbit serum (from naturally infected
426 rabbits). Fluorescence labeling demonstrated that anti-*Ec*RBLL-1 polyclonal
427 antibodies reacted with the extruded polar tube of the spore (Fig. 3). As expected the
428 anti-*Ec* rabbit serum, labeled the whole extruded polar tube as well as the spore wall
429 of mature spores. Interestingly, the merge of anti-*Ec* rabbit serum and anti-*Ec*RBLL-1
430 fluorescences highlighted a define region at the tip of the polar tube only labeled with
431 the anti-*Ec*RBLL-1 polyclonal antibodies. Furthermore, the quantification of the anti-
432 *Ec*RBLL-1 signal intensity, confirmed the heterogeneous intensity of labeling
433 throughout the polar tube, with a higher intensity localized at the tip of the polar tube
434 (Fig. 4). Localizations of both *Aa*RBLL-1 and *Aa*RBLL-2 in *A. algerae* spores were also
435 analyzed by IFA using anti-*Aa*RBLL-1 and anti-*Aa*RBLL-2 polyclonal antibodies. Both
436 *Aa*RBLL-1 and *Aa*RBLL-2 were detected on the spore wall and the polar tube.
437 However, the labelling of the spore wall was more distinct with anti-*Aa*RBLL-2 than
438 with anti-*Aa*RBLL-1 (Fig. 5 and 6).

439

440 **3.3 Decrease of adherence and infection using recombinant proteins** 441 **rec*Ec*RBLL-1 and rec*Aa*RBLL-2, and anti-*Ec*RBLL-1, anti-*Aa*RBLL-1, anti-** 442 ***Aa*RBLL-2 antibodies as competitors of spore adherence**

443 Cytotoxic assays were performed in order to determine the cytotoxicity on host cells of
444 the recombinant proteins rec*Ec*RBLL-1 and rec*Aa*RBLL-2 used at 25 µg mL⁻¹ and of the
445 anti-*Ec*RBLL-1, anti-*Aa*RBLL-1 and anti-*Aa*RBLL-2 antibodies used at a dilution of
446 1:100. The recombinant proteins and the antibodies showed non-cytotoxic effect on
447 MRC-5 and HFF cells corresponding to the host cells of *E. cuniculi* and *A. algerae*
448 respectively (Fig. 7).

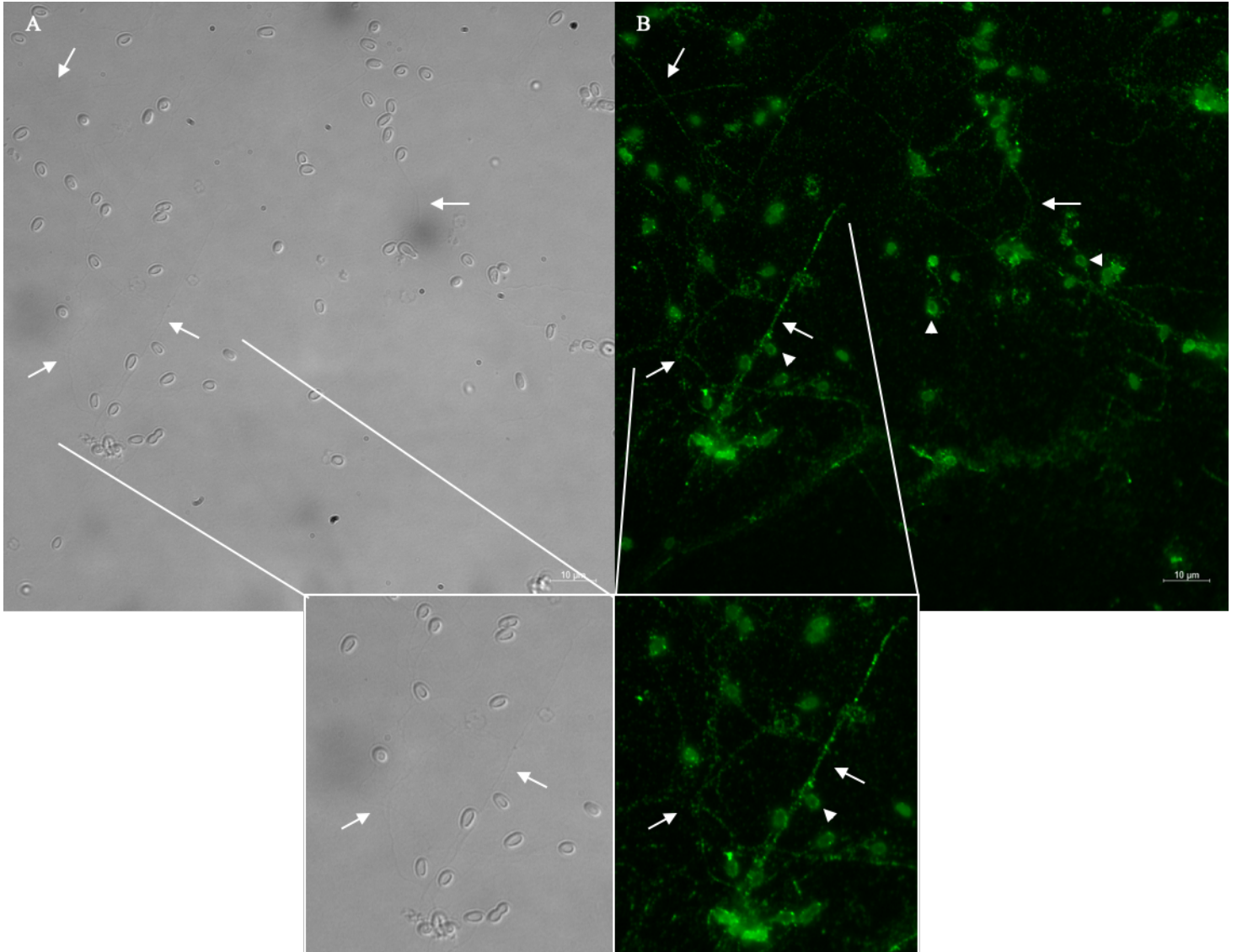


Figure 5 : Localization of AaRBLL-1 in *A. algerae*. Spores were visualized using a fluorescence microscope after a first incubation with antibodies against AaRBLL-1 diluted at 1:100. **A)** Brightfield allows the observation of spores and some of the polar tubes (arrows). **B)** Green fluorescence signals were observed on the spore wall (arrowheads) as well as on the polar tube (arrows).

449 To further analyze the role of *EcRBLL-1* in cell adherence/invasion, antibody and
450 recombinant protein blocking assays were performed. The effect on *E. cuniculi*
451 infection using anti-RBLL-1 antibodies and the recombinant protein was measured by
452 ELISA assay. Incubations of rec*EcRBLL-1* (25 µg ml⁻¹) or anti-*EcRBLL-1* (1:100) with
453 MRC-5 cells showed a decrease in the growth of *E. cuniculi* with inhibition percentages
454 ranging from 12.3% to 23.7% (Fig. 8, Supplementary data Fig. S2 and S3). Indeed,
455 when cells were put in contact with anti-*EcRBLL-1* and were infected with 2 x 10⁵
456 spores, a decrease on average of 12.3% in the growth of the parasite was observed.
457 In parallel, a pretreatment of cells with rec*EcRBLL-1* infected at 2 x 10⁵ spores led to
458 a reduction on average of 23.7% of the parasite growth ($p < 0.001$).

459 The involvement of *AaRBLL-1* and *AaRBLL-2* in spore adherence and infection was
460 analyzed as described previously. The growth inhibition of *A. algerae* was quantified
461 by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method. Cell nuclei and infectious
462 foci in 10 randomly chosen fields from each coverslip were counted in order to assess
463 the percentage of infected cells over total cells. A pre-treatment with anti-*AaRBLL-1*
464 and anti-*AaRBLL-2* polyclonal antibodies or the recombinant protein rec*AaRBLL-2*
465 decreased the proliferation of the parasite on average by 67.6%, 68.5%, and 59.3%
466 respectively (Fig. 9). No pre-treatment with rec*AaRBLL-1* was done as the insoluble
467 recombinant protein was purified in denaturing conditions.

468

469 **4. Discussion**

470 The adherence of intracellular parasites to host cell is the first step of the infection
471 process. In Microsporidia, spore wall and polar tube proteins play an important role in
472 the interaction between spores and host cells [27]. Several proteins that can interact
473 with host cells have already been described in particular in *N. bombycis*,

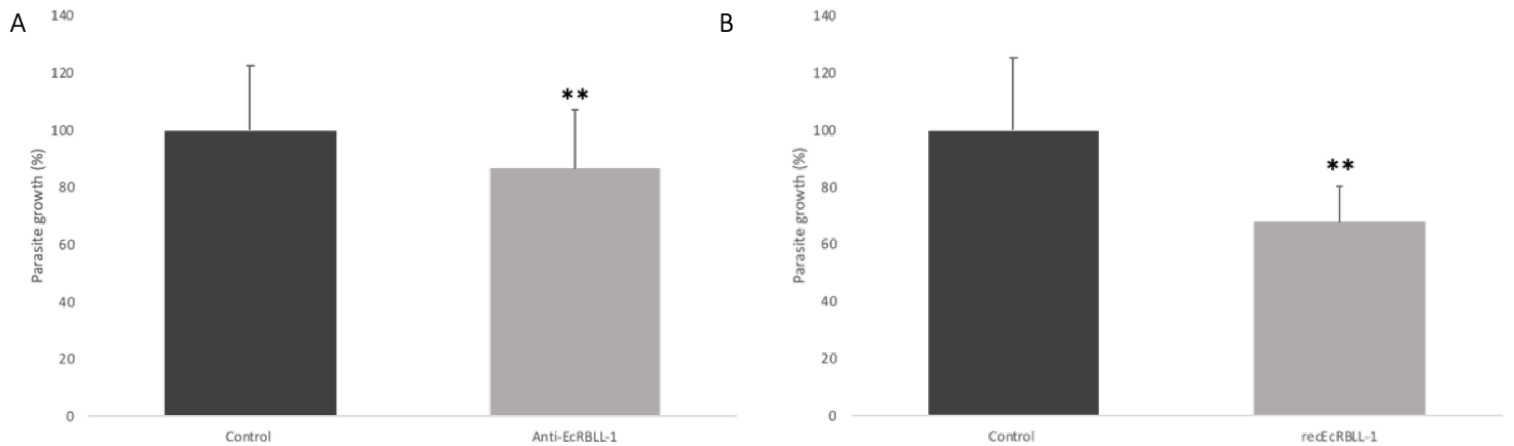


Figure 8: Antimicrosporidian activities of anti- *EcRBLL-1* antibody and *recEcRBLL-1*. Inhibition assay was performed using non-cytotoxic concentrations of the **A)** anti- *EcRBLL-1* antibody at 1:100 and **B)** *recEcRBLL-1* ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) on *E. cuniculi*-infected MRC-5 cells. Parasite proliferation was measured 7 days post-infection. **A)** and **B)** each represent only one independent experiment from two **A)** and five **B)** replicates. Each condition was done in triplicate. Parasite proliferation was analyzed by comparing treated conditions to the infected untreated control using a Wilcox test. Differences were considered significant if the p value was < 0.001 (*). **A)** A decrease on average of 12.3% in the growth of the parasite was observed when cells were infected with 2×10^5 spores pre-treated with anti-*EcRBLL-1*. **B)** A pre-treatment of MRC-5 cells was done with $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ of *recEcRBLL-1* followed by an infection with 2×10^5 spores. A reduction on average of 23.7% of parasite growth was observed.

474 *Encephalitozoon spp.*, and *A. locustae* [23–28]. In the present study, candidate
475 proteins from *E. cuniculi* and *A. algerae* were selected based on the prediction on
476 several motifs such as signal peptide and a Ricin-B-lectin like domain.
477 The results of subcellular localization and glycosylation site prediction showed that
478 *EcRBL-1* and *AaRBL-2* are potential secreted proteins and that all three proteins
479 may bind to carbohydrates. However, only *AaRBL-1* does not possess a signal
480 peptide that could be explained by the fact that the algorithms used (WoLF PSORT
481 and SignalP) have been set up on genetics models which are not completely adapted
482 to Microsporidia. In the way, the protein SWP12 from *N. bombycis* was shown to be
483 present at the spore coat by IFA even though no signal peptide was predicted [45,46].
484 The three selected proteins possess a Ricin-B-lectin domain known to be important in
485 parasite adherence and infection in Microsporidia [32,33]. The analysis of RBL proteins
486 in microsporidian species revealed a large heterogeneity in sequences but also no
487 significant analogy between the protein sequences found within a same species.
488 However, the presence of common structures, in particular agglutinin and β -glucanase,
489 in the RBL proteins, could be linked to the conservation of the function of
490 carbohydrate binding as exemplified by the 3D prediction model (Table 1). The
491 comparison of *A. algerae* and *E. cuniculi* proteomes revealed a greater number of RBL
492 proteins in *A. algerae* proteome (~17 for *A. algerae* versus 6 for *E. cuniculi*). The RBL
493 protein encoding genes are found in other microsporidian species, *N. ceranae* and *S.*
494 *lophii*, respectively parasites of honeybees and monkfish and are organized as clusters
495 in genome sequences. It is also the case for *E. cuniculi* as RBL genes are found in
496 syntenic blocks including our *EcRBL-1* gene [32]. The low size of *A. algerae* genome
497 contigs did not allowed us to analyze RBL gene synteny in this genome. Campbell et
498 al., 2013 [32] hypothesized that RBL paralogs have arisen from duplication in each

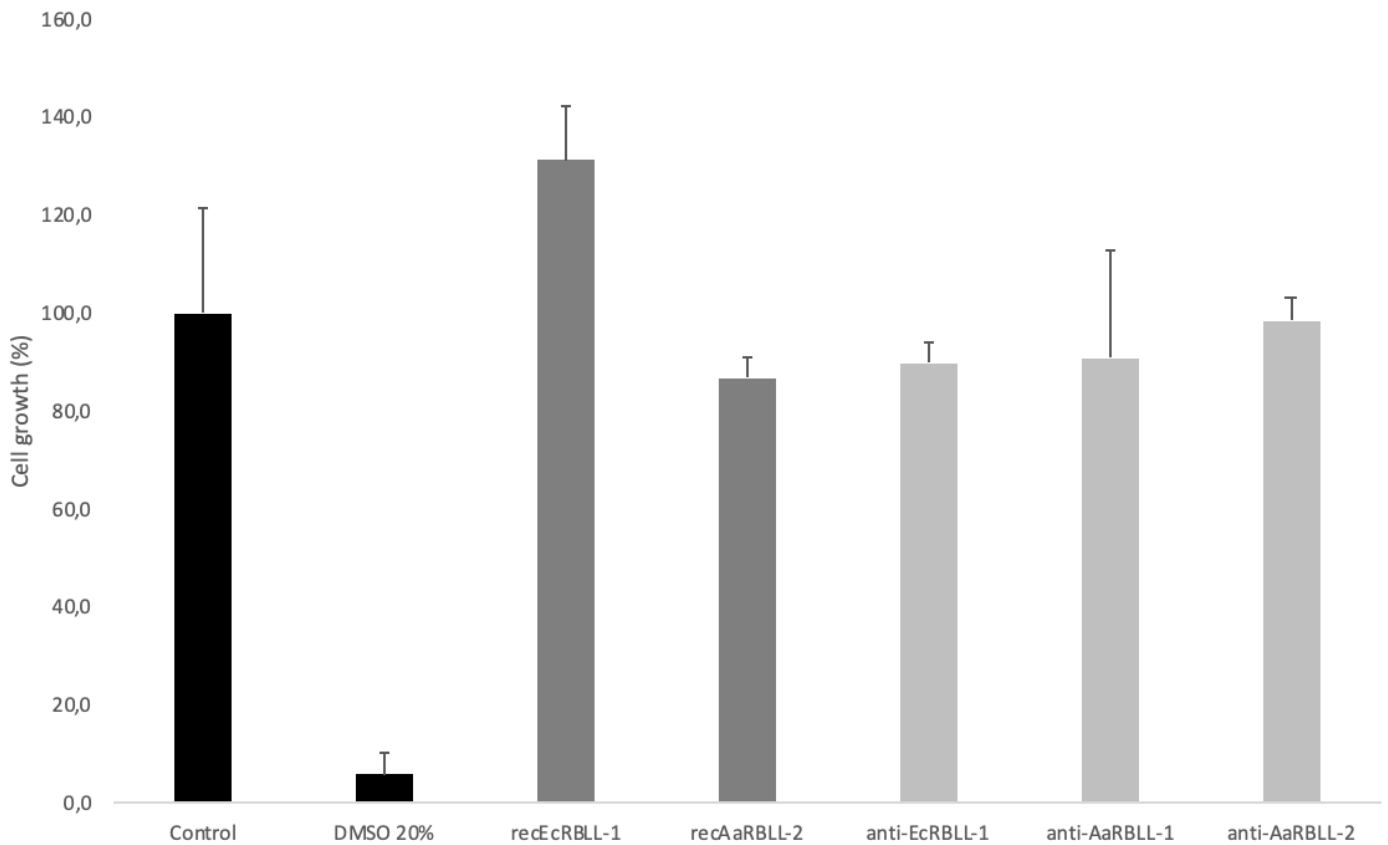


Figure 7: Cytotoxic effect of recombinant proteins and antibodies on Human Fibroblasts.

Once host cells arrived at confluence, MRC-5 cells were put in contact with either rec*EcRBLL-1* or anti- *EcRBLL-1*. Human Foreskin Fibroblasts (HFF) were put in contact with either rec*AaRBLL-2*, anti-*AaRBLL-1* or anti-*AaRBLL-2*. Recombinant proteins were tested at 25 µg mL⁻¹ and antibodies were diluted at 1:100.

The cytotoxic effect was observed after 7 days of incubation with either recombinant proteins or antibodies with cells. No cytotoxic effect was observed with either the recombinant proteins or the antibodies as no significant difference was observed between control and treated cells (p value = 1). 20% DMSO was used as a positive control of cytotoxicity and the control corresponds to untreated host cells (100% cell growth).

499 species and may have contributed to host adaptation. Hence, this difference in the
500 number of proteins present in *A. algerae* and *E. cuniculi* could be linked to the broad
501 host range of *A. algerae* going from mammals to insects.

502 The results of immunolocalization on *E. cuniculi* and *A. algerae* spores and polar tube
503 demonstrate an heterogenicity of labelling. The difference of localizations of the three
504 proteins (dual localization on polar tube and the spore wall for *A. algerae* and restricted
505 to polar tube for *E. cuniculi*) argues for the fact that they are probably functionally
506 different during the invasion process. The more intensive labeling of *EcRBLL-1* at the
507 tip of polar tube may indicate a role of this protein in the attachment to the host cell
508 membrane before the piercing of the polar tube. They may be also different from the
509 one identified in *N. bombycis* [33] as *NbRBL* was only localized at the spore wall.
510 Despite these differences, they are all involved in the host cell infection, as a significant
511 decrease of *E. cuniculi* and *A. algerae* proliferation was observed after pre-treatments
512 of host cells with recombinant proteins or microsporidian spores with polyclonal anti-
513 RBLL proteins. These results were consistent with previous results observed for
514 *NbRBL* binding to carbohydrates and contributing to spore adherence [33]. Indeed,
515 RBL proteins could be released during spore germination as the spore content is
516 passing through the polar tube. *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* and *AaRBLL-2* could then
517 contribute to the anchoring of the polar tube, by binding to host cells carbohydrates by
518 means of the Ricin-B-Lectin domain. The distance between host cell and spores being
519 shorter for germination, the sporoplasm would be internalized by endocytic mechanism
520 into the host cell (Supplementary data Figure S1).

521 However, *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* and *AaRBLL-2* did not abolish the infection indicating
522 the involvement of other components in the molecular basis of spore adherence. These
523 proteins all possess a Ricin B Lectin region and it has been shown that this lectin

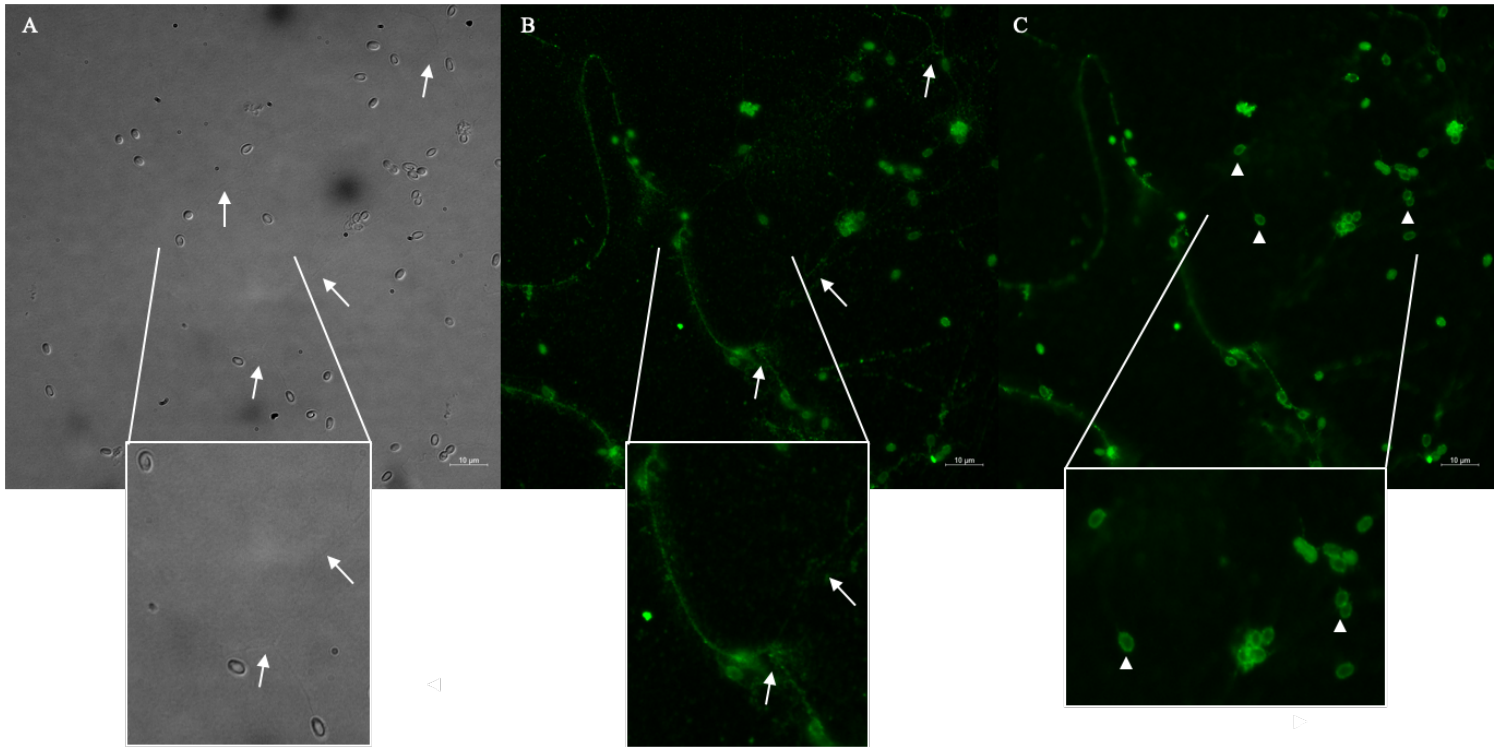


Figure 6 : Localization of *AaRBLL-2* in *A. algaeae*. Purified spores were visualized using a fluorescence microscope after a first incubation with primary antibodies against *AaRBLL-2* diluted at 1:100. **A)** Brightfield allows the observation of spores and some of the polar tubes (arrows). **B)** Green fluorescence signals were observed on polar tubes **C)** as well as on spore wall (arrowheads).

524 interacts with glycolipids or glycoproteins on cell surface [35,36]. Once the lectin has
525 interacted with sugar moieties of host cells, it is presumably imported into endosomes
526 into the cytosol of host cells [34].

527 RBL are described as glycoproteins composed of two chains, a chain A involved in the
528 inhibition of protein synthesis and a chain B (lectin) interacting with glycoproteins and
529 glycolipids at the cell surface [36,47]. Ricin-B Lectins can be involved in different
530 mechanisms such as protein activity inhibition, apoptosis pathways or release of
531 cytokine inflammatory mediators [47]. Several pathogens synthesize lectins often
532 reported to be interacting with glycoconjugates on host cells promoting cell adherence,
533 invasion and colonization of host cells [48–51]. *Entamoeba histolytica* trophozoites, an
534 enteric protozoan parasite, possess a cell surface lectin mediating the adherence of
535 the parasite to host galactose and N-acetyl-D-galactosamine [52,53]. The secreted
536 Microneme (MICs) and rhoptry proteins (ROPs and RONs) of the protozoan parasite,
537 *Toxoplasma gondii* play an important role in host cell recognition, attachment and
538 penetration [54]. Two MICs proteins, MIC1 and MIC4, have lectin domains capable of
539 binding to oligosaccharides with sialic acid and D-galactose in the terminal position,
540 respectively [48,55–58]. However, the molecular mechanism of RBL interaction with
541 host cells is unknown in Microsporidia.

542 To conclude and in order to further understand the infection process, it would be
543 interesting to identify potential cellular receptors targeted by microsporidian RBLLs at
544 the host cell surface using technics allowing the identification of protein-protein
545 interactions such as co-immunoprecipitation or pull-down approaches. In parallel,
546 functional approaches based on RNAi could help to better understand the role of the
547 RBLL proteins in adherence and infection processes in Microsporidia. Huang in 2018
548 [59] demonstrated that *A. algerae* is one of the microsporidian species that possess

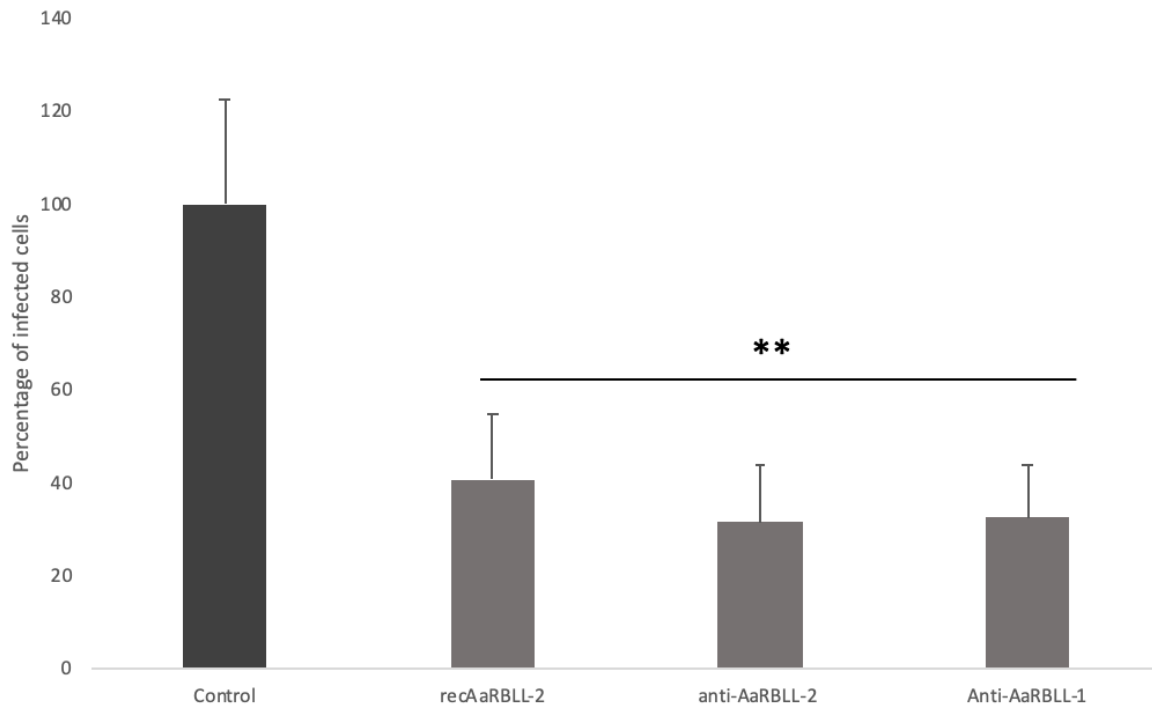


Figure 9: Antimicrosporidian activities of recAaRBLL-2 and anti-AaRBLL-2, anti-AaRBLL-1 polyclonal antibodies. Inhibition assay was done by pre-treating a solution of *A. algerae* spores with each polyclonal antibody at 1:100. After a quick PBS wash, spores were put in contact with HFF cells for 5 days. Parasite proliferation was then visualized by a FISH method. Results originate from 3 independent infection repeated twice. The percentage of infected cells was assessed by counting cell nuclei and infectious foci in 10 randomly chosen fields on three coverslips. Parasite proliferation was analyzed by comparing treated conditions to the infected untreated control using a Wilcox test. Differences were considered significant if the p value was < 0.001 (**). The control group are non-treated infected cells. Compared to the control group, pre-treatments with *recAaRBLL-2*, *anti-AaRBLL-2* and *anti-AaRBLL-1* decreased the parasite proliferation on average by 59.3%, 68.5% and 67.6% respectively.

549 RNA interference (RNAi) genes and could therefore constitute an appropriate model
550 for such an approach. Few studies have investigated the efficiency of using siRNA
551 targeting specific genes in Microsporidia, mainly in *N. ceranae* and *Heterosporis*
552 *saurida*, microsporidian parasites of honeybee and lizardfish respectively [60,61].
553 Finally, our findings contribute to the deciphering of the adherence of *E. cuniculi* and
554 *A. algerae* to host cells, in which *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* and *AaRBLL-2* may play a
555 significant role and could pave the way to develop new therapeutic/prophylactic
556 methods to control these intracellular parasites.

557

558 **Declaration of interest**

559 The authors declare no conflict of interest

560

561 **Acknowledgments**

562 This work has been supported by a grant (MENRT) of the Ministère de l'Enseignement
563 Supérieur et de la Recherche, attributed to PhD student.

564 We thank Ivan Wawrzyniack from the LMGE of University Clermont-Auvergne (France)
565 for his contribution to the genome data analysis of microsporidian species.

566

567 **References**

568

- 569 [1] A. Cali, J.J. Becnel, P.M. Takvorian, *Microsporidia*, 2nd ed., Springer Internation
570 Publishing, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_27-1.
- 571 [2] K.W. Nägeli, Über die neue krankheit der Seidenraupe und verwandte
572 organismen, *Bot. Z.* 15 (1857) 760–761.
- 573 [3] J. Vávra, J. Lukeš, *Microsporidia and ‘The Art of Living Together,’* in: D. Rollinson
574 (Ed.), *Adv. Parasitol.*, 1st editio, Elsevier Ltd, 2013: pp. 253–319.
575 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00004-6>.
- 576 [4] A. Cali, P.M. Takvorian, *Developmental Morphology and Life Cycles of the*
577 *Microsporidia*, in: L.M. Weiss, J.J. Becnel (Eds.), *Microsporidia Pathog. Oppor.*,
578 1st ed., John Wiley & Sons, Inc., 2014: pp. 71–133.
579 <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch2>.
- 580 [5] E.S. Didier, K.F. Snowden, J.A. Shadduck, *Biology of microsporidian species*
581 *infecting mammals*, Academic Press Limited, 1998.
582 [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60125-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60125-6).
- 583 [6] M. Wittner, L.M. Weiss, *The Microsporidia and Microsporidiosis*, American
584 Society of Microbiology Press, 1999. <https://doi.org/10.1128/9781555818227>.
- 585 [7] G.D. Stentiford, J.J. Becnel, L.M. Weiss, P.J. Keeling, E.S. Didier, B.A.P.
586 Williams, S. Bjornson, M.L. Kent, M.A. Freeman, M.J.F. Brown, E.R. Troemel, K.
587 Roesel, Y. Sokolova, K.F. Snowden, L. Solter, *Microsporidia – Emergent*
588 *Pathogens in the Global Food Chain*, *Trends Parasitol.* 32 (2016) 336–348.
589 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.004>.
- 590 [8] L.M. Weiss, T.D. Edlind, C.R. Vossbrinck, T. Hashimoto, *Microsporidian*
591 *molecular phylogeny: the fungal connection.*, *J. Eukaryot. Microbiol.* 46 (1999)
592 17S-18S.
- 593 [9] S.C. Lee, N. Corradi, E.J. Byrnes lii, S. Torres-Martinez, F.S. Dietrich, P.J.

- 594 Keeling, J. Heitman, Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi, *Curr.*
595 *Biol.* 18 (2008) 1675–1679. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.030>.
- 596 [10] S. Capella-Gutiérrez, M. Marcet-Houben, T. Gabaldón, Phylogenomics supports
597 microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi, *BMC Biol.* 10
598 (2012). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-47>.
- 599 [11] D. Corsaro, J. Walochnik, D. Venditti, J. Steinmann, K.-D. Müller, R. Michel,
600 Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage
601 Rozellomycota, *Parasitol. Res.* 113 (2014) 1909–1918.
602 <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3838-4>.
- 603 [12] P.J. Keeling, Phylogenetic Place of Microsporidia in the Tree of Eukaryotes, in:
604 L.M. Weiss, J.J. Becnel (Eds.), *Microsporidia Pathog. Oppor.*, 1st editio, John
605 Wiley & Sons, Inc., 2014: pp. 195–202.
606 <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch5>.
- 607 [13] J.P. Kramer, Longevity of microsporidian spores with special reference to
608 *Octosporea muscaedomesticae* flu, *Acta Protozool.* 8 (1970) 217–224.
- 609 [14] J. Vávra, J.I.R. Larsson, Chapter 1: Structure of Microsporidia, in: L.M. Weiss,
610 J.J. Becnel (Eds.), *Microsporidia Pathog. Oppor.*, First edit, John Wiley & Sons,
611 Inc., 2014: pp. 1–70. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch1>.
- 612 [15] G.J. Leitch, G.S. Visvesvara, Q. He, Inhibition of microsporidian spore
613 germination, *Parasitol. Today.* 9 (1993) 422–424. [https://doi.org/10.1016/0169-](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90052-H)
614 [4758\(93\)90052-H](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90052-H).
- 615 [16] J. Schottelius, C. Schmetz, N.P. Kock, T. Schüler, I. Sobottka, B. Fleischer,
616 Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia
617 of the genus *Encephalitozoon*, *Microbes Infect.* 2 (2000) 1401–1406.
618 [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01293-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01293-4).

- 619 [17] G.J. Leitch, C. Ceballos, Effects of host temperature, and gastric and duodenal
620 environments on microsporidia spore germination and infectivity of intestinal
621 epithelial cells, *Parasitol. Res.* 104 (2008) 35–42.
622 <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1156-4>.
- 623 [18] Y. Xu, L.M. Weiss, The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion
624 organelle, *Int. J. Parasitol.* 35 (2005) 941–953.
625 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.04.003>.
- 626 [19] A.H. Undeen, S.W. Avery, Germination of experimentally nontransmissible
627 microsporidia, *J. Invertebr. Pathol.* 43 (1984) 299–301.
628 [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(84\)90156-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(84)90156-3).
- 629 [20] A.H. Undeen, N.D. Epsky, In vitro and in vivo germination of *Nosema locustae*
630 (*Microspora: Nosematidae*) spores, *J. Invertebr. Pathol.* 56 (1990) 371–379.
631 [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(90\)90124-O](https://doi.org/10.1016/0022-2011(90)90124-O).
- 632 [21] E. Frixione, L. Ruiz, A.H. Undeen, Monovalent cations induce microsporidian
633 spore germination in vitro, *J. Euk. Microbiol.* 41 (1994) 464–468.
634 <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1994.tb06043.x>.
- 635 [22] F. Delbac, V. Polonais, The microsporidian polar tube and its role in invasion,
636 *Subcell. Biochem.* 47 (2008) 208–220. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_17.
- 638 [23] L. Chen, R. Li, Y. You, K. Zhang, L. Zhang, A Novel Spore Wall Protein from
639 *Antonospora locustae* (*Microsporidia: Nosematidae*) Contributes to Sporulation,
640 *J. Eukaryot. Microbiol.* 64 (2017) 779–791. <https://doi.org/10.1111/jeu.12410>.
- 641 [24] J.R. Hayman, S.F. Hayes, J. Amon, T.E. Nash, Developmental expression of
642 two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon*
643 *intestinalis*, *Infect. Immun.* 69 (2001) 7057–7066.

- 644 <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.7057-7066.2001>.
- 645 [25] J.R. Hayman, T.R. Southern, T.E. Nash, Role of sulfated glycans in adherence
646 of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro, *Infect.*
647 *Immun.* 73 (2005) 841–848. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.841-848.2005>.
- 648 [26] Y. Li, Z. Wu, G. Pan, W. He, R. Zhang, J. Hu, Z. Zhou, Identification of a novel
649 spore wall protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombycis*, *Int. J.*
650 *Parasitol.* 39 (2009) 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.011>.
- 651 [27] T.R. Southern, C.E. Jolly, M.E. Lester, J.R. Hayman, EnP1, a microsporidian
652 spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro,
653 *Euk. Cell.* 6 (2007) 1354–1362. <https://doi.org/10.1128/EC.00113-07>.
- 654 [28] Z. Wu, Y. Li, G. Pan, Z. Zhou, Z. Xiang, SWP25, a novel protein associated with
655 the *Nosema bombycis* endospore, *J. Euk. Microbiol.* 56 (2009) 113–118.
656 <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00375.x>.
- 657 [29] C.A. Leonard, *Microsporidia Spore Adherence and Host Cell Infection In Vitro*,
658 East Tennessee State University, 2013.
- 659 [30] F. Zhu, Z. Shen, J. Hou, J. Zhang, T. Geng, X. Tang, L. Xu, X. Guo, Identification
660 of a protein interacting with the spore wall protein SWP26 of *Nosema bombycis*
661 in a cultured BmN cell line of silkworm, *Infect. Genet. Evol.* 17 (2013) 38–45.
662 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.029>.
- 663 [31] B. Han, V. Polonais, T. Sugi, R. Yakubu, P.M. Takvorian, A. Cali, K. Maier, M.
664 Long, M. Levy, H.B. Tanowitz, G. Pan, F. Delbac, Z. Zhou, L.M. Weiss, The role
665 of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection, *PLoS Pathog.*
666 13 (2017) 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006341>.
- 667 [32] S.E. Campbell, T.A. Williams, A. Yousuf, D.M. Soanes, K.H. Paszkiewicz, B.A.P.
668 Williams, The Genome of *Spraguea lophii* and the Basis of Host-Microsporidian

- 669 Interactions, PLoS Genet. 9 (2013) 1–15.
670 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003676>.
- 671 [33] H. Liu, M. Li, S. Cai, X. He, Y. Shao, X. Lu, Ricin-B-lectin enhances microsporidia
672 *Nosema bombycis* infection in BmN cells from silkworm *Bombyx mori*, *Acta*
673 *Biochim. Biophys. Sin.* 48 (2016) 1050–1057.
674 <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw093>.
- 675 [34] R.D. Cummings, R.L. Schnaar, R-Type Lectins, in: A. Varki, R. Cummings, J.
676 Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth (Eds.), *Essentials Glycobiol.*, 3rd ed., Cold
677 Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2017.
678 <https://doi.org/10.1101/glycobiology.3e.031>.
- 679 [35] K. Sandvig, Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and
680 medical perspectives, *EMBO J.* 19 (2000) 5943–5950.
681 <https://doi.org/10.1093/emboj/19.22.5943>.
- 682 [36] S. Olsnes, The history of ricin, abrin and related toxins, *Toxicon.* 44 (2004) 361–
683 370. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.003>.
- 684 [37] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, Part IV, Glucan-
685 binding Proteins, in: A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth
686 (Eds.), *Essentials Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press,
687 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20728/>.
- 688 [38] R.V. Romero, R. Osicka, P. Sebo, Filamentous hemagglutinin of *Bordetella*
689 *pertussis*: A key adhesin with immunomodulatory properties?, *Futur. Microbiol.*
690 9 (2014) 1339–1360. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.77>.
- 691 [39] S.M. Prasad, Y. Yin, E. Rodzinski, E.I. Tuomanen, H. Robert Masure,
692 Identification of a Carbohydrate Recognition Domain in Filamentous
693 Hemagglutinin from *Bordetella pertussis*, *Infect. Immun.* 61 (1993) 2780–2785.

- 694 <https://doi.org/10.1128/iai.61.7.2780-2785.1993>.
- 695 [40] E. Tuomanen, H. Towbin, G. Rosenfelder, D. Braun, G. Larson, S. Gunnar, C.
696 Hansson, R. Hilli, Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit
697 adherence of Bordetella Pertussis to human ciliated respiratory epithelial cells,
698 J. Exp. Med. 168 (1988) 267–277. <https://doi.org/10.184/jem.168.1.267>.
- 699 [41] W.H. Tham, J. Healer, A.F. Cowman, Erythrocyte and reticulocyte binding-like
700 proteins of Plasmodium falciparum, Trends Parasitol. 28 (2012) 23–30.
701 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.002>.
- 702 [42] J.D. Esko, N. Sharon, Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins.,
703 in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi,
704 G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), Essentials Glycobiol., 2nd Ed., Cold Spring Harbor
705 Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- 706 [43] A.J. Thompson, L. Cao, Y. Ma, X. Wang, J.K. Diedrich, C. Kikuchi, S. Willis, C.
707 Worth, R. McBride, J.R. Yates, J.C. Paulson, Human Influenza Virus
708 Hemagglutinins Contain Conserved Oligomannose N-Linked Glycans Allowing
709 Potent Neutralization by Lectins, Cell Host Microbe. 27 (2020) 1–11.
710 <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.009>.
- 711 [44] G.N. Rogers, J.C. Paulson, Receptor Determinants of Human and Animal
712 Influenza Virus Isolates: Differences in Receptor Specificity of the H3
713 Hemagglutinin Based on Species of Origin, Virology. 127 (1983) 361–373.
714 [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90150-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90150-2).
- 715 [45] J. Chen, L. Geng, M. Long, T. Li, Z. Li, D. Yang, C. Ma, H. Wu, Z. Ma, C. Li, G.
716 Pan, Z. Zhou, Identification of a novel chitin-binding spore wall protein
717 (NbSWP12) with a BAR-2 domain from Nosema bombycis (microsporidia),
718 Parasitology. 140 (2013) 1394–1402.

719 <https://doi.org/10.1017/S0031182013000875>.

720 [46] Z. Wu, Y. Li, G. Pan, X. Tan, J. Hu, Z. Zhou, Z. Xiang, Proteomic analysis of
721 spore wall proteins and identification of two spore wall proteins from *Nosema*
722 *bombycis* (Microsporidia), *Proteomics*. 8 (2008) 2447–2461.
723 <https://doi.org/10.1002/pmic.200700584>.

724 [47] J. Audi, M. Belson, M. Patel, J. Schier, J. Osterloh, Ricin Poisoning, *Jama*. 294
725 (2005) 2342–2351. <https://doi.org/10.1001/jama.294.18.2342>.

726 [48] A. Sardinha-Silva, F. Mendonça-Natividade, C. Pinzan, C. Lopes, D. Costa, D.
727 Jacot, F. Fernandes, A. Zorzetto-Fernandes, N. Gay, A. Sher, D. Jankovic, D.
728 Soldati-Favre, M. Grigg, M.C. Roque-Barreira, The lectin-specific activity of
729 *Toxoplasma gondii* microneme proteins 1 and 4 binds Toll-like receptor 2 and 4
730 N-glycans to regulate innate immune priming, *PLoS Pathog*. 15 (2019) 1–24.
731 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007871>.

732 [49] P.M. Nogueira, R.R. Assis, A.C. Torrecilhas, E.M. Saraiva, N.L. Pessoa, M.A.
733 Campos, E.F. Marialva, C.M. Ríos-Velasquez, F.A. Pessoa, N.F. Secundino,
734 J.N. Rugani, E. Nieves, S.J. Turco, M.N. Melo, R.P. Soares,
735 Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display
736 Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection,
737 *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) 1–17.
738 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004848>.

739 [50] M.A. Favila, N.S. Geraci, A. Jayakumar, S. Hickerson, J. Mostrom, S.J. Turco,
740 S.M. Beverley, M.A. McDowell, Differential impact of LPG-and PG-deficient
741 *Leishmania major* mutants on the immune response of human dendritic cells,
742 *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015) 1–28.
743 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004238>.

- 744 [51] K.E.M. Persson, F.J. McCallum, L. Reiling, N.A. Lister, J. Stubbs, A.F. Cowman,
745 K. Marsh, J.G. Beeson, Variation in use of erythrocyte invasion pathways by
746 *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies, *J. Clin.*
747 *Invest.* 118 (2008) 342–351. <https://doi.org/10.1172/JCI32138>.
- 748 [52] W.A. Petri, R. Haque, B.J. Mann, The bittersweet interface of parasite and host:
749 Lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite
750 *Entamoeba histolytica*, *Ann.Rev. Microbio.* 56 (2002) 39–64.
751 <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160959>.
- 752 [53] W.A. Petri, R.D. Smith, P.H. Schlesinger, C.F. Murphy, J.I. Ravdin, Isolation of
753 the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba*
754 *histolytica*, *J. Clin. Invest.* 80 (1987) 1238–1244.
755 <https://doi.org/10.1172/JCI113198>.
- 756 [54] V.B. Carruthers, L.D. Sibley, Sequential protein secretion from three distinct
757 organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts,
758 *Eur. J. Cell Biol.* 73 (1997) 114–23.
- 759 [55] T.M.A. Blumenschein, N. Friedrich, R.A. Childs, S. Saouros, E.P. Carpenter,
760 M.A. Campanero-Rhodes, P. Simpson, W. Chai, T. Koutroukides, M.J.
761 Blackman, T. Feizi, D. Soldati-Favre, S. Matthews, Atomic resolution insight into
762 host cell recognition by *Toxoplasma gondii*, *EMBO J.* 26 (2007) 2808–2820.
763 <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601704>.
- 764 [56] S. Brecht, V.B. Carruthers, D.J.P. Ferguson, O.K. Giddings, G. Wang, U. Jäkke,
765 J.M. Harper, L.D. Sibley, D. Soldati, The *Toxoplasma* Micronemal Protein MIC4
766 Is an Adhesin Composed of Six Conserved Apple Domains, *J. Biol. Chem.* 276
767 (2001) 4119–4127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008294200>.
- 768 [57] E. V. Lourenço, S.R. Pereira, V.M. Faça, A.A.M. Coelho-Castelo, J.R. Mineo,

769 M.C. Roque-Barreira, L.J. Greene, A. Panunto-Castelo, *Toxoplasma gondii*
770 micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin, *Glycobiology*. 11 (2001)
771 541–547. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.7.541>.

772 [58] J. Marchant, B. Cowper, Y. Liu, L. Lai, C. Pinzan, J.B. Marq, N. Friedrich, K.
773 Sawmynaden, L. Liew, W. Chai, R.A. Childs, S. Saouros, P. Simpson, M.C.R.
774 Barreira, T. Feizi, D. Soldati-Favre, S. Matthews, Galactose recognition by the
775 apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 16720–
776 16733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325928>.

777 [59] Q. Huang, Evolution of Dicer and Argonaute orthologs in microsporidian
778 parasites, *Infect. Genet. Evol.* 65 (2018) 329–332.
779 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.08.011>.

780 [60] I.H. Kim, D.J. Kim, W.S. Gwak, S.D. Woo, Increased survival of the honey bee
781 *Apis mellifera* infected with the microsporidian *Nosema ceranae* by effective
782 gene silencing, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 105 (2020) 1–12.
783 <https://doi.org/10.1002/arch.21734>.

784 [61] M. Saleh, G. Kumar, A.A. Abdel-Baki, M.A. Dkhil, M. El-Matbouli, S. Al-Quraishy,
785 In Vitro Gene Silencing of the Fish Microsporidian *Heterosporis saurida* by RNA
786 Interference, *Nucleic Acid Ther.* 26 (2016) 250–256.
787 <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0613>.

788

Annexe 4 :

Chapitre: Bioactive polysaccharides from microalgae

c0100 **Bioactive polysaccharides from microalgae**

N. Prybylski^{a,d}, C. Toucheteau^b, H. El Alaoui^a, N. Bridiau^b, T. Maugard^b,
S. Abdelkafi^c, I. Fendri^c, C. Delattre^d, P. Dubessay^d, G. Pierre^d, P. Michaud^d

^aUniversité Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, Clermont-Ferrand, France, ^bUniversité de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSs, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, La Rochelle, France, ^cUnité de Biotechnologie des Algues, Biological Engineering Department, National School of Engineers of Sfax, University of Sfax, Sfax, Tunisia, ^dUniversité Clermont Auvergne, SIGMA Clermont, Institut Pascal, Clermont-Ferrand, France

Chapter outline


20.1 Introduction	1
20.2 Structural diversity of polysaccharides from microalgae	3
20.3 Processes production, extraction, and purification of EPS from microalgae and cyanobacteria	8
20.4 Polysaccharides from microalgae as antiinfectious agents	19
20.4.1 Antiviral activity of PS from microalgae and cyanobacteria	19
20.4.2 Antibacterial activity of PS from microalgae and cyanobacteria	21
20.4.3 Antifungal activities of PS from microalgae and cyanobacteria	22
20.5 Bioactivity and structure-activity relationships	23
20.5.1 Antioxidant activity and free radical scavenging	24
20.5.2 Anticancer activity	25
20.5.3 Immunomodulatory activity	26
20.5.4 Antiinflammatory activity	27
20.5.5 Anticoagulant activity	28
20.5.6 Antitussive activity	29
20.5.7 Antilipidemic and antiglycemic activities	29
20.5.8 Antiaging activity	30
20.6 Future perspectives	30
References	31
Further reading	39

s0010 **20.1 Introduction**

p0105 Microalgae and cyanobacteria constitute a diverse group of photoautotrophic single cell-organisms present in various ecosystems including airborne, terrestrial, and most of all aquatic environments (Tesson et al., 2016). Cyanobacteria are often called microalgae or blue

2 Chapter 20

microalgae even if they are photosynthetic prokaryote microorganisms. In this chapter, the term “microalgae” will be used to designate the sole eukaryotic photosynthetic microorganisms. Microalgae and cyanobacteria are capable of living in severe conditions using solar energy, water, and inorganic nutrients to reduce CO₂ into complex organic compounds with efficiencies exceeding those of terrestrial plants. This specific metabolism is a real opportunity to produce bioenergies (biofuel, bioethanol, CH₄, H₂, etc.) without competition with food production for arable soils exploitation. Moreover, even if microalgae are mainly photoautotrophic organisms, they have the ability to use organic carbon, dividing their metabolism into three types: photoautotrophic, heterotrophic, and mixotrophic.

p0110 The classification of microalgae is under permanent development and can be found in algae database resources (e.g., www.algaebase.org). Briefly, from a taxonomic point of view, microalgae (or eukaryotic microalgae) stemmed from two successive and independent endosymbioses leading to Rhodophyta, Chlorophyta, and Glaucophyta (first endosymbiosis) and to Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Cryptophyta, Heterokonta (or Ochrophyta), Haptophyta, and Dinophyta for the second one. A third endosymbiosis between Heterokonta and Dinophyta created Bacillariophyta (Cooper et al., 2015). Microalgae emerged later than cyanobacteria,  which were the first microorganisms able to perform complete photosynthesis on Earth. It has been estimated that about 800,000 species exist (including cyanobacteria), of which 35,000 species have been described in detail (Guiry, 2012; Gagnard et al., 2019). Among all these putative or described strains of microalgae and cyanobacteria, only 100–200 species have been studied in academic laboratories for the production of valuable metabolites, of which only a dozen species are exploited by industry.

p0115 In a context of fossil fuels depletion and anthropogenic climate change, the culture of microalgae and their refining to produce biofuels has recently sparked the interest of scientists. Even if the potential of microalgae in this field is evident, numerous technological advances have to be realized to attain an economical model. Indeed, approaches of biological engineering and not only of biology are necessary for the sustainable photoproduction intensification, the recycling of culture media, the harvesting of microalgal biomass, and their refining. However, the frenetic activity of researchers to improve the biofuel production by microalgae through numerous research projects has led to the development of technologies and notably to production of biomass in photoautotrophy at large scale. This opportunity opens the way to the exploitation of microalgae for production of some high-value metabolites such as pigments, peptides, enzymes, polyunsaturated fatty acids, and polysaccharides (Pignolet et al., 2013). Among them, polysaccharides (PS) and particularly extracellular polysaccharides (ECP) or exopolysaccharides (EPS) are of major interest as they have been exploited not only for their rheological but above all for their biological activities.

p0120 EPS from microalgae and cyanobacteria have been poorly described in the literature compared to those from terrestrial plants, seaweeds, fungi, or nonphotosynthetic microorganisms (Delattre et al., 2016; Gaignard et al., 2019). They are mainly heteropolysaccharides without repeating units in their structures and are often associated with nonsugar components such as sulfates. These original structures, composed sometimes of rare monosaccharides as main components, are of high molecular weights, giving them a hydrocolloid character. Clearly, the hydrocolloid market is closed to EPS of microalgae and cyanobacteria, as the costs to obtain them are too high to allow competition with texturing agents from plants and macroalgae. However, the nutraceutical, cosmetic, and therapeutic fields, which always need new high-value products, are open for original biopolymers. This chapter focuses on the next developments in the characterization of biological activities of PS from microalgae and cyanobacteria.

s0015 **20.2 Structural diversity of polysaccharides from microalgae**

p0125 According to the IUPAC-IUB nomenclature, glycans can be classified in two categories according to their degree of polymerization (DP): oligosaccharides ($2 < DP < 10$) and polysaccharides ($DP > 10$). In practice, the border between poly- and oligosaccharides is more complex, and low molecular weight polysaccharides (BPMs) are often considered as oligosaccharides. Polysaccharides are condensed polymers consisting of long chains of monosaccharide units. Their great structural variability comes from the large number of available monosaccharide units (mainly hexoses and pentoses) and the possibility of making glycosidic linkages between the anomeric hydroxyl group of an ose and any of the hydroxyl groups of another monosaccharide. A simple monosaccharide such as glucose can bind with its anomeric carbon (α or β) with the five hydroxyls of a second glucose, giving rise to 11 different structural isomers. The structure of glycans thus strongly depends not only on their composition but also on the type of glycoside bonds, which introduces a considerable structural and conformational flexibility. Overall, the complexity of glycans can be distinguished in five items: (i) the flexibility of the macromolecular chain—a parameter influenced by the nature of the glycoside bonds involved; (ii) the nature of the carbon skeleton (homopolysaccharide or heteropolysaccharide consisting of neutral oses and/or acids); (iii) the molecular weight and mass distribution; (iv) the type of functional groups carried by the macromolecular chain (substitution)—groups defined by their position and rate of incorporation; and (v) the presence of other covalently linked molecules such as proteins (proteoglycans).

p0130 Why itemize something so obvious? Because the direct consequence of this structural variability is a great diversity in the composition and role of carbohydrates in living organisms. Obviously, this applies to microalgae, for which polysaccharides play key roles ranging from

4 Chapter 20

C-storing to cell-structuring functions, but also as biological activators, adhesion supports, carbon metabolism, or water-content regulators. To this first layer of biochemical complexity (otherwise called the famous “structure/function relationship”) is added the wide diversity and significance of marine algae (Singh and Saxena, 2015). Even by limiting the point of view to only microalgae, the phylogenetic diversity of nonpolysaccharide and polysaccharide producers can be considered as a bottomless chasm. This overall understanding highlights the millions of possibilities and an unlimited universe in the compositions and structural variability of polysaccharides from microalgae. Hopefully, nature has preserved the best and/or more appropriate (useful) configurations for specific biotopes, although various genes (or remains) coding for nonexpressed glycotransferases can be found by genomic methodologies, which are essential for a phylogenetic approach. In this way, Rossi and De Philippis (2016) showed the possibility to explore cyanobacteria and microalgae EPS producers by identifying various genes and putative proteins involved in EPS metabolism and processing. Another point, which is still poorly recognized, is the importance of the extraction and purification procedures as well as the analytical methods used for determining the structure of microalgal polysaccharides. These procedures always affect the quality, quantity, and type of studied polysaccharides. Depending on their bad (misunderstood) uses, structural changes of polysaccharides can be falsely observed and errors attributed to culture conditions, specific species, etc. (Delattre et al., 2016).

- p0135 Polysaccharides from microalgae can be distinguished into three main groups: intracellular, structural, and extracellular glycans. Newcomers should keep in mind that the last category is more difficult to apprehend because of misuses and/or abusive uses in the literature for describing extracellular polysaccharides. EPS, ECP, and polysaccharidic exudates belong to this class, which also includes cell-bound polysaccharides (BPS) and released polysaccharides (RPS). To go further, BPS can be subdivided into sheath, capsule, and slime, and RPS are often defined as colloidal EPS but also low molecular weight exudates (Delattre et al., 2016).
- p0140 Regarding the literature, few microalgae EPS are fully detailed in terms of structure, probably because of: (i) the number of various monosaccharides (sometimes up to seven) and uronic acids; (ii) the lack of repeating units; (iii) the presence of nonsugar substituents; and (iv) the rheological behavior in culture media, making their proper recovery without structural modifications difficult (e.g., decrease in molar mass). Tables 20.1–20.5 give an exhaustive overview of the main structural data available in the literature for EPS extracted from various microalgae phyla, i.e., Charophyta (Klebsormidiophyceae, Zygnematophyceae), Chlorophyta (Chlorodendrophyceae, Chlorophyceae, Trebouxyophyceae), cyanobacteria, Myozozoa (Dinophyceae), Ochrophyta (Bacillariophyceae, Coscinodiscophyceae, Mediophyceae, Pinguiphyceae, Raphidophyceae), and Rhodophyta (Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae). G7
- p0145 EPS from Charophyta exhibit a tryptic profile of Gal, Fuc, and Xyl, depending on the species (Table 20.1). Fucan compositions are the most reported, and specific structural features, such as (1,3) and (1,4)-linked Fucp, seem to be recurrent. The content in uronic acids is also not

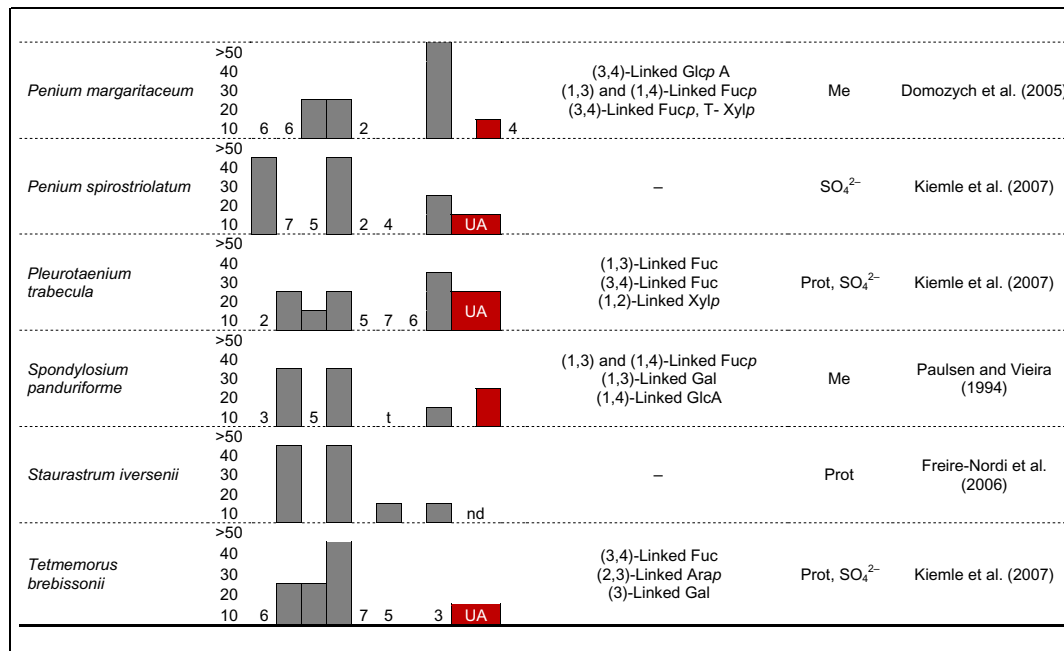
t0010 **Table 20.1: Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Charophyta. Ac, acetyl groups; Me, methyl groups; nd, not defined; Prot, proteins; Pyr, pyruvate groups; SO₄²⁻, sulfate groups; UA, uronic acids; X, presence; t, trace.**

Species	%	Ara	Gal	Glc	Fuc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	Others	Main structural features	Nonsugar groups	References
Charophyta															
<i>Closterium</i> sp.		10	5	5	35	1	1	25	25	45	0	0	(1,4)-Linked Fuc (3,4)-Linked GlcA	-	Domozych et al. (1993)
<i>Cosmarium</i> sp. 1		15	25	15	35	15	4	3	15	15	15	15	Predominance of 2-Fuc residues (2,3,4)-Linked Fuc (2,3)-Linked Ara	Prot, SO ₄ ²⁻	Kiemle et al. (2007)
<i>Cosmarium</i> sp. 2		15	25	35	25	15	6	1	15	0	0	0	-	nd	Kiemle et al. (2007)
<i>Hyalotheca dissiliens</i>	Presence	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	(1,4)-Linked GlcA Branchpoints in C-3 position Complex linkage of Fuc units	-	Vieira and Paulsen (1994)
<i>Klebsormidium flaccidum</i> 446C		2	2	3	4	35	45	10	10	10	10	10	Rhamnan?	SO ₄ ²⁻ (t)	Barberousse et al. (2006)
<i>Klebsormidium flaccidum</i> 748A		25	25	25	35	15	15	15	15	15	15	15	Mannan?	SO ₄ ²⁻	Barberousse et al. (2006)
<i>Klebsormidium flaccidum</i> 749B		7	5	15	45	25	25	10	10	10	10	10	Mannan?	-	Barberousse et al. (2006)
<i>Micrasterias denticulata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Oertel et al. (2004)
<i>Netrium digitus</i>		15	15	15	45	15	4	15	25	15	15	15	-	SO ₄ ²⁻	Kiemle et al. (2007)
<i>Netrium oblongum</i>		7	7	7	3	3	3	25	25	25	25	25	(1,2)-Linked Arap Fragments non consistent with the MS composition	Prot, SO ₄ ²⁻	Kiemle et al. (2007)
<i>Netrium interruptum</i>		25	15	4	25	3	5	5	5	35	35	35	(3,4)-Linked Fuc T-Xyl	SO ₄ ²⁻	Kiemle et al. (2007)
<i>Netrium interruptum</i> UTEX 2509		15	45	15	25	4	3	3	25	0	0	0	-	nd	Kiemle et al. (2007)
<i>Penium cylindrus</i>		7	3	3	45	3	4	4	35	15	15	15	-	nd	Kiemle et al. (2007)

Continued

6 Chapter 20

Table 20.1: Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Charophyta. *Ac*, acetyl groups; *Me*, methyl groups; *nd*, not defined; *Prot*, proteins; *Pyr*, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; *UA*, uronic acids; *X*, presence; *t*, trace—cont'd



negligible (up to 30%). EPS from Chlorophyta are often mainly composed of Gal (*Chlorella*) or Glc (*Chlamydomonas*) with various amounts of uronic acids (Table 20.2) in contrast to EPS from Ochrophyta, which are rich in Glc and Fuc (Table 20.4). Cyanobacteria mainly produce Glc-rich EPS, and GlcN and GalN were reported in some species (Table 20.3). Their EPS are often substituted by acetyl, methyl, pyruvyl, and sulfate groups, and proteins could be associated to the structure (proteoglycan). EPS from Rhodophyta are characterized by high levels of Xyl, the presence of GlcA in the main backbone, and significant amounts of sulfates. Depending on the species, the main data reported in the literature highlighted galacto- and rhamnoxyylan backbones (Table 20.5). Some structural features are reported concerning their backbones, such as for *Porphyridium* sp., with a repetition of β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Galp, which is itself branched in the O-2 position of L-Galp by β -D-Xylp residues (Gloaguen et al., 2004). Overall, the poor knowledge of EPS microalgae structures could be attributed to the apparent lack of repeating units or presence of numerous nonsugar groups, as previously stated. However, a simple exhaustive list of reported structural data (Tables 20.1–20.5) seems to draw some profile patterns. Combining ecological, biochemical, genomic, and transcriptomic approaches should provide significant advances in the understanding of EPS microalgae production, for both industrial uses and evolution comprehension.

Bioactive polysaccharides from microalgae 7

t0015 **Table 20.2: Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Chlorophyta. *Ac*, acetyl groups; *Me*, methyl groups; *nd*, not defined; *Prot*, proteins; *Pyr*, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; *UA*, uronic acids; *X*, presence; *t*, trace.**

Species	%	Ara	Gal	Glc	Fuc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	Others	Main structural features	Nonsugar groups	References
Chlorophyta															
<i>Ankistrodesmus densus</i>	>50 40 30 20 10		3	5									Fucosyl backbone Mannan backbone	Me	Paulsen et al. (1998)
<i>Botryococcus braunii</i>													-	-	Casadevall et al. (1985)
<i>Bracteacoccus</i> sp. 679E	>50 40 30 20 10	5											nd	SO_4^{2-}	Barberousse et al. (2006)
<i>Chlamydomonas augustae</i>	>50 40 30 20 10	5				2			2				(1,3,4)-D-glucan Araf lateral chains	Prot	Allard and Tazi (1993)
<i>Chlamydomonas corrosa</i>	Molar ratio	1	1.7										(1,3)-D-Arabinan Galp lateral chains?	Prot	Allard and Tazi (1993)
<i>Chlamydomonas humicola</i>	>50 40 30 20 10	1.10	0.36	1.10			0.27		2.97				Xylan Proteoglycan?	Prot	Flaibani et al. (1989)
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	>50 40 30 20 10					4	3	2					-	-	Barclay and Lewin (1985)
<i>Chlamydomonas peterfii</i>	Molar ratio	0.70	2.40	0.12									Galactan Proteoglycan?	Prot	Flaibani et al. (1989)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	>50 40 30 20 10	X	X	X			X	X	X	X			-	Pyr	Bafana (2013)
<i>Chlamydomonas sajabo</i>	Molar ratio	0.49	2.54	0.07			0.08		0.16				Galactan Proteoglycan?	Prot	Flaibani et al. (1989)
<i>Chlorella autotrophica</i>													-	-	Fábregas et al. (1999)
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	>50 40 30 20 10					5							Galactan?	-	Barberousse et al. (2006)
<i>Chlorella mirabilis</i> 678F	>50 40 30 20 10					5	7						Galactan?	SO_4^{2-}	Barberousse et al. (2006)

Continued

8 Chapter 20

Table 20.2: Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Chlorophyta. *Ac*, acetyl groups; *Me*, methyl groups; *nd*, not defined; *Prot*, proteins; *Pyr*, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; *UA*, uronic acids; *X*, presence; *t*, trace—cont'd

<i>Chlorella mirabilis</i> 7410G		Galactan?	SO_4^{2-} (t)	Barberousse et al. (2006)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> Chick S-39	X X X X X X X	–	–	Maksimova et al. (2004)
<i>Chlorella</i> sp.	X X X X	–	–	Moore and Tischer (1964)
<i>Chlorella stigmatophora</i>	Presence X X	–	SO_4^{2-}	Kaplan et al. (1987)
<i>Desmococcus olivaceus</i>		–	Prot	Hokputsa et al. (2003)
<i>Dunaliella salina</i>	X X X X	–	–	Mishra and Jha (2009)
<i>Dunaliella tertiolecta</i> UTEX LB 999	X	α -(1,4)-D-Glucan	Prot	Goo et al. (2013)
<i>Nephrocytium lunatum</i>		Mannan?	Ac	Freire-Nordi et al. (2003)

s0020 20.3 Processes production, extraction, and purification of EPS from microalgae and cyanobacteria

p0150 In photoautotrophic conditions, the growth of microalgae (and cyanobacteria) is directly bound to photosynthesis activity, and then to light irradiance, even if several optimal values are strain-dependent (Delattre et al., 2016). The EPS produced by microalgae is also a light-dependent mechanism (Gaignard et al., 2019) and is highly enhanced by continuous light and great light intensities, as exhibited for *Arthrospira platensis* (Trabelsi et al., 2009b), *Gloeocapsa gelatinosa* (Raungsomboon et al., 2006), *Porphyridium* (Merchuk et al., 1998), *Cyanospira capsulata* (De Philippis et al., 1998), or *Synechococcus* BG0011 (Phlips et al., 1989). For cultures conducted in a dark/light regime, the lighting period was greater with a maximum release of EPS, confirming that the EPS production is a light-dependent mechanism. Light irradiance and/or dark-light cycles have no impact on the polysaccharides composition (nature and amounts of monosaccharides, glycosidic linkages type, etc.) of cyanobacteria such as

t0020 **Table 20.3: Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Cyanobacteria. Ac, acetyl groups; Me, methyl groups; nd, not defined; Prot, proteins; Pyr, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; UA, uronic acids; X, presence; t, trace.**

Species	%	Ara	Gal	Glc	Fuc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	Others	Main structural features	Nonsugar groups	References
Cyanobacteria															
<i>Anabaena augstmalis</i> VRUC 163	>50 40 30 20 10				5	7					2	6	-	-	Di Pippo et al. (2013)
<i>Anabaena cylindrica</i> 10C	Molar ratio	1	3.6	1	1	1			3.1				-	-	Lama et al. (1996)
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Presence		X			X		X		X		X	-	-	Moore and Tischer (1964)
<i>Anabaena</i> sp.							-						-	-	Moreno et al. (1998)
<i>Anabaena spiroides</i>	>50 40 30 20 10	4											-	-	Gouvêa et al. (2005)
<i>Anabaena sphaerica</i>	Molar ratio	1	4	3		3							-	-	Nicolaus et al. (1999)
<i>Anabaena torulosa</i>	Molar ratio	4.3	1	2.4	2.7		6		73.4				-	-	Nicolaus et al. (1999)
<i>Anacystis nidulans</i>	Molar ratio		14	66		20							-	-	Sangar and Dugan (1972)
<i>Aphanocapsa halophytia</i>	Molar ratio		3		53	15	2		3				-	Prot, SO_4^{2-}	Sudo et al. (1995)
<i>Aphanothece halophytica</i> GR02	Molar ratio	1		2.87	2.08	1.57							T-Glc, 1,3-Linked Glc, 1,3- and 1,4-Linked Fuc, 1,3-Linked GlcA, 1,3-Linked Ara, 1,2,4- and 1,3,6-Linked Man	-	Li et al. (2001)
<i>Arthrospira maxima</i>	Molar ratio		0.3	1	0.2		1		1.8	0.07	0.2		-	Prot	Nie et al. (2002)
<i>Arthrospira platensis</i>	>50 40 30 20 10	1				t	4						Glycoprotein (55% dw)?	Prot, SO_4^{2-}	Trabelsi et al. (2009)

Continued

Table 20.3: Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Cyanobacteria. *Ac*, acetyl groups; *Me*, methyl groups; *nd*, not defined; *Prot*, proteins; *Pyr*, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; *UA*, uronic acids; *X*, presence; *t*, trace—cont'd

<i>Arthrospira platensis</i>		–	–	Depraetere et al. (2015)
<i>Calothrix pulvinata</i> 745A		–	SO_4^{2-} (t)	Barberousse et al. (2006)
<i>Calothrix</i> sp. VRUC 166		–	–	Di Pippo et al. (2013)
<i>Chlorogloeopsis</i> sp. 6912	Molar ratio 1 14.5 26.4 5 21.6 3	–	–	Nicolaus et al. (1999)
<i>Chroococcus minutus</i>		–	Prot	Fischer et al. (1997)
<i>Chroococcus submarinus</i> BM	Molar ratio 1 2 3 3 1 2 5 1 1 1	–	Prot, SO_4^{2-}	Richert et al. (2005)
<i>Cyanothece</i> sp.	Molar ratio 2.4 6.8 1.6 4.8 2.9 2 1	–	Prot	De Philippis et al. (1993)
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142		–	Prot, SO_4^{2-}	Parikh and Madamwar (2006)
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	Presence X	X	2-C-Me-Glc, Ido-2-C-carboxylic acid, 2-deoxy-Ido	Me, Prot, SO_4^{2-} Shah et al. (2000)
<i>Fischerella muscicola</i>	Molar ratio 3 8 3 1 1	–	–	Nicolaus et al. (1999)
<i>Gleocapsa kuetzingiana</i>		–	–	Rossi et al. (2012)
<i>Gleotheca</i> sp. PCC 6909		–	Prot, SO_4^{2-}	Tease et al. (1991)
<i>Johannesbaptistia pellucida</i> GC	Molar ratio 1 1 1 0.2 1 0.2 0.2 0.2 0.2	–	Prot, SO_4^{2-}	Richert et al. (2005)
<i>Leptolyngbya foveolarum</i> 671B		–	SO_4^{2-} (t)	Barberousse et al. (2006)

12 Chapter 20

Table 20.3: Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Cyanobacteria. *Ac*, acetyl groups; *Me*, methyl groups; *nd*, not defined; *Prot*, proteins; *Pyr*, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; *UA*, uronic acids; *X*, presence; *t*, trace—cont'd

<i>Nostoc flagelliforme</i>		-	-	Huang et al. (1998)
<i>Nostoc muscoru</i>		-	-	Najdenski et al. (2013)
<i>Nostoc</i> sp.		-	Prot	Ge et al. (2014)
<i>Nostoc</i> sp.		-	Prot	Hokputsa et al. (2003)
<i>Nostoc</i> sp.		Xylomannan?	Prot	Parikh and Madamwar (2006)
<i>Nostoc verrucosum</i>			Prot	Sakamoto et al. (2011)
<i>Oscillatoria amphibia</i>			SO_4^{2-}	Gloaguen et al. (1995)
<i>Oscillatoria corallinae</i>			SO_4^{2-}	Gloaguen et al. (1995)
<i>Oscillaria</i> sp.			Prot	Parikh and Madamwar (2006)
<i>Phormidium ambiguum</i> 692B			SO_4^{2-} (t)	Barberousse et al. (2006)
<i>Phormidium autumnale</i> VRUC 164			-	Di Pippo et al. (2013)
<i>Phormidium corium</i> 444A			SO_4^{2-} (t)	Barberousse et al. (2006)
<i>Phormidium ectocarpi</i> K5			-	Gloaguen et al. (1995)
<i>Phormidium</i> cf. <i>foveolarum</i> MEU			Prot?	Gloaguen et al. (1995)

B978-0-12-818536-0.00020-8, 00020

Table 20.3: Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Cyanobacteria. *Ac*, acetyl groups; *Me*, methyl groups; *nd*, not defined; *Prot*, proteins; *Pyr*, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; *UA*, uronic acids; *X*, presence; *t*, trace—cont'd

<i>Phormidium minutum</i> D5		-	-	Gloaguen et al. (1995)
<i>Phormidium</i> sp.	Molar ratio 3.5 1 5.7 3.4 2.4 5.5	-	-	Nicolaus et al. (1999)
<i>Phormidium tenue</i>		-	Prot	Hokputsa et al. (2003)
<i>Phormidium tenue</i>		(1,3)- and (1,3,4)-Araf T-Glcp, (1,3)- and (1,4)-Glcp (1,3)-Rhap	Prot	Hu et al. (2003)
<i>Phormidium usteri</i>		-	SO_4^{2-} (t)	Barberousse et al. (2006)
<i>Plectonema battersii</i> GF	Molar ratio 1 3 4 2 3 2 1 1	-	Prot, SO_4^{2-}	Richert et al. (2005)
<i>Plectonema golenkinianum</i> FF	Molar ratio 1 2 0.6 0.5 1 2 t 0.5	-	Prot	Richert et al. (2005)
<i>Plectonema</i> sp.		-	nd	Rossi et al. (2012)
<i>Rhabdoderma rubrum</i> CH	Molar ratio 1 3 2 1 5 t t 10	-	Prot, SO_4^{2-}	Richert et al. (2005)
<i>Scytonema hofmanni</i>	Molar ratio 1 1 3	-	-	Nicolaus et al. (1999)
<i>Scytonema javanicum</i>		Unclear structural data Glc/Man/Gal not separated	Prot	Hu et al. (2003)
<i>Synechococcus</i> sp.	-	-	-	Philips et al. (1989)
<i>Synechocystis aqualitis</i> VRUC 165		-	-	Di Pippo et al. (2013)
<i>Synechocystis</i> sp.	-	-	-	Najdenski et al. (2013)
<i>Tolypothrix tenuis</i>	Molar ratio 1.9 6.1 13.3 4.5 8.9 1	-	-	Nicolaus et al. (1999)
<i>Trichormus variabilis</i> VRUC168		-	-	Di Pippo et al. (2013)

Jacob-Lopes, 978-0-12-818536-0

14 Chapter 20

t0025

Table 20.4 Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Myozoa and Ochrophyta. *Ac*, acetyl groups; *Me*, methyl groups; *nd*, not defined; *Prot*, proteins; *Pyr*, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; *UA*, uronic acids; *X*, presence; *t*, trace.

Species	%	Ala	Gal	Glc	Fuc	Man	Rha	Rib	Xyl	Gala	GlcA	Others	Main structural features	Nonsugar groups	References	
Myozoa																
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	Presence		X	X		X					X		-	Prot, SO_4^{2-}	Hasui et al. (1995)	
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	>50 40 30 20 10				3	7		6				2	-	-	Liu et al. (2015)	
<i>Gyrodinium impudicum</i>	>50 40 30 20 10											3	Sulfated galactan	SO_4^{2-}	Yim et al (2004)	
Ochrophyta																
<i>Achnanthes coffeaeformis</i>	>50 40 30 20 10												T-, 4-GlcA units T-, 4-, 3,6-Glc units 4-, 4,6-Man residues	Prot, SO_4^{2-}	Wustman et al. (1997)	
<i>Achnanthes longipes</i>	>50 40 30 20 10	3					3						2,3-/3,6-Gal residues T-, 2-GlcA units T-Fuc, D-Gal and D-Man units	SO_4^{2-}	Wustman et al. (1997)	
<i>Amphora holsatica</i>	>50 40 30 20 10						3						-	nd	Leandro et al. (2003)	
<i>Amphora rostrata</i>	>50 40 30 20 10	4		3					2				UA	Prot, Pyr, SO_4^{2-}	Khandeparker and Bhosle (2001)	
<i>Aulacoseira granulata</i>	>50 40 30 20 10												-	-	Gouvêa et al. (2005)	
<i>Chaetoceros affinis</i>	Presence	X	X	X	X	X	X						-	SO_4^{2-}	Myklestad et al. (1972)	
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	>50 40 30 20 10		1		3.5		0.3						Fucan Fucp and Fucf (branch points) Rha linked in O-2 positions	Me, SO_4^{2-}	Paulsen et al. (1975)	
<i>Chaetoceros decipiens</i>	>50 40 30 20 10			3								3	T-, 2-Rha, T-, 2,3,4-Fuc units 2-Galp, 4-Galp (backbone) 2-, 6-, 2,4-, 2,3-Man (branching)	SO_4^{2-}	Urbani et al. (2012)	
<i>Coscinodiscus nobilis</i>	Presence			X	X	X					X		Sulfated glucuronomannan	SO_4^{2-}	Percival et al. (1980)	

Table 20.4 Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Myozoa and Ochrophyta. *Ac*, acetyl groups; *Me*, methyl groups; *nd*, not defined; *Prot*, proteins; *Pyr*, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; *UA*, uronic acids; *X*, presence; *t*, trace—cont'd

<i>Cylindrotheca closterium</i>	>50 40 30 20 10		–	Prot	Staats et al. (1999)
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	>50 40 30 20 10		–	SO_4^{2-}	Magaletti et al. (2004)
<i>Cymbella cystula</i>	>50 40 30 20 10		4-; 4,6-; 3,4-Linked/substituted Gal T-; 4f/5p- and 3p-linked/substituted Xyl	SO_4^{2-}	Wustman et al. (1997)
<i>Cymbella mexicana</i>	>50 40 30 20 10		4-Gal units 4f/5p-Xyl units	SO_4^{2-}	Wustman et al. (1997)
<i>Melosira nummuloides</i>	>50 40 30 20 10		–	nd	Leandro et al. (2003)
<i>Navicula directa</i>	>50 40 30 20 10		–	nd	Leandro et al. (2003)
<i>Navicula jeffreyi</i>	>50 40 30 20 10		–	–	Klein et al. (2014)
<i>Navicula salinarum</i>	>50 40 30 20 10		–	Prot, SO_4^{2-}	Staats et al. (1999)
<i>Navicula subinflata</i>	>50 40 30 20 10		–	Me, Prot, Pyr, SO_4^{2-}	Bhosle et al. (1995)
<i>Thalassiosira</i> sp.	>50 40 30 20 10		1,4-, 1,4,6-Man (backbone) 1,3-Rha and 1,3-Fuc units Various T- residues	Ac	Giroldo et al. (2003)
<i>Phaeodactylum tricomutum</i> CCMP 632 (ovoid)	>50 40 30 20 10		3-Glc (backbone) List of many fragments (>35)	Me	Willis et al. (2013)
<i>Phaeodactylum tricomutum</i> CCMP 632 (fusiform)	>50 40 30 20 10		3-Glc (backbone) List of many fragments (>35)	Me	Willis et al. (2013)

16 Chapter 20

t0030 Table 20.5 Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Rhodophyta. *Ac*, acetyl groups; *Me*, methyl groups; *nd*, not defined; *Prot*, proteins; *Pyr*, pyruvate groups; SO_4^{2-} , sulfate groups; *UA*, uronic acids; *X*, presence; *t*, trace.

Species	%	Ara	Gal	Glc	Fuc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	Others	Main structural features	Nonsugar groups	References
Rhodophyta															
<i>Flintiella sanguinaria</i>	>50 40 30 20 10	2	6											Ac, Me, Prot	Gagnard et al. (2018)
<i>Porphyridium aerugineum</i>	>50 40 30 20 10												GlcA-(1,3)-Gal D-Glc-(1,4)-Gal, D-Glc-D-Xyl D-Xyl-(1,3)-D-Xyl	Me, Prot, SO_4^{2-}	Percival and Foyle (1979)
<i>Porphyridium cruentum</i>	>50 40 30 20 10						4		7					Prot, SO_4^{2-}	de Jesus Raposo et al. (2014)
<i>Porphyridium cruentum</i>	>50 40 30 20 10												GlcA-(1,3)-Gal D-Glc-(1,4)-Gal, D-Glc-D-Xyl D-Xyl-(1,3)-D-Xyl	Me, Prot, SO_4^{2-}	Percival and Foyle (1979)
<i>Porphyridium marinum</i> CCAP 1380/10	>50 40 30 20 10													SO_4^{2-}	Roussel et al. (2015)
<i>Porphyridium purpureum</i> CCAP 1380/1A	>50 40 30 20 10													SO_4^{2-}	Roussel et al. (2015)
<i>Porphyridium</i> sp.	>50 40 30 20 10	1					1	1						Me, Prot, SO_4^{2-}	Geresh et al. (1992)
<i>Porphyridium</i> sp.	>50 40 30 20 10		X	X					X				β -D-Galp-(1,3)- β -D-Glcp-(1,3)- β -D-Xylp-(1,4)- β -D-Xylp-(1,4)- α -L-Galp β -D-Xylp branched in O-2 of L-Galp	Prot	Gloaguen et al. (2004)
<i>Porphyridium</i> sp. UTEX 6371	>50 40 30 20 10													nd	Geresh et al. (2002)
<i>Porphyridium</i> sp. UTEX 637	Molar ratio		1	1					3		0.5		2 or 4)- β -D-Xylp-(1,3)] _m - α -D-Glcp-(1,3)- α -D-GlcpA-(1,3)-L-Galp-(1	SO_4^{2-}	Geresh et al. (2009)
<i>Rhodella grisea</i>	>50 40 30 20 10	1	4										Proteoglycan	Me, Prot	Capek et al. (2008)
<i>Rhodella maculata</i> CCAP 1388/2	>50 40 30 20 10	2	1				5							Prot, SO_4^{2-}	Roussel et al. (2015)

Table 20.5 Overview of EPS heterogeneity from microalgae belonging to Rhodophyta. Ac, acetyl groups; Me, methyl groups; nd, not defined; Prot, proteins; Pyr, pyruvate groups; SO₄²⁻, sulfate groups; UA, uronic acids; X, presence; t, trace—cont'd

Species	Presence	X	X	X	X	X	X	X	α-D-GlcpA-(1,3)-α,β-L-Galp 3-, 4-O-methylpentose	Me	Reference
<i>Rhodella reticulata</i>		X	X	X	X	X	X	X			Geresh et al. (1990)
<i>Rhodella violacea</i> LMGEIP 001	>50 40 30 20 10	7	6						—	Prot, SO ₄ ²⁻	Villay et al. (2013)
<i>Rhodella violacea</i> CCAP 1388/5	>50 40 30 20 10	2	1	5					—	Prot, SO ₄ ²⁻	Roussel et al. (2015)

C. capsulata (Ge et al., 2014b). High values of light irradiances exhibit high EPS quantities, and the differences registered by several authors could reflect only a greater biomass production, as cellular productivities are generally omitted. These observations are in agreement with the production of EPS by *Rhodella violacea*, which was investigated at several values of irradiance. Indeed, greater EPS production was found at an irradiance of saturation just previous to the photosynthesis inhibition (photoinhibition) (Villay et al., 2013). In a similar way, EPS yields of cyanobacteria *Nostoc* sp. and *Microcoleus vaginatus* increased with the rise of light intensity without affecting their monosaccharide composition (Ge et al., 2014a,b).

p0155 However, the light spectral composition could affect the photosynthetic activity and the polysaccharides production. For example, blue (spectral irradiance ranging from 400 to 500 nm) and red (spectral irradiance ranging from 600 to 700 nm) lights, used at low irradiances (from 20 to 40 μmol photons m² s⁻¹), raised the photosynthetic activity and then the EPS production by *Porphyridium cruentum* (You and Barnett, 2004). Red light induced the photoinhibition of *Nostoc flagelliforme* growth, and stimulated its EPS production. ECP can act as a photoprotective layer surrounding the microalgae cells, as for *Nostoc commune*. Their biosynthesis occurred simultaneously with the photoprotective pigments when submitted to the UVB radiations (Ehling-Schulz et al., 1997). On the other hand, a continuous cultivation of *A. platensis* for 5 months using red light (620 nm, 135 μmol photons m² s⁻¹) has shown no significant differences in growth rates and EPS production compared to white light (Farges et al., 2009).

p0160 The complex chemo-diversity of EPS from cyanobacteria and microalgae combined with the development of green production and purification processes makes them very attractive for bioprospection of new and original sources of polysaccharides. Each kind of polysaccharides requires specific processes for its extraction and purification (Delattre et al., 2016). As shown in Fig. 20.1, EPS are traditionally extracted from microalgae cultivation media when the best PS concentrations are validated (irradiance, salinity, pH, temperature, aeration, etc.). In the first step, PS are recovered and separated using centrifugation or microfiltration to remove

18 Chapter 20

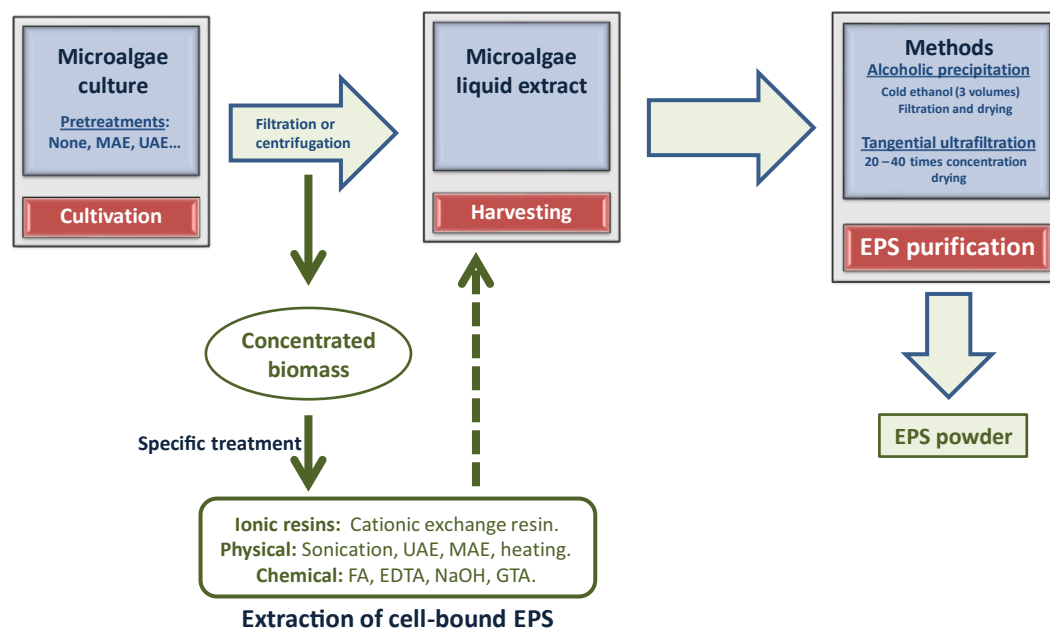


Fig. 20.1

The main strategies developed to extract and purify polysaccharides from microalgae. *UEA*, ultrasound-assisted extraction; *MAE*, microwave-assisted extraction.

microalgae (Delattre et al., 2016; Patel et al., 2013; Li et al., 2011; Zhang et al., 2008; Ye et al., 2005). Secondly, EPS are concentrated from filtrate/supernatant (under vacuum or by using ultrafiltration process) and selectively fractionated by precipitation with 2–3 volumes of cold alcohol such isopropanol or ethanol (Delattre et al., 2016; Patel et al., 2013; Usov, 2011; Gloaguen et al., 2004). They are then dried and crushed to obtain fine powder. In alternative polysaccharide purification procedures, some studies have described the use of specific treatments (tangential ultrafiltration, trichloroacetic acid, etc.) to remove contaminant biomolecules such as phenolic compounds, pigments, or even salts (Patel et al., 2013; Li et al., 2001; Moore and Tischer, 1964). When marine microalgae cultivations need high salinity conditions, alcoholic precipitation may result in coprecipitation of EPS with salt and, consequently, additional expensive alcohol fractionations are still necessary to remove salts efficiently (Gaignard et al., 2019; Delattre et al., 2016; Patel et al., 2013). Therefore, it is essential to provide tangential ultrafiltration or dialysis methods in order to purify polysaccharides of interest highly from marine microalgae (Delattre et al., 2016; Eteshola et al., 1998).

In a very interesting comparative study realized on EPS from *P. cruentum*, Patel et al. (2013) demonstrated the efficient purification of PS using tangential ultrafiltration achieved with polyethersulfone filtration membrane having a molecular weight cut off of 300 kDa in contrast to conventional alcoholic precipitation. Furthermore, the works of Zhang and Santshchi (2009) and Li et al. (2011) suggest pilot-scale microfiltration and tangential ultrafiltration procedures to

purify EPS highly from *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chaetoceros muelleri*, *Nostoc* sp., and *Spirulina platensis*. Nonetheless, alcoholic precipitations and tangential ultrafiltration conventional methods used to extract and purify PS are not efficient enough to recover all microalgae EPS since, according to the literature, more than 50% of these PS stay bonded to cells during extraction (Gaignard et al., 2019; Delattre et al., 2016). As shown in Fig. 20.1, many alternative extraction forms were developed to extract and concentrate these PS. Among them, physical methods such as sonication, microwave-assisted extraction (MAE), and ultrasound-assisted extraction (UAE) treatments were used to unbond BPS (Gaignard et al., 2019; Delattre et al., 2016; Kurd and Samavati, 2015; Kadam et al., 2013; Budarin et al., 2012; Herrero et al., 2006). Other more specific chemical and/or ionic methods have been recognized for their effectiveness in isolation of BPS from microalgae, such as ethylene diamine tetracetic acid (EDTA), hydroxide sodium (NaOH), formaldehyde (FA), glutaraldehyde (GTA), hot water, and ionic resin treatments (Gaignard et al., 2019; Delattre et al., 2016; Comte et al., 2006; Frølund et al., 1996; Brown and Lester, 1980).

s0025 **20.4 Polysaccharides from microalgae as antiinfectious agents**


s0030 **20.4.1 Antiviral activity of PS from microalgae and cyanobacteria**

p0170 Virus infections are a worldwide issue threatening human and animal health. In the last few years, numerous viral infectious diseases have emerged or reemerged mainly due to an increase of drug resistance. The nature of the viral agent makes the search for antiviral agents particularly difficult. Indeed, these simple life-forms depend completely on the metabolic system and energy of the host cell. Thus, an antiviral drug must on the one hand inhibit the virus in the host cell and on the other hand have no impact on the metabolism of the host. Many antiviral drugs have serious side effects (Poole and Kimberley, 2017), making it essential to discover novel sources of therapeutic compounds. PS are natural macromolecules participating in numerous biological processes such as cell adhesion, cell-to-cell communication, immune response, and infection of bacteria, parasites, and viruses (Dwek, 1996). Studies on the antiviral effects of marine PS are increasing and becoming a new trend in antiviral drugs as they possess a low toxicity and probably a multistep mechanism, meaning lesser selective pressure for the emergence of resistant strains (Yu et al., 2018; Witvrow and DeClercq, 1997; Damonte et al., 2004). In general, PS possess the same antiviral mechanism against enveloped viruses. Ionic interactions between the anionic groups of the PS and glycoprotein's basic amino acids form a complex, limiting the viral adsorption (Raposo et al., 2014).

p0175 Naviculan was isolated from the diatom *Navicula directa*. This sulfated PS consists of Fuc, Xyl, Gal, Man, Rha, and other trace amounts of sugar moieties (Lee et al., 2006). It possesses a broad antiviral spectrum against enveloped viruses such as herpes simplex virus (HSV) type 1 and 2, influenza (IFV) A virus, and human immunodeficiency virus (HIV). It is known that

20 Chapter 20

HSV and IFV infections start by binding to carbohydrates such as heparan sulfate or sialylate residues, localized on the host cell surface. Naviculan interferes with very early stages of viral replication such as viral binding and penetration into host cells. Naviculan also interferes with cell-to-cell fusion between HIV glycoprotein 160 and CD4 expressing cells (Lee et al., 2006). *Arthrospora platensis* produces a sulfated PS known as calcium spirulan, which has shown antiviral activity (Hayashi et al., 1996; Lee et al., 2001). It is composed of Rha, Rib, Man, Fru, Gal, Xyl, Glc, GlcA, GalA, sulfate, and calcium. It inhibits the replication of several enveloped viruses such as HSV type 1, human cytomegalovirus, measles virus, mumps virus, IFV A virus, and HIV-1 by inhibiting the penetration of viruses into host cells (Hayashi et al., 1996; Reichert et al., 2017).

p0180 Another study investigated antivaccinia virus activities of EPS from *Porphyridium purpureum* and *A. platensis* (TK V3). It was shown that these PS inhibit the binding of viruses to cells. A higher antiviral effect was observed when the antiviral treatment and the infection occurred at the same time (Radonić et al., 2010). The use of a cell wall-sulfated PS from *Porphyridium* sp. showed significant antiviral activity against HSV type 1 and 2 and the Varicella zoster virus (VZV) (Huheihel et al., 2002). In this study, it was shown that PS from *Porphyridium* sp. prevents various steps during the life cycle of the HSV and VZV viruses. A strong interaction between HSV-1 particles and *Porphyridium* sp. PS is most likely responsible for the significant inhibition of viral infection. This study also suggests that *Porphyridium* PS has a pleiotropic mode of action during the infection cycle of HSV and probably of VZV. Another study showed that the red microalgal PS from *Porphyridium* sp., *Porphyridium aerugineum*, and *Rhodella reticulata* exhibit antiviral activity against the replication and the transforming ability of two retroviruses: the Moloney murine sarcoma virus and the Moloney murine leukemia virus (Talyshinsky et al., 2002). When cells were treated with PS before or at the time of infection, a  more important inhibitory activity was observed. Part of the inhibitory effect of PS is due to blocking some of the viral receptors, therefore interfering with the penetration of the virus into the host. However, the reversibility of the inhibition suggests that the antiviral activity occurred only on a certain event after proviral integration. The PS of *Porphyridium* sp. seems to possess a pleiotropic mode of action throughout the infection cycle of the Moloney murine sarcoma virus. The application of PS from *Porphyridium* sp. seems to be an interesting option for viral therapy. Indeed, treatment with molecules that possess a pleiotropic mode of action is less likely to result in the development of resistant mutants. The step affected by the use of these PS remains unknown (Talyshinsky et al., 2002; Huheihel et al., 2002).

p0185 Fabregas et al. (1999) showed that endocellular extracts from *P. cruentum*, *Chlorella autotrophica*, *Isochrysis galbana* var Tiso, *Ellipsoidon* sp., and *Dunaliella tertiolecta* were able to inhibit rhabdovirus of viral hemorrhagic septicemia (VHSV) of salmonid fish replication. The extracts from *P. cruentum*, *C. autotrophica*, and *Ellipsoidon* sp. were also capable of inhibiting African swine fever virus (ASVF). Most of the endocellular extracts inhibiting VHSV replication also inhibited the ASVF one, indicating common activity against both enveloped viruses. Additionally, exocellular extracts from these microalgae were also

analyzed, and the results obtained with endocellular extracts were confirmed, except for those from *Isochrysis galbana* var Tiso with both viruses, and from *C. autotrophica* and *D. tertiolecta* with ASFV (Fabregas et al., 1999).

p0190 The *Gyrodinium impudicum* strain KG03 produces an EPS known as p-KGO3, composed of Gal conjugated with uronic acid and sulfate groups (Ahmadi et al., 2015). Yim et al. (2004) studied its activity against the Encephalomyocarditis virus (EMCV). EMCV infects pigs, and can provoke acute focal myocarditis with sudden death in young pigs. p-KGO3 was able either to inhibit completely or to slow down the cytopathic effect in EMCV-infected cells depending on its concentration. Another study reported that p-KGO3 had a great inhibitory activity on the influenza A virus infection but not on all influenza B ones in vitro (Kim et al., 2012). The authors showed that there was no virus replication when p-KGO3 was added during the infection process, meaning that the PS targets the viral adsorption and internalization steps. Therefore, p-KGO3 is capable of preventing the attachment of the virus to host cells, and can also block its cellular internalization and early stages of replications (Kim et al., 2012). *Cochlodinium polykrikoides* produces EPS known as A1 and A2 PS. They are composed of Glc, Gal, Man, and uronic acids with sulfate groups (Ahmadi et al., 2015; Hasui et al., 1995). A1 and A2 were able to inhibit the cytopathogenic effects of HIV-1 in MT-4 cells, influenza virus types A and B in MDCK cells, and respiratory syncytial virus types A and B in Hep-2 cells. However, A1 was shown to be effective against herpes virus type 1 and A2 against parainfluenza virus type 2 in the same cell line HMV-2.

p0195 *N. flagelliforme*, an edible blue-green alga, synthesizes an acidic PS called Nostoflan. It is mainly composed of $(\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1 \rightarrow 4)\text{-D-Xylp}\text{-}(1 \rightarrow$ and $\rightarrow 4)\text{-}[\beta\text{-D-GlcAp}\text{-}(1 \rightarrow 6)\text{-}]\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1 \rightarrow 4)\text{-D-Galp}\text{-}(1 \rightarrow)$. Nostoflan exerts an inhibitory effect on the virus binding process but not on the penetration occurring after its binding (Kanekiyo et al., 2005). Q10
Q11

s0035 **20.4.2 Antibacterial activity of PS from microalgae and cyanobacteria**

p0200 Large-scale screening among marine microalgae, focusing on the identification of antibacterial agents against pathogenic bacteria, has highlighted the potential of EPS (Hu et al., 2015; Mudimu et al., 2014). The antibacterial mechanism of PS remains unclear, but may involve interactions with bacterial cell wall and cytoplasmic membrane, leading to increasing of membrane permeability, protein leakage, and binding with bacterial DNA (Amorim et al., 2012; Pierre et al., 2011; He et al., 2010). The affinity of some bacterial species for sulfated glycoconjugates exposed on the host cell surface suggests the potential action of sulfated EPS and PS from microalgae as antiadhesive therapies (Ofek et al., 1978; Hook et al., 1984). The Q12 reality is, however, not so obvious, as it has been observed for some sulfated EPS from *Tetraselmis* sp., *Neochloris oleobundans*, and *Phaeodactylum tricorutum* inducing 50% inhibition of *Helicobacter pylori* attachment to HeLa cells, whereas sulfated PS from other microalgae species (e.g., *Chlorella capsulata*, *Isochrysis* sp.) had an opposite action on adhesion (Guzman-Morillo et al., 2000).

22 Chapter 20

p0205 This divergent action of sulfated PS indicates that other factors such as structure and composition may play significant roles in antibacterial activity. The red microalga *Porphyridium* sp. has been intensively studied for the production of a sulfated PS (Arad and Levy-Ontman, 2010). The anionic charge of this sulfated galactoxylan suggested a role of platform for metal incorporation, conferring on it its antibacterial activity. An argument in favor of this hypothesis was provided by the study of Netanel et al. (2016), which highlighted the improvement of antibacterial activity combining Zn ions and polysaccharide. A sulfated galactan, obtained from an Israeli strain of *P. cruentum*, was shown to inhibit *Salmonella enteritidis* growth markedly, reducing CFU to 19%, whereas *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were less sensitive to the PS (Raposo et al., 2014). These different activities could be attributed to the structure and composition of the bacterial cell wall, to the lack of a single structure in the bacteria, or to the potential modifications induced by the bacteria toward the chemical structure of the PS (Michael et al., 2002).

p0210 The exploitation of antiadhesive properties of some microalgae PS has led to the study of the activity of PS extracted from *Chlorella* and *Spirulina* on the ability of *H. pylori*-associated gastroduodenal diseases to bind to porcine gastric mucin (Loke et al., 2007). It was found that 35 µg of the PS from *Spirulina* reduced the *H. pylori* adhering to mucin by about 90%, whereas 80 µg of the PS from *Chlorella* was required to achieve this effect, without killing *H. pylori* or affecting gastric epithelial cells. The mechanism involved was not determined, but would be independent of the outer membrane adhesins. To conclude, bioactive PS against bacterial infections are well-documented for PS extracted from macroalgae such as fucoidan and laminarin, which have been successfully exploited in drug delivery to inhibit the growth of *S. aureus* and *E. coli*, or to prevent *H. pylori* biofilm adhesion in gastric mucosa (Shannon and Abu-Ghannam, 2016). PS from microalgae or cyanobacteria have been less explored as antibacterial agents compared to studies describing their biological activities as antiviral agents, antioxidants, immunomodulatory system, antiinflammatory properties, or in health (Raposo et al., 2014).

s0040 20.4.3 Antifungal activities of PS from microalgae and cyanobacteria

p0215 The limited amount of antifungal molecules associated to their high toxicity and the emergence of resistance mechanisms drive researchers to find newer and safer agents (Scorzoni et al., 2017). *Tetraselmis* species are known to produce water-soluble PS (WSPs). These molecules have shown antifungal activities, as they demonstrate abilities to inhibit the growth of *Candida albicans* and *Penicillium italicum*, two fungi involved in human and plant diseases, respectively (Amna Kashif et al., 2018). Indeed, the growth of *C. albicans* was inhibited by 70%–80% using two base (alkali)-extracted WSPs from two different *Tetraselmis* strains. Antifungal activities of EPS have also been demonstrated in the case of the fungi-related parasites called Microsporidia involved in human and animal health (Texier et al., 2010). The

potential of 11 sulfated PS (among them, microalgal ones) was tested to evaluate their antimicrosporidian activity. Two PS extracted from *Porphyridium* spp. showed an in vitro antiparasitic activity of about 95% on a microsporidian model, *Encephalitozoon cuniculi* (Roussel et al., 2015). The EPS from *Porphyridium marinum* was then tested in adult honeybees infected by the microsporidian *Nosema ceranae*, causing an intestinal disease called nosemosis. It allowed a reduction of bee mortality (20%) and parasite load (34%) in laboratory experiments (Roussel et al., 2015). Semifield experiments were also undertaken and indicated that the colonies treated with this EPS showed a decrease of parasite prevalence of about 35%. The amount of parasites was divided by three in foraging bees originating from polysaccharide-treated colonies, reducing parasite pressure and allowing a better vitality of colonies (Roussel, personal communication). The results obtained suggest that microalgal-sulfated polysaccharides could be used to control nosemosis in apiaries.

s0045 **20.5 Bioactivity and structure-activity relationships**

p0220 In this section, the known bioactivities of PS and EPS from microalgae, including antioxidant, antiinflammatory, anticancer, and immunomodulatory properties, will be discussed (Table 20.6).

t0035 **Table 20.6: Biological activities of PS and EPS from marine microalgae.**

Species	Activity	EPS or PS	Reference
<i>Porphyridium cruentum</i>	Antioxidant	EPS	Tannin-Spitz et al. (2005) and Sun et al. (2009)
<i>Graesiella</i> sp.		EPS	Trabelsi et al. (2016)
<i>Rhodella reticulata</i>		EPS	Chen et al. (2010)
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i>		PS	Mohamed (2008)
<i>Tetraselmis</i> species	Anticancer	PS	Dogra et al. (2017) and Amna Kashif et al. (2018)
<i>Arthrospira platensis</i> (formerly <i>Spirulina platensis</i>)		PS	Abd El Baky et al. (2014) and Kurd and Samavati (2015)
<i>Porphyridium cruentum</i>		EPS	Gardeva et al. (2009)
<i>Gymnodinium</i> sp.		EPS	Sogawa et al. (1998) and Umemura et al. (2003)
<i>Tribonema</i> sp.		PS	Chen et al. (2019)
<i>Graesiella</i> sp.		EPS	Trabelsi et al. (2016)
<i>Arthrospira platensis</i> (formerly <i>Spirulina platensis</i>)		PS	Abd El Baky et al. (2014)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		PS	Yang et al. (2019)
<i>Porphyridium cruentum</i>		EPS	Sun et al. (2012)
<i>Thraustochytriidae</i> sp.		EPS	Park et al. (2017) and Yim et al. (2005)
	Immunomodulatory		

Continued

24 Chapter 20

Table 20.6: Biological activities of PS and EPS from marine microalgae—cont'd

Species	Activity	EPS or PS	Reference
<i>Cyrodinium impudicum</i>	Antiinflammatory	EPS	Yim et al. (2007)
<i>Tribonema</i> sp.		PS	Chen et al. (2019)
<i>Chlorella stigmatophora</i> ,		PS	Guzmán et al. (2003)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>			
<i>Pavlova viridis</i>		PS	
<i>Haematococcus pluvialis</i>		PS	Liu et al. (2018)
<i>Arthrospira platensis</i> (formerly		PS	Løbner et al. (2008)
<i>Spirulina platensis</i>)			
<i>Porphyridium cruentum</i>		EPS	Matsui et al. (2003)
<i>Chlorella stigmatophora</i> ,		PS	Guzmán et al. (2003)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Anticoagulant	PS	Dai et al. (2018)
<i>Coccomyxa gloeobotrydiformis</i>		EPS	Ma et al. (2017)
<i>Cryptocodinium cohnii</i>		Ca-PS	Hayakawa et al. (1996, 1997, 2000) and Yamamoto et al. (2003)
<i>Arthrospira platensis</i> (formerly			
<i>Spirulina platensis</i>)			
<i>Rhodella grisea</i>	Antitussive	EPS	Nosálová et al. (2012)
<i>Wollea saccata</i>		EPS	Šutovská et al. (2017)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Antilipidemic, antiglycemic	EPS	Dvir et al. (2000) and Dvir et al. (2009)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Antiaging	EPS	Diaz Bayona et al. (2012)

s0050 **20.5.1 Antioxidant activity and free radical scavenging**

p0225 In their natural environment, microalgae are exposed to different oxidative stresses, including ultraviolet radiation and toxins produced by cyanobacteria (Codd et al., 2005). They have therefore developed protective systems against reactive oxygen species (ROS), generated during normal oxygen metabolism (Pulz and Gross, 2004). According to Mohamed (2008), *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* grow and flourish in the presence of toxins through an increase of their EPS and PS contents. Antioxidant activity involves complex mechanisms that strongly depend on the structural features of microalgae PS. Some of them seem essential, such as sulfate content, sulfation pattern, Mw, and monosaccharide composition. According to Tannin-Spitz et al. (2005), the antioxidant activity of EPS from *P. cruentum* is due to a combination of factors such as its sulfate content (4.5%) and/or the presence of a glycoprotein of 66 kDa. This glycoprotein, noncovalently associated to the negatively charged mucilaginous PS complex, consists of a polypeptide of 58 kDa and a glycan moiety of approximately 8 kDa containing *N*-linked terminal mannose (Shrestha et al., 2004). After denaturation of this glycoprotein, the antioxidant activity of this EPS decreases by 71%.

p0230 The relationship between the antioxidant activity and Mw of *P. cruentum* EPS was also assessed using hermetical microwave degradation to produce PS of various sizes (Sun et al.,

2009). The smallest EPS (6kDa) showed the best antioxidant activity, compared to the other two (60 and 256kDa). Moreover, this enhanced antioxidant potential was confirmed as the 6kDa EPS more efficiently inhibited lipid peroxidation induced by Fe^{2+} /ascorbic acid in liver homogenates from healthy male Kunming mice. Conversely, the superoxide anion radical scavenging activity of EPS from *R. reticulata* was shown to decrease after ultrasonic depolymerization (Chen et al., 2010), revealing that Mw is not the only essential feature involved in antioxidant activity. Sulfate content and pattern must also be considered. Indeed, the content of exposed sulfate esters of the 6kDa *P. cruentum* EPS (17%) was higher than those of the other two (14%) (Sun et al., 2009). Furthermore, despite its high sulfate content of 11%, EPS from *Graesiella* sp. did not show any positive effect on superoxide radical scavenging (Costa et al., 2010), but exhibited high potential as a total antioxidant, ferric chelator, and hydroxyl radical scavenger (Trabelsi et al., 2016). Q13

p0235 The monosaccharide composition may also play a key role as it can differ widely between different microalgae species, even from the same genus. A particular study demonstrated this role very recently, comparing the purified PS from *Tetraselmis* species KCTC 12236 BP, composed of several moieties, Rha, Gal, Glc, Man, and Xyl for the most part, and PS from *Tetraselmis* species KCTC 12432BP, mainly composed of Gal, Glc, and to a lesser extent Rha (Dogra et al., 2017). Only the former had an antioxidant potential, which highlighted the strong influence of the primary structure on the antioxidant activity. In addition to structural features, the method used to produce and isolate microalgae PS may also play a role. Indeed, these authors also showed that the antioxidant activity of PS from *Tetraselmis* species KCTC 12236 BP extracted in neutral, acidic, or basic aqueous solution was not similar. Its scavenging activity was even twofold higher after basic extraction (Amna Kashif et al., 2018). On the other hand, Abd El Baky et al. (2013) demonstrated that the antioxidant activity of PS from *A. platensis* was correlated to culture conditions.

s0055 **20.5.2 Anticancer activity**

p0240 Anticancer treatments, in particular chemotherapy and radiotherapy, are known to cause many side effects. Therefore, there is a compelling need to identify novel effective and nontoxic anticancer compounds from natural sources, and PS from microalgae may be interesting candidates. The anticancer activity of microalgae PS is mainly assessed using antiproliferative assays on tumor cell lines such as leukemic, liver cancer (HepG2), human colorectal adenocarcinoma (Caco-2), primary Graffi tumor, or breast cancer (MCF-7) cell lines. EPS from *Graesiella* sp. exhibits antiproliferative effects on HepG2 and Caco-2 cell lines, but the underlying mechanism remains unclear (Trabelsi et al., 2016). EPS from *Gymnodinium* sp., which consists of a D-galactan sulfate associated with L-(+)-lactic acid, has been revealed to be cytotoxic against several human leukemic cell lines by inducing apoptosis without impacting the cell cycle and mitosis (Sogawa et al., 1998), through the inhibition of DNA topoisomerases I and II—two nuclear enzymes regulating DNA topology (Umemura et al., 2003).

26 Chapter 20

p0245 Very similar results have since been described with other microalgae PS. For example, the proliferation of HepG2, a liver cancer cell line, was shown to be reduced via the increase in cell apoptosis induced by PS from *Tribonema* sp. and *P. tricornutum* (Chen et al., 2019; Yang et al., 2019). According to Gardeva et al. (2009), *P. cruentum* EPS reduces proliferation of primary Graffi tumor cells while it promotes proliferation of bone marrow-derived cells. These results have been confirmed in vivo as *P. cruentum* EPS was proved to decrease transplantability and delay the growth of Graffi myeloid tumors in hamsters, leading to prolonging of survival by about 10–16 days. Moreover, *A. platensis* PS exhibited strong anticancer activity against proliferation of HepG2 (–86%) and MCF-7 (–88%) tumor cells (Abd El Baky et al., 2013).

s0060 20.5.3 Immunomodulatory activity

p0250 Immunomodulating agents act on the innate and adaptive immune responses. Activated macrophages produce increased levels of nitric oxide (NO) and release proinflammatory cytokines. Moreover, immunomodulatory activity is closely related to anticancer activity. Ultrasonic depolymerization of *P. cruentum* EPS was applied by Sun et al. (2012) to produce EPS of various Mw, ranging from 6.553 to 1002 kDa, and assess their effect on NO production by Raw 264.7 macrophages. Low-Mw EPS dose-dependently increased NO production. Moreover, all depolymerized *P. cruentum* EPS were shown to increase the proliferation of splenocytes, which are the primary cells of the adaptive immune system. Again, low-Mw EPS were the most active. Other PS and EPS have been proven to modulate cell proliferation and/or expression levels of cytokines. For example, *Thraustochytriidae* sp.-derived mutant GA produced EPS under gamma radiation that promoted the increase of B cell growth (not T cells), contributing to reinforce the adaptive immune system. It also reduced the release of interleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (IFN- γ) by T cells, but had no effect on tumor necrosis factor- α (TNF- α). IL-6 stimulates the inflammatory and auto-immune processes in many diseases such as atherosclerosis, diabetes, and rheumatoid arthritis (Zhang and An, 2007). This EPS is therefore a candidate for treatment of diseases associated with excessive IL-6 release (Park et al., 2017).

p0255 EPS from the red-tide microalga *G. impudicum* strain KG03, mainly composed of Gal, uronic acid, and sulfate groups, increased in vivo not only the nonspecific immune functions mediated by natural killer cells and macrophages but also the levels of IgM and IgG antibodies, as well as cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α , via a single dose given by gavage to male C57BL/6 mice (Yim et al., 2005). According to Guzman et al. (2003), PS from *Chlorella stigmatophora* and *P. tricornutum* have different effects on the phagocytic activity of macrophages. Indeed, in vitro and in vivo studies have demonstrated that *C. stigmatophora* PS exerts an immunosuppressive activity by reducing phagocytic activity, while *P. tricornutum* PS increases phagocytic activity and is immunostimulant. Other polysaccharides modulate cell proliferation only. PS from *Pavlova viridis* was submitted to free radical depolymerization using the H₂O₂/ascorbate system assisted by ultrasonic waves, to produce two low-Mw polysaccharides, PPS1 and PPS2, with Mw of 386.99 and 54.99 kDa, respectively, and a similar

Q14

sulfate content within the range 15%–18% (Sun et al., 2016). At 50 mg/L, all three polysaccharides significantly stimulated the proliferation of Raw 264.7 macrophages and stimulated their phagocytic activity and NO production, but PPS2 was the most effective. The strong activity of PPS2 is likely to be due to the combination of its low Mw and high uronic acid content (8.5%), which were 2.7- and 1.6-fold higher than those of PPS0 (3.5%) and PPS1 (5.9%), respectively. PS from *Tribonema* sp. has also been shown to increase Raw 264.7 macrophage proliferation and the release of IL-6, IL-10, and TNF- α , at low concentrations ranging from 25 to 200 μ g/mL (Chen et al., 2019). Finally, PS from *H. pluvialis*, and Immulina, a nutritional supplement based on a high-Mw PS from *A. platensis*, have been proved to increase splenocyte and B lymphocyte proliferation at various concentrations (Liu et al., 2018), and to increase *C. albicans*-induced CD4⁺ T-helper cell proliferation in 11 healthy male volunteers for the latter (Løbner et al., 2008).

s0065 20.5.4 Antiinflammatory activity

p0260 Inflammation is a response of the immune system to counteract potentially deleterious agents, including invading viruses, bacteria, and other pathogens. An excessive or deregulated inflammatory response may result in the nonrecovery of tissue health and the onset of a chronic condition (Dai et al., 2018). PS from microalgae are new potential antiinflammatory compounds. A convincing example is the EPS from *P. cruentum*, which both inhibited the migration of polymorphonuclear leukocytes, which are the immune system cells involved in adhesion and chemotaxis during the inflammatory process, and partially ensured their adhesion on endothelial cells (Matsui et al., 2003). The same authors performed a clinical study using balsam of Peru, a natural mixture of resins able to induce inflammatory erythema, which demonstrated that *P. cruentum* EPS inhibits inflammation and that this effect is correlated with the viscosity of the polymer. Guzmán et al. (2003) showed at the same time that low concentrations of PS from *C. stigmatophora* and *P. tricorutum* had significant antiinflammatory effects on rat paw edemas, with IC₅₀ values lower than that of the reference drug indomethacin.

p0265 Very recently, other PS and EPS were shown to reduce the inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS), a potent activator of inflammatory cytokine and chemokine production by macrophages and monocytes. According to Dai et al. (2018), PS from *Coccomyxa gloeobotrydiformis* is able to inhibit the LPS-induced production of NO and prostaglandin E₂ (PGE₂) by reducing the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in Raw 264.7 macrophages. It also suppresses the activation of LPS-induced nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and inhibits the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) such as p38 or c-jun N-terminal kinase (JNK) induced by LPS. In addition, this PS activates the nuclear factor erythroid 2-related factor/heme oxygenase-1 (Nrf2/HO-1) signaling pathway that inhibits inflammatory responses. EPS from *Cryptocodinium cohnii*, composed of a main backbone of (1,6)-linked Manp (61%), (1,6)-linked Glcp (23%), and (1/3,6)-linked Galp (23%) and Rhap

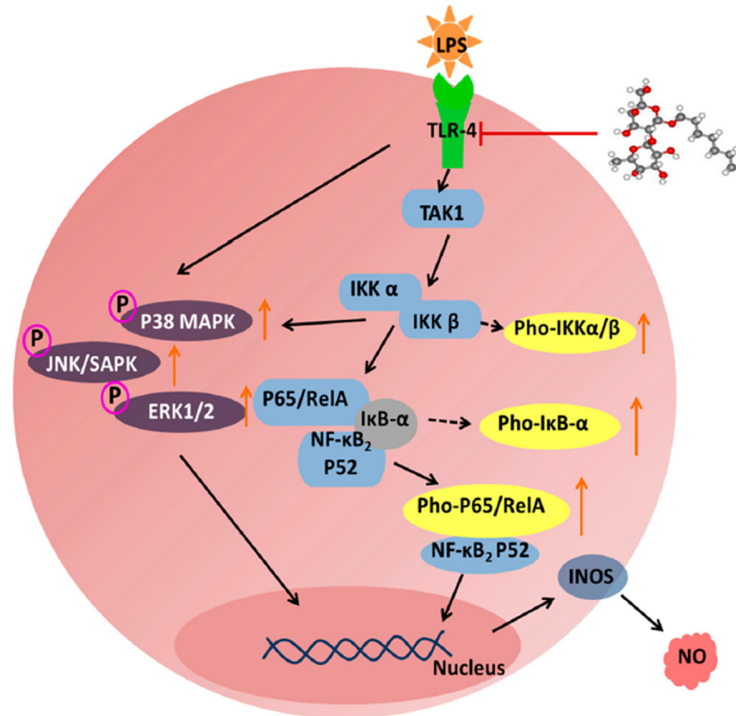


Fig. 20.2

Schematic diagram of the targets proposed by Ma et al. (2017) for the antiinflammatory effects of *C. cohnii* EPS in Raw 264.7 macrophages stimulated by LPS, potentially leading to the inhibition of the proinflammatory cytokines and related mediators.

(3%) as branch and terminal residues, respectively, was also shown to dose-dependently reduce the LPS-induced production of NO and proinflammatory cytokines IL-1 β , IFN- γ , and TNF- α by Raw 264.7 macrophages, without any cytotoxicity (Ma et al., 2017). This study demonstrated that *C. cohnii* EPS was able to inhibit three LPS-induced metabolic pathways (Fig. 20.2): (i) phosphorylation of p38, ERK1/2, and JNK; (ii) expression of toll-like receptor 4 (TLR4) and transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1); and (iii) NF- κ B pathway activation, through the downregulation of κ B inhibitor (I κ B) expression, I κ B- α degradation, and NF- κ B-P65 nuclear translocation. The authors proposed a possible mechanism involving a competitive suppression of the binding of LPS to TLR4 by *C. cohnii* EPS to explain its activity.

20.5.5 Anticoagulant activity

Unlike PS from macroalgae that have been extensively studied during the past 30 years for their anticoagulant activities (Mestechkina et al., 2010), only calcium-spirulan is known for its anticoagulant activity. Different studies have demonstrated that Ca-SP induces a 10,000-fold

increase in antithrombin activity of heparin cofactor II, which is a plasma serine protease inhibitor well-known to reduce coagulation through inhibition of thrombin when associated with heparin or dermatan sulfate. The presence of calcium or another cation (Na-SP) is needed for spirulan activity. From a mechanistic point of view, the study of Hayakawa et al. (2000) involving [Q16](#) different mutations in the N-terminal acidic domain of heparin cofactor II has revealed that, unlike heparin or dermatan sulfate, Ca-SP does not interact with this domain, but only with the anion-binding exosite I. Ca-SP and Na-SP have also been shown to influence the blood coagulation-fibrinolytic activity of human fetal lung fibroblasts or vascular endothelial cells. It was found that SP indirectly enhances the activity of tissue- and urokinase-type plasminogen activators (t-PA and u-PA) that convert the proenzyme plasminogen into plasmin; its active form degrades fibrin through induction of urokinase-type plasminogen activator secretion and inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) secretion (Yamamoto et al., 2003). It is noteworthy that the cation is not required in this case, while the sulfate groups are essential for inhibition of endothelial PAI-1 secretion by Na-SP. The study by Yamamoto et al. indeed showed that desulfated SP was unable to inhibit PAI-1 secretion and even stimulated it.

s0075 **20.5.6 Antitussive activity**

p0275 In the last decades, natural compounds such as alkaloids, flavonoids, and carbohydrates have enriched the portfolio of antitussive agents. *Rhodella grisea*, a unicellular freshwater red microalga, releases an extracellular mucilaginous proteoglycan mainly composed of Xyl (methylated or not) and glucuronic acid. An in vivo study conducted on nonanesthetized cats has demonstrated that *R. grisea* proteoglycan has a cough-relieving effect on a mechanically induced laryngopharyngeal cough, but not on the tracheobronchial part of airway mucosa (Nosálová et al., 2012). More recently, EPS from a freshwater cyanobacterium, *Wolleea saccata*, was reported to suppress the cough reflex induced by chemical tussigen, but with a lower effect than that of codeine, the strongest antitussive agent, while its bronchodilatory effect was similar or even greater than the effect of the reference drug, salbutamol. Moreover, pharmacological studies did not report any toxicity or side effects in animals following administration of this EPS (Šutovská et al., 2017).

s0080 **20.5.7 Antilipidemic and antiglycemic activities**

p0280 Only *P. cruentum* EPS has been studied for its antilipidemic potential. This EPS was shown by Dvir et al. (2000) to decrease weight, as well as plasma cholesterol and cholecystokinin levels, in a male Sprague-Dawley rat model. The authors suggested that metabolic changes could explain morphological ones, and confirmed this by demonstrating that total serum triglyceride and hepatic cholesterol levels were reduced while high-density lipoprotein/low-density lipoprotein (HDL/LDL) ratio and fecal excretion of neutral steroids and bile acids were increased in rats receiving the *P. cruentum* EPS supplemented diet. In addition, this hypocholesterolemic effect could also be due to the high viscosity of *P. cruentum* EPS, which would modify nutriment absorption in the gut (Dvir et al., 2009). Finally, *P. cruentum* EPS

30 Chapter 20

exhibits a possible antiglycemic effect because it has been shown to lower insulin and/or glucose levels in diabetic rodents, without inducing any change in pancreatic island cells, fibrosis, or hemorrhagic necrosis (de Jesus Raposo et al., 2015).

s0085 20.5.8 Antiaging activity

p0285 Microalgae are generally found under the form of extracts in cosmetic studies and preparations, and are essentially used for their antioxidant properties. However, a study assessing *P. cruentum* EPS reported the antiaging potential of this biopolymer for cosmeceutical applications. Indeed, this sulfated high-molecular-weight EPS was proved to inhibit hyaluronidase and elastase, two key enzymes catalyzing the hydrolysis of hyaluronic acid and elastin, respectively, when used at concentrations ranging from 0.25 to 2.5 mg/mL. However, it did not inhibit the bacterial collagenase from *Clostridium histolyticum* (Diaz Bayona et al., 2012). These extracellular matrix-degrading enzymes are involved in the aging-associated alteration of derma that causes skin modifications, such as wrinkle formation and loss in skin elasticity leading to its sagging. They are therefore privileged targets for skin care applications.

s0090 20.6 Future perspectives

p0290 Identifying bioactive components from new renewable natural resources is a major challenge, in particular from microalgae. These microorganisms are capable of synthesizing many various molecules, such as pigments, proteins, lipids, and PS. PS from microalgae and cyanobacteria are of particular interest because they are generally sulfated, exhibit a high molecular weight and viscosity, and have a high constitutive monosaccharide diversity. PS can be extracted from microalgae or released by microalgae in their culture media, leading to EPS. During the last decade, these “old plants” appeared to be the subject of renewed interest back to the production of original metabolites and notably PS. As discussed earlier in this chapter, the biological activities of these biopolymers are real and various, and some authors have attempted to explain them by structure function relationships. The main example is the correlation of sulfate contents of some of these polysaccharides with biological activities. Therefore, it is very surprising that this important literature is not really correlated with the arrival on the market of new PS from microalgae, notably in the therapeutic field. Indeed, even if a recent extract from *P. tricornutum* with high PS content (Sensityl) has been recently marketed by the Givaudan company as a new cosmetic agent for skin treatments, PS from *Porphyridium* species remain the sole commercial success, but exclusively in the cosmetic arena (Gaignard et al., 2019).

p0295 Without claiming to be exhaustive, EPS of *Porphyridium* are exploited by several companies including Frutarom (<http://www.frutarom.com>), Algosource Technology (<http://www.algosource.com>), Microperi Blue Growth (<http://www.micoperibg.com>),

Greensea (<http://greensea.fr/en>), and others. However, all these companies exploit a niche market that is extremely versatile: that of cosmetic products. The size and the high renewal need of this market could, at least superficially, give some opportunities to other PS and EPS from microalgae and cyanobacteria. This naïve verdict does not take into account the existence of the Inventory of Existing Cosmetic Ingredients established by the China Food and Drug Administration (CFDA). This inventory included, in 2015, 8783 existing cosmetic ingredients that have already been used in cosmetics in China. Cosmetic ingredients that are not listed are regarded as new cosmetic ingredients and must be approved by the CFDA before they can be used in cosmetics in China. This complex administrative issue makes suppliers of cosmetic agents very prudent in the development of new products from species of microorganisms not present on this list.

p0300 Even if the costs of production of PS and EPS from microalgae and cyanobacteria are always prohibitive compared to those of terrestrial plant or seaweed polysaccharides to access large markets, such as that of hydrocolloids, they should be able to compete with some animal PS, such as glycosaminoglycans, as therapeutic compounds. However, this market is currently closed to these biopolymers as their structures remain unclear and limited to their sole monosaccharide compositions. The applications for marketing authorization of a medicinal product are very restrictive and require specific data on structure and biological efficiency for all new molecules. The development of modern tools of structural characterization of poly- and oligosaccharides, and notably that of high resolution LC-MS/MS, could resolve part of this problem, opening the way for therapeutic agent developments.

st0110 *References*

- Abd El Baky, H., Hanaa El Baz, K.F., El-Latife, S.A., 2013. Induction of sulfated polysaccharides in *Spirulina platensis* as response to nitrogen concentration and its biological evaluation. *J. Aquac. Res. Dev.* 5.
- Ahmadi, A., Zorofchian Moghadamtousi, S., Abubakar, S., Zandi, K., 2015. Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: a review. *Biomed. Res. Int.* 2015, 825203.
- Allard, B., Tazi, A., 1993. Influence of growth status on composition of extracellular polysaccharides from two *Chlamydomonas* species. *Phytochemistry* 32, 41–47.
- Amna Kashif, S., Hwang, Y.J., Park, J.K., 2018. Potent biomedical applications of isolated polysaccharides from marine microalgae *Tetraselmis* species. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 41 (11), 1611–1620.
- Amorim, R.d.N.d.S., Rodrigues, J.A.G., Holanda, M.L., Quinderé, A.L.G., Paula, R.C.M.D., Melo, V.M.M., Benevides, N.M.B., 2012. Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55, 171–181.
- Arad (Malis), S., Levy-Ontman, O., 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 358–364.
- Bafana, A., 2013. Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydr. Polym.* 95, 746–752.
- Barberousse, H., Ruiz, G., Gloaguen, V., Lombardo, R.J., Djediat, C., Mascarell, G., Castaing, J.C., 2006. Capsular polysaccharides secreted by building façade colonisers: characterisation and adsorption to surfaces. *Biofouling* 22, 361–370.

32 Chapter 20

- Barclay, W.R., Lewin, R.A., 1985. Microalgal polysaccharide production for the conditioning of agricultural soils. *Plant Soil* 88, 159–169.
- Bhosle, N.B., Sawant, S.S., Garg, A., Wagh, A.B., 1995. Isolation and partial chemical analysis of exopolysaccharides from the marine fouling diatom *Navicula subinflata*. *Bot. Mar.* 38, 33–110.
- Brown, M.J., Lester, J.N., 1980. Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 179–185.
- Budarin, V., Ross, A.B., Biller, P., Riley, R., Clark, J.H., Jones, J.M., Gilmour, D.J., Zimmerman, W., 2012. Microalgae biorefinery concept based on hydrothermal microwave pyrolysis. *Green Chem.* 14, 3251–3254.
- Capek, P., Matulová, M., Combourieu, B., 2008. The extracellular proteoglycan produced by *Rhodella grisea*. *Int. J. Biol. Macromol.* 43, 390–393.
- Casadevall, E., Dif, D., Largeau, C., Gudín, C., Chamount, D., Desanti, O., 1985. Studies on batch and continuous culture of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure and phosphate nutrition. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 286–295.
- Chen, B., You, W., Huang, J., Yu, Y., Chen, W., 2010. Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 833–840.
- Chen, X., Song, L., Wang, H., Liu, S., Yu, H., Wang, X., Li, R., Liu, T., Li, P., 2019. Partial characterization, the immune modulation and anticancer activities of sulfated polysaccharides from filamentous microalgae *Tribonema* sp. *Molecules* 24.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 264–272.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) complexation properties. Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 237–245.
- Dai, B., Wei, D., Zheng, N., Chi, Z., Xin, N., Ma, T., Zheng, L., Sumi, R., Sun, L., 2018. *Coccomyxa gloeobotrydiformis* polysaccharide inhibits lipopolysaccharide-Induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *Cell Physiol. Biochem.* 51, 2523–2535.
- Damonte, E.B., Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S., 2004. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr. Med. Chem.* 11, 2399–2419.
- de Jesus Raposo, M.F., De Morais, A.M.M.B., De Morais, R.M.S.C., 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci.* 101, 56–63.
- de Jesus Raposo, M.F., de Morais, A.M.B., de Morais, R.M.S.C., 2015. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar. Drugs* 13, 2967–3028.
- De Philippis, R., Margheri, M.C., Pelosi, E., Ventura, S., 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *J. Appl. Phycol.* 5, 387–394.
- De Philippis, R., Margheri, M.C., Materassi, R., Vincenzini, M., 1998. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1130–1132.
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P., 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 34, 1159–1179.
- Depraetere, O., Pierre, G., Descgoenmaecker, F., Badri, H., Foubert, I., Leys, N., Markou, G., Wattiez, R., Michaud, P., Muylaert, K., 2015. Harvesting carbohydrate-rich *Arthrospira platensis* by spontaneous settling. *Bioresour. Technol.* 180, 16–21.
- Di Pippo, F., Ellwood, N.T.W., Gismondi, A., Bruno, L., Rossi, F., Magni, P., De Philippis, R., 2013. Characterization of exopolysaccharides produced by seven biofilm-forming cyanobacterial strains for biotechnological applications. *J. Appl. Phycol.* 25, 1697–1708.
- Diaz Bayona, K.C., Navarro, G.S.M., Lara, E.A.D., Colorado, R.J., Atehortua, G.L., Martinez, M.A., 2012. Activity of sulfated polysaccharides from microalgae *Porphyridium cruentum* over degenerative mechanisms of the skin. *Int. J. Sci. Adv. Technol.* 2, 85–92.
- Dogra, B., Amna, S., Park, Y.I., Park, J.K., 2017. Biochemical properties of water soluble polysaccharides from photosynthetic marine microalgae *Tetraselmis* species. *Macromol. Res.* 25, 172–179.

- Domozych, C.R., Plante, K., Blais, P., Paliulis, L., Domozych, D.S., 1993. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium*. I. Cytology and biochemistry. *J. Phycol.* 29, 650–659.
- Domozych, D.S., Kort, S., Benton, S., Yu, T., 2005. The extracellular polymeric substance of the green alga *Penium margaritaceum* and its role in biofilm formation. *Biofilms* 2, 129–144.
- Dvir, I., Chayoth, R., Sod-Moriah, U., Shany, S., Nyska, A., Stark, A.H., Madar, Z., Arad, S.M., 2000. Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *Br. J. Nutr.* 84, 469–476.
- Dvir, I., Stark, A.H., Chayoth, R., Madar, Z., Arad, S.M., 2009. Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals produced from the red microalga *Porphyridium* sp in rats. *Nutrients* 1, 156–167.
- Dwek, R.A., 1996. Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* 96 (2), 683–720.
- Ehling-Schulz, M., Bilger, W., Scherer, S., 1997. UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.* 179, 1940–1945.
- Eteshola, E., Karpasas, M., Arad, S., Gottlieb, M., 1998. Red microalga exopolysaccharides: 2. Study of the rheology, morphology and thermal gelation of aqueous preparations. *Acta Polym.* 49 (10–11), 549–556.
- Fábregas, F., García, D., Fernandez-Alonso, M., Rocha, A.I., Gómez-Puertas, P., Escribano, J.M., Otero, A., Coll, J.M., 1999. In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and african swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antiviral Res.* 44, 67–73.
- Farges, B., Laroche, C., Cornet, J.-F., Dussap, C.-G., 2009. Spectral kinetic modelling and long-term behavior assessment of *Arthrospira platensis* growth in photobioreactor under red (620 nm) light illumination. *Biotechnol. Prog.* 25 (1), 151–162.
- Fischer, D., Schlösser, U.G., Pohl, P., 1997. Exopolysaccharide production by cyanobacteria grown in closed photobioreactors and immobilized using white cotton toweling. *J. Appl. Phycol.* 9, 205–213.
- Flaibani, A., Olsen, Y., Painter, T.J., 1989. Polysaccharides in desert reclamation: compositions of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. *Carbohydr. Res.* 190, 235–248.
- Forni, C., Telo, F.R., Caiola, M.G., 1997. Comparative analysis of the polysaccharides produced by different species of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanophyta). *Phycologia* 36, 181–185.
- Freire-Nordi, C.S., Vieira, A.A.H., Nascimento, O.R., 2003. Transport of spin-labelled molecules through the capsule of *Nephrocytium lunatum* (Chlorococcales) studied by electron paramagnetic resonance. *Phycologia* 42, 465–472.
- Freire-Nordi, C.S., Vieira, A.A.H., Nakaie, C.R., Nascimento, O.R., 2006. Effect of polysaccharide capsule of the microalgae *Staurastrum iversenii* var. *americanum* on diffusion of charged and uncharged molecules, using EPR technique. *Braz. J. Phys.* 36, 75–82.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* 30, 1749–1758.
- Gaignard, C., Macao, V., Gardarin, C., Rihouey, C., Picton, L., Michaud, P., Laroche, C., 2018. The red microalga *Flintiella sanguinaria* as a new exopolysaccharide producer. *J. Appl. Phycol.* 30, 2803–2814.
- Gaignard, C., Karkouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S., Michaud, P., 2019. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnol. Adv.* 37, 193–222.
- Gardeva, E., Toshkova, R., Minkova, K., Gigova, L., 2009. Cancer protective action of polysaccharide, derived from red microalga *Porphyridium cruentum*—a biological background. *Biotechnol. Equip.* 23, 783–787.
- Ge, H., Xia, L., Zhou, X., Zhang, D., Hu, C., 2014a. Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polysaccharides from the cyanobacteria *Nostoc* sp. *J. Microbiol.* 53 (2), 179–183.
- Ge, H., Zhang, J., Zhou, X., Xia, L., Hu, C., 2014b. Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polymeric substances from *Microcoleus vaginatus* (Cyanophyceae). *Phycologia* 53, 167–173.
- Geresh, S., Dubinsky, O., Arad, S., Christiaen, D., 1990. Structure of a 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-L-galactopyranose, an aldobiouronic acid isolated from the polysaccharides of various unicellular red algae. *Carbohydr. Res.* 208, 301–305.

34 Chapter 20

- Geresh, S., Lupescu, N., Arad, S., 1992. Fractionation and partial characterization of the sulphated polysaccharide of *Porphyridium*. *Phytochemistry* 31, 4181–4186.
- Geresh, S., Adin, I., Yarmolinsky, E., Karpasas, M., 2002. Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: molecular weight determination and rheological properties. *Carbohydr. Polym.* 50, 183–189.
- Geresh, S., Arad, S.M., Levy-Ontman, O., Zhang, W., Tekoah, Y., Glaser, R., 2009. Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium* sp. *Carbohydr. Res.* 344, 343–349.
- Girollo, D., Vieira, A.A.H., Paulsen, B.S., 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 39, 1109–1115.
- Gloaguen, V., Morvan, H., Hoffmann, L., 1995. Released and capsular polysaccharides of Oscillatoriaceae (Cyanophyceae, Cyanobacteria). *Algol. Stud.* 78, 53–69.
- Gloaguen, V., Morvan, H., Hoffman, L., Plancke, Y., Wieruszkeski, J.M., Lippens, G., Strecker, G., 1999. Capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Eur. J. Biochem.* 266, 1–10.
- Gloaguen, V., Ruiz, G., Morvan, H., Mouradi-Givernaud, A., Maes, E., Krausz, P., Strecker, G., 2004. The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydr. Res.* 339, 97–103.
- Goo, B.G., Baek, G., Choi, D.J., Park, Y.I., Synytsya, A., Bleha, R., Seong, D.H., Lee, C.G., Park, J.K., 2013. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.* 129, 343–350.
- Gouvêa, S.P., Vieira, A.A.H., Lombardi, A.T., 2005. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. *Chemosphere* 60, 1332–1339.
- Guiry, M.D., 2012. How many species of algae are there? *J. Phycol.* 48, 1057–1063.
- Guzmán, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal, M., Calleja, J.M., 2003. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother. Res.* 17, 665–670.
- Guzman-Morillo, M.A., Ascencio, F., 2000. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 473–478.
- Hasui, M., Matsuda, M., Okutani, K., Shigeta, S., 1995. *In vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Int. J. Biol. Macromol.* 17, 293–297.
- Hayakawa, Y., Hayashi, T., Hayashi, K., Hayashi, T., Ozawa, T., Niiya, K., Sakuragawa, N., 1996. Heparin cofactor II-dependent antithrombin activity of calcium spirulan. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 7, 554–560.
- Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., Kojima, I., 1996. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* 59, 83–87.
- He, F., Yang, Y., Yang, G., Yu, L., 2010. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control* 21, 1257–1262.
- Helm, R.F., Huang, Z., Edwards, D., Leeson, H., Peery, W., Potts, M., 2000. Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. *J. Bacteriol.* 182, 974–982.
- Herrero, M., Jaime, L., Martín-Álvarez, P.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2006. Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5597–5603.
- Hokputsa, S., Hu, C., Smestad, P.B., Harding, S.E., 2003. A physico-chemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae. *Carbohydr. Polym.* 54, 27–32.
- Hook, M., Kjellen, L., Johansen, J., 1984. Cell surface glycoaminoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 847–869.
- Hu, C., Liu, Y., Paulsen, B.S., Petersen, D., Klaveness, D., 2003. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydr. Polym.* 54, 33–42.
- Hu, Y., Chen, J., Hu, G., Yu, J., Zhu, X., Lin, Y., Chen, S., Yuan, J., 2015. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Mar. Drugs* 13, 202–221.

- Huang, Z., Liu, Y., Paulsen, B.S., Klaveness, D., 1998. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *J. Phycol.* 34, 962–968.
- Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad, S.M., 2002. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *J. Biochem. Biophys. Methods* 50 (2–3), 189–200.
- Kadam, S.U., Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., 2013. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4667–4675.
- Kanekiyo, K., Lee, J.B., Hayashi, K., Takenaka, H., Hayakawa, Y., Endo, S., Hayashi, T., 2005. Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *J. Nat. Prod.* 68, 1037–1041.
- Kaplan, D., Christiaen, D., Arad, S.M., 1987. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2953–2956.
- Khandeparker, R.D., Bhosle, N.B., 2001. Extracellular polymeric substances of the marine fouling diatom *Amphora rostrata* Wm. Sm. *Biofouling* 17, 117–127.
- Kiemle, S.N., Domozych, D.S., Gretz, M.R., 2007. The extracellular polymeric substances of desmids (Conjugatophyceae, Streptophyta): chemistry, structural analyses and implications in wetland biofilms. *Phycologia* 46, 617–627.
- Kim, M., Yim, J.H., Kim, S.Y., Kim, H.S., Lee, W.G., Kim, S.J., Kang, P.S., Lee, C.K., 2012. In vitro inhibition of influenza A virus infection by marine microalga-derived sulfated polysaccharide p-KG03. *Antiviral Res.* 93 (2), 253–259.
- Klein, G.L., Pierre, G., Bellon-Fontaine, M.N., Zhao, J.M., Breret, M., Maugard, T., Graber, M., 2014. Marine diatom *Navicula jeffreyi* from biochemical composition and physico-chemical surface properties to understanding the first step of benthic biofilm formation. *J. Adhes. Sci. Technol.* 28, 1739–1753.
- Kurd, F., Samavati, V., 2015. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: extraction and in vitro anti-cancer activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 74, 498–506.
- Lama, L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Manca, M.C., Romano, I., Gambacorta, A., 1996. Effect of growth conditions on endo- and exopolymer biosynthesis in *Anabaena cylindrica* 10 C. *Phytochemistry* 42, 655–659.
- Leandro, S.M., Gil, M.C., Delgadillo, I., 2003. Partial characterization of exopolysaccharides exuded by planktonic diatoms maintained in batch cultures. *Acta Oecol.* 24, S49–S55.
- Lee, J.B., Srisomporn, P., Hayashi, K., Tanaka, T., Sankawa, U., Hayashi, T., 2001. Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 108–110.
- Lee, J.B., Hayashi, K., Hirata, M., Kuroda, E., Suzuki, E., Kubo, Y., Hayashi, T., 2006. Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep sea water in Toyama Bay. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (10), 2135–2139.
- Li, P., Liu, Z., Xu, R., 2001. Chemical characterisation of the released polysaccharide from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica* GR02. *J. Appl. Phycol.* 13, 71–77.
- Liu, B., Sun, Z., Ma, X., Yang, B., Jiang, Y., Wei, D., Chen, F., 2015. Mutation breeding of extracellular polysaccharide-producing microalga *Cryptocodinium cohnii* by a novel mutagenesis with atmospheric and room temperature plasma. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 8201–8212.
- Liu, X., Zhang, M., Zhou, A., Cao, Y., Liu, X., 2018. Preliminary characterization of the structure and immunostimulatory and anti-aging properties of the polysaccharide fraction of *Haematococcus pluvialis*. *RSC Adv.* 8, 9243–9252.
- Løbner, M., Walsted, A., Larsen, R., Bendtzen, K., Nielsen, C.H., 2008. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Med. Food* 11, 313–322.
- Loke, M.F., Lui, S.Y., Ng, B.L., Gong, M., Ho, B., 2007. Anti-adhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007 (50), 231–238.

36 Chapter 20

- Ma, X., Xie, B., Du, J., Zhang, A., Hao, J., Wang, S., Wang, J., Cao, J., 2017. The anti-inflammatory effect and structure of EPCP1-2 from *Cryptocodinium cohnii* via modulation of TLR4-NF- κ B pathways in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Mar. Drugs* 15, 376.
- Magaletti, E., Urbani, R., Sist, P., Ferrari, C.R., Cicero, A.M., 2004. Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates produced by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Eur. J. Phycol.* 39, 133–142.
- Maksimova, I.V., Bratkovskaia, L.B., Plekhanov, S.E., 2004. Extracellular carbohydrates and polysaccharides of the algae *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. *Izv. Akad. Nauk Ser. Biol.* 2, 217–224.
- Matsui, M.S., Muizzuddin, N., Arad, S., Marenus, K., 2003. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Appl. Biochem. Biotechnol. A: Enzym. Eng. Biotechnol.* 104, 13–22.
- Merchuk, J.C., Ronen, M., Giris, S., Arad, S.M., 1998. Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp. *Biotechnol. Bioeng.* 59 (6), 705–713.
- Mestechkina, N.M., Shcherbukhin, V.D., 2010. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 46, 267–273.
- Michael, T.M., John, M.M., Jack, P., 2002. *Brock Microbiology of Microorganisms*, 10th ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Mohamed, Z.A., 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology* 17, 504.
- Moore, B.G., Tischer, R.G., 1964. Extracellular polysaccharides of algae: effects on life-support systems. *Science* 145, 586–587.
- Moreno, J., Vargas, M.A., Olivares, H., Rivas, J., Guerrero, M.G., 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.* 60, 175–182.
- Mudimu, O., Rybalka, N., Bauersachs, T., Born, J., Friedl, T., Schulz, R., 2014. Biotechnological screening of microalgal and cyanobacterial strains for biogas production and antibacterial and antifungal effects. *Metabolites* 4, 373–393.
- Myklestad, S., Haug, A., Larsen, B., 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 9, 137–144.
- Najdenski, H.M., Gigova, L.G., Iliev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavský, J., Tsvetkova, I.V., Ninova, M.S., Kussovski, V.K., 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 1533–1540.
- Netanel Liberman, G., Ochbau, M., Malis Arad, S., Bitton, R., 2016. The sulfated polysaccharide from a marine red microalga as a platform for the incorporation of zinc ions. *Carbohydr. Polym.* 152, 658–664.
- Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M.C., De Giulio, A., Gambacorta, A., 1999. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry* 52, 639–647.
- Nie, Z.Y., Xia, J.I., Levert, J.M., 2002. Fractionation and characterization of polysaccharides from cyanobacterium *Spirulina (Arthrospira) maxima* in nitrogen-limited batch culture. *J. Cent. South Univ. Technol.* 9, 81–86.
- Nosál'ová, G., Capek, P., Matáková, T., Nosál', S., Flešková, D., Jureček, L', 2012. Antitussive activity of an extracellular *Rhodella grisea* proteoglycan on the mechanically induced cough reflex. *Carbohydr. Polym.* 87, 752–756.
- Oertel, A., Aichinger, N., Hochreiter, R., Thalhamer, J., Lütz-Meindl, U., 2004. Analysis of mucilage secretion and excretion in *Micrasterias* (Chlorophyta) by means of immunoelectron microscopy and digital time lapse video microscopy. *J. Phycol.* 40, 711–720.
- Ofek, I., Beachey, E.H., Sharon, N., 1978. Surface sugars of animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence. *Trends Biochem. Sci.* 3, 159–160.
- Parikh, A., Madamwar, D., 2006a. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 97, 1822–1827.

- Parikh, A., Madamwar, D., 2006b. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 97 (15), 1822–1827.
- Park, G.-T., Go, R.-E., Lee, H.-M., Lee, G.-A., Kim, C.-W., Seo, J.-W., Hong, W.-K., Choi, K.-C., Hwang, K.-A., 2017. Potential anti-proliferative and immunomodulatory effects of marine microalgal exopolysaccharide on various human cancer cells and lymphocytes in vitro. *Marine Biotechnol.* 19, 136–146.
- Patel, A.K., Laroche, C., Marcati, A., Ursu, A.V., Jubeau, S., Marchal, L., Petit, E., Djelveh, G., Michaud, P., 2013. Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresour. Technol.* 145, 345–350.
- Paulsen, B.S., Vieira, A.A.H., 1994. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 30, 638–641.
- Paulsen, B.S., Haug, A., Myklestad, S., 1975. Structural studies of the extracellular polysaccharide produced by the diatom *Chaetoceros curvisetus* cleve. *Acta Chem. Scand. Ser. B: Org. Chem. Biochem.* 29, 337–340.
- Paulsen, B.S., Aslaksen, T., Freire-Nordi, C.S., Vieira, A.A.H., 1998. Extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 34, 638–641.
- Percival, E., Foyle, R.A.J., 1979. The extracellular polysaccharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*. *Carbohydr. Res.* 72, 165–176.
- Percival, E., Rahman, M.A., Weigel, H., 1980. Chemistry of the polysaccharides of the diatom *Coscinodiscus nobilis*. *Phytochemistry* 19, 809–811.
- Philips, E.J., Zeman, C., Hansen, P., 1989. Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* sp. (Cyanophyta). *J. Appl. Phycol.* 1, 137–145.
- Pierre, G., Sopena, V., Juin, C., Mastouri, A., Graber, M., Maugard, T., 2011. Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16, 937–945.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vacca-Garcia, C., Michaud, P., 2013. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40 (8), 781–796.
- Poole, C.L., Kimberley, D.W., 2017. Antiviral drugs in newborn and children. *Pediatr. Clin. North Am.* 64 (6), 1403–1415.
- Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648.
- Radonić, A., Thulke, S., Achenbach, J., Kurth, A., Vreemann, A., et al., 2010. Anionic polysaccharides from phototrophic microorganisms exhibit antiviral activities to vaccinia virus. *J. Antivir. Antiretrovir.* 2, 051–055.
- Raposo, M.F., de Morais, A.M., de Morais, R.M., 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci.* 101 (1–2), 56–63.
- Raungsomboon, S., Amnat, C., Boosya, B., Duangrat, I., Narumon, W.H., 2006. Production, composition and Pb21 adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*. *Water Res.* 40, 3759–3766.
- Reichert, M., Bergmann, S.M., Hwang, J., Buchholz, R., Lindenberger, C., 2017. Antiviral activity of exopolysaccharides from *Arthrospira platensis* against koi herpes virus. *J. Fish Dis.* 40 (10), 1441–1450.
- Richert, L., Golubic, S., Guédès, R.L., Ratiskol, J., Payri, C., Guezennec, J., 2005. Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from polynesian microbial mats. *Curr. Microbiol.* 51, 379–384.
- Rossi, F., De Philippis, R., 2016. Exocellular polysaccharides in microalgae and cyanobacteria: chemical features, role and enzymes and gens involved in their biosynthesis. In: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds.), *Developments in Applied Phycology 6—The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 565–590.
- Rossi, F., Micheletti, E., Bruno, L., Adhikary, S.P., Albertano, P., De Philippis, R., 2012. Characteristics and role of the exocellular polysaccharides produced by five cyanobacteria isolated from phototrophic biofilms growing on stone monuments. *Biofouling* 28, 215–224.

38 Chapter 20

- Roussel, M., Villay, A., Delbac, F., Michaud, P., Laroche, C., Roriz, D., El Alaoui, H., Diogon, M., 2015. Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydr. Polym.* 133, 213–220.
- Sakamoto, T., Kumihashi, K., Kunita, S., Masaura, T., Sakamoto, K.I., Yamaguchi, M., 2011. The extracellular-matrix-retaining cyanobacterium *Nostoc verrucosum* accumulates trehalose, but is sensitive to desiccation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 385–394.
- Sangar, V.K., Dugan, P.R., 1972. Polysaccharide produced by *Anacystis nidulans*: its ecological implication. *Appl. Microbiol.* 24, 732–734.
- Scorzoni, L., de Paula, E., Silva, A.C., Marcos, C.M., Assato, P.A., de Melo, W.C., de Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Mendes-Giannini, M.J., Fusco-Almeida, A.M., 2017. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Front. Microbiol.* 8, 36.
- Shah, V., Ray, A., Garg, N., Madamwar, D., 2000. Characterization of the extracellular polysaccharide produced by a marine cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and its exploitation toward metal removal from solutions. *Curr. Microbiol.* 40, 274–278.
- Shannon, E., Abu-Ghannam, N., 2016. Antibacterial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications. *Mar. Drugs* 81, 1–23.
- Shrestha, R.P., Weinstein, Y., Bar-Zvi, D., Arad (Malis), S., 2004. A glycoprotein noncovalently associated with cell-wall polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. (rhodophyta). *J. Phycol.* 40, 568–580.
- Singh, J., Saxena, R.C., 2015. An introduction to microalgae: diversity and significance. In: Kim, S.-K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., New York, pp. 11–24.
- Sogawa, K., Kodama, E., Matsuda, M., Shigeta, S., Okutani, K., 1998. Marine microalgal polysaccharide induces apoptosis in human lymphoid cells. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 35–38.
- Staats, N., Winder, B.D., Stal, L.J., Mur, L.R., 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *Eur. J. Phycol.* 34, 161–169.
- Sudo, H., Burgess, J.G., Takemasa, H., Nakamura, N., Matsunaga, T., 1995. Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia*. *Curr. Microbiol.* 30, 219–222.
- Sun, L., Wang, C., Shi, Q., Ma, C., 2009. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 45, 42–47.
- Sun, L., Wang, L., Zhou, Y., 2012. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Polym.* 87, 1206–1210.
- Sun, L., Chu, J., Sun, Z., Chen, L., 2016. Physicochemical properties, immunomodulation and antitumor activities of polysaccharide from *Pavlova viridis*. *Life Sci.* 144, 156–161.
- Šutovská, M., Kočmálová, M., Pappová, L., Fraňová, S., Chyba, A., Kopecký, J., Lukavský, J., Cepák, V., Capek, P., 2017. The chemical profile and pharmacodynamic properties of extracellular *Wolleea saccata* biopolymer. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 863–869.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van Moppes, D., Grossman, S., Arad (Malis), S., 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Appl. Phycol.* 17, 215–222.
- Tease, B., Jürgens, U.J., Golecki, J.R., Heinrich, U.R., Rippka, R., Weckesser, J., 1991. Fine-structural and chemical analyses on inner and outer sheath of the cyanobacterium *Gloeothece* sp. PCC 6909. *Antonie Van Leeuwenhoek* 59, 27–34.
- Tesson, S.V.M., Skjoth, C.A., Šanti-Temkiv, T., Londahl, J., 2016. Airborne microalgae: insights, opportunities, and challenges. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1978–1991.
- Texier, C., Vidau, C., Viguès, B., El Alaoui, H., Delbac, F., 2010. Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 13 (4), 443–449.
- Trabelsi, L., M'sakni, N.H., Ben Ouada, H., Bacha, H., Roudesli, S., 2009. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14, 27–31.
- Trabelsi, L., Trabelsi, L., Ouada, H.B., Bacha, H., Ghoul, M., 2009b. Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Appl. Phycol.* 21, 405–412.

- Trabelsi, L., Chaieb, O., Mnari, A., Abid-Essafi, S., Aleya, L., 2016. Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. *BMC Complement. Altern. Med.* 16, 210.
- Umamura, K., Yanase, K., Suzuki, M., Okutani, K., Yamori, T., Andoh, T., 2003. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* 66, 481–487.
- Urbani, R., Sist, P., Pletikapic, G., Mistic, T., Svetlicic, V., Zutic, V., 2012. Diatom polysaccharides: extracellular production, isolation and molecular characterization. In: Karunaratne, D.N. (Ed.), *The Complex World of Polysaccharides*. IntechOpen, pp. 345–370.
- Usov, A.I., 2011. Polysaccharides of the red algae. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 65, 115–217.
- Vieira, A.A.H., Paulsen, B.S., 1994. Studies on the composition of extracellular polysaccharide produced by *Hyalotheca dissiliens* (Desmidiaceae). *Biologia Bratislava* 49, 535–538.
- Villay, A., Laroche, C., Roriz, D., El Alaoui, H., Delbac, F., Michaud, P., 2013. Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*. *Bioresour. Technol.* 146, 732–735.
- Volk, R.B., Venzke, K., Blaschek, W., 2006. Structural investigation of a polysaccharide released by the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *J. Appl. Phycol.* 19, 255–262.
- Willis, A., Chiovitti, A., Dugdale, T.M., Wetherbee, R., 2013. Characterization of the extracellular matrix of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae): structure, composition, and adhesive characteristics. *J. Phycol.* 49, 937–949.
- Witvrouw, M., De Clercq, E., 1997. Sulphated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.* 29 (4), 497–511.
- Wustman, B.A., Gretz, M.R., Hoagland, K.D., 1997. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). A model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes longipes* and other diatoms. *Plant Physiol.* 113, 1059–1069.
- Yamamoto, C., Nakamura, A., Shimada, S., Kaji, T., Lee, J.-B., Hayashi, T., 2003. Differential effects of sodium spirulan on the secretion of fibrinolytic proteins from vascular endothelial cells: enhancement of plasminogen activator activity. *J. Health Sci.* 49, 405–409.
- Yang, S., Wan, H., Wang, R., Hao, D., 2019. Sulfated polysaccharides from *Phaeodactylum tricorutum*: isolation, structural characteristics, and inhibiting HepG2 growth activity in vitro. *PeerJ.* 7.
- Ye, Y., Le Clech, P., Chen, V., Fane, A.G., 2005. Evolution of fouling during crossflow filtration of model EPS solutions. *J. Membr. Sci.* 264, 190–199.
- Yim, J.H., Kim, S.J., Ahn, S.H., Lee, C.K., Rhie, K.T., Lee, H.K., 2004. Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Mar. Biotechnol.* 6, 17–25.
- Yim, J.H., Son, E., Pyo, S., Lee, H.K., 2005. Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity *in vivo*. *Mar. Biotechnol.* 7, 331–338.
- You, T., Barnett, S.M., 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.* 19, 251–258.
- Yu, Y., Shen, M., Song, Q., Xie, J., 2018. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review. *Carbohydr. Polym.* 183, 91–101.
- Zhang, J.-M., An, J., 2007. Cytokines, inflammation and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27–37.
- Zhang, S.J., Santschi, P.H., 2009. Application of cross-flow ultrafiltration for isolating exopolymeric substances from a marine diatom (*Amphora* sp.). *Limnol. Oceanogr. Methods* 7, 419–429.
- Zhang, G.J., Ji, S.L., Gao, X., Liu, Z.Z., 2008. Adsorptive fouling of extracellular polymeric substances with polymeric ultrafiltration membranes. *J. Membr. Sci.* 309, 28–35.

st0115 **Further reading**

Q17

- Talyshinsky, M.M., Souprun, Y.Y., Huleihel, M.M., 2002. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell Int.* 2, 8.

These proofs may contain colour figures. Those figures may print black and white in the final printed book if a colour print product has not been planned. The colour figures will appear in colour in all electronic versions of this book.

B978-0-12-818536-0.00020-8, 00020

Jacob-Lopes, 978-0-12-818536-0

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter SPi. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

Non-Print Items

Abstract

Polysaccharides are macromolecules based on glycosidically linked combinations of up to 40 different monosaccharides, sometimes substituted by nonsugar groups such as alcohols, organic acids, or sulfates. Those from animals, terrestrial plants, marine macroalgae, and nonphotosynthetic microorganisms are widely exploited by industry as biological agents in various fields including agronomy, medicine, cosmetic, nutrition, and others. Microalgae and cyanobacteria are eukaryotic and prokaryotic unicellular photosynthetic organisms with a vast phylogenetic diversity that are known to produce large quantities of extracellular polysaccharides. Except for those from *Porphyridium* strains, polysaccharides from microalgae have been poorly investigated in the past for their biological activities, as the culture of these microorganisms was frequently a challenge. However, the recent development of technologies for production (photobioreactors) and treatment (downstream processes) of microalgal biomass give researchers access to original biopolymers with unique structures and compositions, making them very attractive for bioprospecting. This chapter aims to describe the state of the art in the field of bioactive polysaccharides from microalgae.

Keywords: Polysaccharide, Exopolysaccharides, Microalgae, Cyanobacteria

Résumé

Les microsporidies sont des parasites eucaryotes unicellulaires apparentés aux champignons et responsables de parasitoses chez de nombreux organismes hôtes, dont l'Homme. Les microsporidies utilisent différentes stratégies d'adhésion et d'invasion des cellules hôtes, parmi lesquelles l'extrusion d'un tube polaire harponnant et véhiculant la forme infectieuse à l'intérieur des cellules hôtes. À ce jour, seules quelques protéines ont été identifiées comme impliquées dans l'adhésion, mais leur neutralisation par des essais d'inhibition ne suffit pas à éliminer complètement l'infection, suggérant l'implication d'autres acteurs moléculaires. Dans cette étude, nous avons combiné des approches de surfomics et *in silico* dans le but d'une part d'identifier de nouveaux candidats protéiques potentiellement impliqués dans les processus d'infection de deux microsporidies (*Encephalitozoon cuniculi* et *Anncaliia algerae*), et d'autre part de déterminer leur rôle dans l'infection par des tests fonctionnels d'inhibition. Ces approches ont permis d'identifier les protéines de type Ricin-B-like, *EcRBLL-1*, *AaRBLL-1* et *AaRBLL-2*, présentant une localisation au niveau de la paroi et/ou du tube polaire de la spore. Les tests fonctionnels d'inhibition, basés sur l'utilisation des protéines recombinantes et d'anticorps associés aux 3 protéines, ont révélé une diminution significative de la prolifération d'*E. cuniculi* et d'*A. algerae*, suggérant leurs rôles dans le processus d'adhésion/infection. En parallèle, l'étude d'autres protéines *EcSWP7*, *EcSWP9*, *EcSWP12* et *EcSWP26*, identifiées à l'appui des données de la littérature et complétées par une analyse *in silico*, a conduit à mettre en évidence une localisation pariétale de la spore et du tube polaire chez *E. cuniculi*. Enfin, l'approche surfomics par l'intermédiaire d'un décapage de la paroi des spores au SDS chaud a permis la sélection, chez *A. algerae*, de 6 protéines candidates (*AaRBLL-1*, *AaP6BE05*, *AaP13YM*, *AaP696T*, *AaP3569*, *AaP04039*, *AaP03248*) pour évaluer leur rôle dans l'infection.

L'effet anti-microsporidien d'un polysaccharide issu de la microalgue rouge *Porphyridium marinum* (PM) a également été exploré dans le but de comprendre les mécanismes d'actions impliqués. Il semblerait que ce composé puisse agir à la surface des cellules hôtes et ainsi bloquer l'adhésion des spores aux cellules. En parallèle, un criblage de nouveaux polysaccharides a été réalisé pour rechercher de nouvelles molécules anti-microsporidiennes qui pourraient agir en combinaison avec le polysaccharide PM, notamment pour traiter *Nosema ceranae*, responsable de la nosérose des abeilles. Trois polysaccharides ont permis de diminuer de manière significative la charge parasitaire des abeilles infectées.

Mots clés : Microsporidies, *Encephalitozoon cuniculi*, *Anncaliia algerae*, invasion, Ricin-B lectin, adhésion, protéines de surface, motifs de liaisons aux carbohydrates, polysaccharides, *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*