



HAL
open science

Diversité et rôle écologique des microsporidies dans les écosystèmes aquatiques

Marina Chauvet

► **To cite this version:**

Marina Chauvet. Diversité et rôle écologique des microsporidies dans les écosystèmes aquatiques. Ecologie, Environnement. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC057 . tel-04062654

HAL Id: tel-04062654

<https://theses.hal.science/tel-04062654v1>

Submitted on 7 Apr 2023

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.

École doctorale 65 : Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Clermont Auvergne
Spécialité Microbiologie (Écologie microbienne)

Présentée et soutenue publiquement par
Marina Chauvet

Diversité et rôle écologique des microsporidies dans les écosystèmes aquatiques

Devant le jury composé de :

Urania Christaki	Rapportrice	PR, Université du Littoral Côte d'Opale
Laure Guillou	Rapportrice	DR, Station biologique de Roscoff
Benjamin Misson	Examineur	MCF, Université de Toulon
Raffaele Siano	Examineur	CR, IFREMER
Frédéric Delbac	Président du jury	PR, Université Clermont Auvergne
Cécile Lepère	Directrice de thèse	MCF, Université Clermont Auvergne

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement
UMR CNRS 6023, F-63000, Clermont-Ferrand

Soutenue le 25 novembre 2022

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Urania Christaki et Laure Guillou d'avoir accepté d'être rapportrices de ce manuscrit. Merci également à Benjamin Misson, Raffaele Siano et Frédéric Delbac de faire partie de ce jury. Je tenais également à remercier Isabelle Domaizon et David Bass qui, avec Raffaele Siano, m'ont apporté de précieux conseils durant mes comités de thèse.

Je tenais à remercier Aurore Dubuffet ainsi que toute l'équipe IHP avec qui j'ai démarré mes recherches sur les microsporidies, dès mon stage de Master.

Merci à ceux qui ont contribué à rendre certaines manips possibles : Marine et Alexandre pour les daphnies, Ivan pour les cultures, Vincent pour les paramécies, Hermine et Jonathan pour les nombreux prélèvements, Gisèle pour ses précieux conseils en bio-info, et bien évidemment Bobby and Clyde pour leur aide précieuse tout au long de cette thèse !

Mon plus grand des mercis va bien évidemment à Cécile, ma directrice de thèse. J'ai énormément appris en travaillant à tes côtés, et même les mois les plus intenses ont toujours été agréables. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir essayé de me faire prendre confiance en moi. Merci pour les moments les plus sympas (les conférences, les sorties terrains, les quelques jours entre La Rochelle et Arcachon, *etc.*) et aussi pour les moments à peine moins sympas (22 x 2 x 2 x 2 ne font définitivement pas 88, mais bien 176, j'ai recompté...). Je n'aurais pas pu avoir une meilleure directrice de thèse !

Merci, merci et encore merci à l'équipe MEB, vous êtes les meilleurs ! Je regrette l'avant covid, quand on avait l'habitude de prendre le café tous ensemble, mais la bonne humeur a toujours été de mise avec vous. Encore un merci tout particulier à Anne et Agnès (je parlais de vous un peu plus haut, au cas où vous auriez oublié qui étaient Bobby et Clyde) !

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à rendre ces années aussi sympathiques. Merci tout particulièrement à Marine, Thomas, Victorien, et « les petits » Nathan, Marine et PL. Je vous remerciais également d'arrêter de spammer vos conneries dans « les litres » !

Merci mille fois pour tout à ma famille, et désolée de n'avoir pas été très présente ces derniers mois. Un merci tout particulier à ma sœur qui a toujours été là quand il le fallait. Merci aussi à ma deuxième famille, les fufu !

Les copains, quelques lignes ne suffiraient pas à tout vous dire mais je pense que vous en savez déjà beaucoup. Merci pour tout, je me rends compte de la chance que j'ai de vous avoir dans ma vie. Merci à toi Nas (et ta petite famille), tu peux être fière de tout ce que tu as accompli depuis que je te connais. Laura, Maxime, Arthur, je vous aime ! Vous m'êtes tellement précieux... Merci d'être les personnes que vous êtes.

Enfin merci Maxime, je ne serais jamais arrivée au bout de cette thèse sans toi. Merci pour ta patience, ta compréhension et tout ton amour. Ça n'a pas toujours été facile d'être en thèse en même temps mais on l'a fait ! Qui aurait cru ça 10 ans plus tôt ? J'ai hâte de vivre toutes les aventures qui nous attendent encore ! Je t'aime.

Marina Chauvet

Doctorante

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE) - UMR 6023, Aubière

+33 (0)661560706
chauvet.marina.pro@gmail.com

Expériences de recherche

- Depuis octobre 2018 **Doctorat**, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR 6023 – Encadrement : C. Lepère
Sujet : Diversité et rôle écologique des microsporidies dans les écosystèmes aquatiques
Description : Etude de diversité via métabarcoding et recherche d'hôtes par des approches bio-informatiques, microscopiques et de single-cell
- Janvier 2018 – Juillet 2018 **Stage Master 2**, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR 6023 – Encadrement : C. Lepère & A. Dubuffet
Sujet : Microsporidies parasites d'eucaryotes en milieu lacustre
Description : Recherche d'hôtes microscopiques par analyse bio-informatique de données de métabarcoding et par microscopie à épifluorescence
- Mai 2017 – Juillet 2017 **Stage Master 1**, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR 6023 – Encadrement : A. Dubuffet
Sujet : Hybridation *in situ* en fluorescence de microsporidies dans des cellules hôtes
Description : Mise au point de l'utilisation d'une sonde universelle microsporidies
- Avril 2014 – Juillet 2014 **Stage IUT**, Centre de Recherches Biologiques, Baugy – Encadrement : A. Maurin
Sujet : Mise au point de l'implantation d'un cathéter en intrathécal chez le rat

Communications scientifiques

- Articles **Marina Chauvet**, Arthur Monjot, Cécile Lepère. Microsporidian diversity and planktonic hosts: from lakes to ocean. In revision (*Limnology and Oceanography*).
- Corinne Biderre-Petit & Jean-Christophe Charvy, Gisèle Bronner, **Marina Chauvet**, et al. FreshOmics: a manually curated and standardized -omics database for investigating freshwater microbiomes. 2022. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13692>
- Marina Chauvet** & Arthur Monjot, Anne Moné, Cécile Lepère. Single cell analysis reveals a new Microsporidia-host association in a freshwater lake. 2022. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02023-7>
- Marina Chauvet**, Didier Debroas, Anne Moné, Aurore Dubuffet & Cécile Lepère. Temporal variations of Microsporidia diversity and discovery of new host-parasite interactions in a lake ecosystem. 2022. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15950>
- Aurore Dubuffet, **Marina Chauvet**, Anne Moné, Didier Debroas, Cécile Lepère. A phylogenetic framework to investigate the microsporidian communities through metabarcoding and its application to lake ecosystems. 2021. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15618>
- Communications orales Marina Chauvet, Didier Debroas, Anne Moné, Aurore Dubuffet & Cécile Lepère. Microsporidies en milieu lacustre : diversité temporelle et découverte de nouveaux hôtes. 2021. *10ème colloque de l'Association Francophone d'Écologie Microbienne (AFEM)*, online.
- Marina Chauvet, Didier Debroas, Anne Moné, Aurore Dubuffet, Cécile Lepère. Etendue de la diversité et du spectre d'hôte des microsporidies en milieu lacustre. 2021. *9ème Journée Des Doctorants du LMGE*, Clermont Ferrand, FRANCE.
- Marina Chauvet, Aurore Dubuffet, Cécile Lepère. Diversity and ecological roles of Opisthosporidia, cryptic fungi in lacustrine ecosystems. 2019. *7ème Journée Des Doctorants du LMGE*, Clermont Ferrand, FRANCE.
- Posters Marina Chauvet, Cécile Lepère. Microsporidian diversity and planktonic hosts: from lakes to ocean. 2022. *Gordon Research Conference on Marine Microbes*, Les Diablerets, SUISSE.
- Marina Chauvet, Aurore Dubuffet, Anne Moné, Didier Debroas, Cécile Lepère. Extent of Microsporidia diversity and host range in lake ecosystems. 2021. *24èmes Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE*, Clermont-Ferrand, FRANCE.
- Marina Chauvet, Aurore Dubuffet, Anne Moné, Didier Debroas, Cécile Lepère. Extent of Microsporidia diversity and host range in lake ecosystems. 2021. *69th Annual meeting of the British Phycological Society with Protistology-UK*, online. Prize for the presentation of a highly recommended poster.
- Marina Chauvet, Aurore Dubuffet, Anne Moné, Didier Debroas, Cécile Lepère. Microsporidies : jusqu'où s'étend leur spectre d'hôtes ? 2019. *9ème colloque de l'Association Francophone d'Écologie Microbienne (AFEM)*, Bussang, FRANCE.

Encadrement de stage

Mai 2021 – Août 2021	Encadrement d'un stage de Master 1 Master mention Microbiologie, parcours : Génome, Ecologie et Physiologie Microbienne Sujet : Etude du parasitisme et de son rôle dans le réseau trophique lacustre
Janvier 2020 – Juillet 2020	Participation à l'encadrement d'un stage de Master 2 Master mention Microbiologie, parcours : Génome, Ecologie et Physiologie Microbienne Sujet : Diversité, rôle écologique et cycle cellulaire des micro-eucaryotes parasites dans les écosystèmes lacustres
Mai 2019 – Juillet 2019	Encadrement d'un stage de Master 1 Master mention Microbiologie, parcours : Bioprocédés, Biostatistiques Sujet : Optimisation d'un protocole d'hybridation in situ appliqué aux échantillons environnementaux

Compétences

Informatique	Pack Office, R, LATEX
Langues	Français – langue maternelle Anglais – score TOEIC 865 (2018)
Techniques	Microbiologie : microscopie en épifluorescence, FISH, TSA-FISH, isolation cellule unique Biologie moléculaire : PCR, extractions ADN et ARN, qPCR Bio-informatique : traitement de données issues de métabarcoding, analyse de diversité microbienne Culture de microorganismes Échantillonnage environnemental

Formations

2022	Training School: "Identification and detection methods for aquatic zoosporic parasites" (Germany)
2019 / 2020	Cours en ligne (MOOC) : intégrité scientifique dans les métiers de la recherche / statistiques sous R
2019	Formation en bio-informatique : initiation à la ligne de commande, utilisation d'un cluster de calcul, traitement de données NGS
2019	Formation aux risques en milieu aquatique
2014	Certificat d'expérimentation animale niveau 2
2014	Attestation de formation aux gestes et soins d'urgence (AFGSU) niveau 2

Enseignement

2020 – 2021	55 heures d'enseignement Travaux Pratiques en 1ère année de Licence Sciences de la Vie Unité d'Enseignement : Diversité des êtres vivants
-------------	--

Cursus scolaire

2017 – 2018	Master 2 , mention Microbiologie, parcours : Génome, Ecologie et Physiologie Microbienne – UCA Clermont-Ferrand Mention Bien (14,01/20), classement 4/21
2016 – 2017	Master 1 , mention Biologie et Environnement, spécialité Microbiologie : Génome, Ecologie et Biotechnologies – UBP Clermont-Ferrand Mention Assez Bien (13,79/20), classement 6/58
2014 – 2016	Licence , mention Sciences de la Vie, parcours : Biologie Cellulaire et Physiologie – UBP Clermont-Ferrand Mention Assez Bien (13,71/20 sur la L3)
2012 – 2014	DUT , Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques – UDA Clermont-Ferrand

Divers

Organisation de la 8ème Journée Des Doctorants du LMGE (JDD) (2020)

Co-crédation et implication dans l'Organisation des Jeunes Chercheurs en Ecologie (OJCE) – Association loi 1901. <https://ojce.fr>.

Résumé

Les microsporidies constituent un vaste groupe de parasites eucaryotes unicellulaires intracellulaires obligatoires apparentés aux champignons, connus principalement comme parasites de vertébrés et d'invertébrés. En effet, celles-ci sont couramment décrites comme parasites d'organismes d'intérêt tels que les insectes auxiliaires, les poissons et crustacés comestibles, ou encore l'Homme. Ces parasites sont présents dans tous types d'environnements, mais plus de 69% des microsporidies sont retrouvées en milieux aquatiques. Dans ces milieux, les microsporidies sont connues pour impacter les communautés de crustacés et de poissons mais il n'existe en revanche que très peu de descriptions de microsporidies parasites d'organismes à la base du fonctionnement des réseaux trophiques (*e.g.* protistes, microplancton). Leur impact sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques est donc largement méconnu et non pris en compte. L'objectif de ces travaux de thèse était donc de révéler l'étendue de la diversité des microsporidies et de leur spectre d'hôtes dans les écosystèmes aquatiques. Pour cela, nous avons étudié la diversité des microsporidies au cours du temps et dans différents environnements *via* une approche de métabarcoding que nous avons préalablement adaptée à ce groupe de parasites. Nous avons également évalué quels pouvaient être leurs hôtes parmi les protistes et les organismes planctoniques à l'aide de différentes approches complémentaires (réseaux de cooccurrence, hybridation *in situ*, isolement de couples hôte-parasite). Nous avons ainsi révélé une diversité insoupçonnée de microsporidies dans les environnements aquatiques, dont une proportion non négligeable n'était affiliée à aucun genre, montrant ainsi qu'une part importante de cette diversité reste encore à décrire. Nous avons également identifié différents nouveaux hôtes dans ces environnements, dont le rôle est majeur dans le fonctionnement des réseaux trophiques. En effet, nous avons pu identifier des hôtes parmi les rotifères, les ciliés ou encore les dinoflagellés. Nous émettons donc l'hypothèse que les microsporidies, à l'instar d'autres parasites, ont le potentiel d'impacter la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques, en raison de leur diversité dans ces écosystèmes et leur spectre d'hôte particulièrement large. La contribution relative de ces parasites dans la régulation des communautés à la base du fonctionnement des réseaux trophiques reste maintenant à mettre en lumière.

Abstract

Microsporidia are a diverse phylum of unicellular eukaryotes related to Fungi. They are obligate intracellular parasites known to parasitize primarily vertebrates and invertebrates. They are commonly described as parasites of organisms of interest such as auxiliary insects, edible fish and crustaceans, and humans. These parasites are present in all types of environments, but more than 69% of Microsporidia are found in aquatic environments. In these environments, Microsporidia are known to impact crustacean and fish communities, but there are very few descriptions of Microsporidia infecting organisms at the basis of the food web functioning (*e.g.* protists, microplankton). Their impact on the structure and functioning of aquatic ecosystems is therefore largely unknown and not taken into account. The objective of this thesis work was therefore to reveal the extent of the microsporidian diversity and their host spectrum in aquatic ecosystems. To do this, we studied the microsporidian diversity over time and in different environments through a metabarcoding approach that we previously adapted to this group of parasites. We also evaluated which of the protists and planktonic organisms could be microsporidian hosts using different complementary approaches (co-occurrence networks, *in situ* hybridization, isolation of host-parasite couples). We have thus revealed an unsuspected diversity of Microsporidia in aquatic environments, a significant proportion of which was not affiliated with any genus, showing that a significant part of this diversity remains to be described. We have also identified various new hosts in these environments, whose role is major in the trophic food web functioning. Indeed, we were able to identify hosts among rotifers, ciliates and dinoflagellates. We therefore hypothesize that Microsporidia, like other parasites, have the potential to impact the structure and functioning of aquatic food webs thanks to their diversity and their particularly broad host spectrum. The relative contribution of these parasites in the regulation of the communities at the base of the food webs needs to be highlighted.

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Contexte bibliographique	
I. Le parasitisme.....	5
1. Les parasites et leur impact sur les réseaux trophiques	5
2. Diversité et impact des parasites eucaryotes microbiens dans les écosystèmes aquatiques	9
II. Les microsporidies	17
1. Généralités	17
1.1. Caractéristiques générales et cycle de développement	17
1.2. Classification et diversité	21
1.3. Spectre d'hôtes et habitats	25
2. Les microsporidies dans les milieux aquatiques	29
2.1. Diversité des microsporidies aquatiques.....	29
2.2. Impact sur les populations hôtes	33
III. Objectifs de la thèse et organisation du mémoire.....	37
Chapitre II : Principales méthodes utilisées	
I. Métabarcoding.....	43
1. Prélèvements et conservation des échantillons.....	43
2. Extractions d'acides nucléiques.....	45
3. Amplification par PCR	47
4. Analyse des amplicons et affiliation taxonomique	49
II. Réseaux de cooccurrence	51
III. TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification – Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization).....	55
1. Design et mise au point de l'utilisation d'une sonde universelle pour la détection des microsporidies	57
2. Préparation des filtres environnementaux.....	59
3. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH).....	61
4. Amplification du signal par réaction du Tyramide (TSA).....	61
5. Observation des lames	61
Chapitre III : Définition d'un cadre phylogénétique pour l'étude des communautés de microsporidies par métabarcoding et application aux écosystèmes lacustres	
Contexte de l'étude.....	67
I. Abstract	69
II. Introduction	71
III. Experimental procedures	73
IV. Results and discussion.....	83
V. Conclusion.....	101

Chapitre IV : Variations temporelles de la diversité des microsporidies et découverte de nouvelles interactions hôte-microsporidie dans un écosystème lacustre

Contexte de l'étude.....	129
I. Abstract	131
II. Introduction	133
III. Experimental procedures	135
IV. Results	145
V. Discussion	153
VI. Conclusion.....	163

Chapitre V : Découverte d'une nouvelle association hôte-microsporidie dans un lac d'eau douce par Single Cell

Contexte de l'étude.....	191
I. Abstract	193
II. Note	193

Chapitre VI : Diversité des microsporidies et hôtes planctoniques : des lacs aux océans

Contexte de l'étude.....	211
I. Abstract	213
II. Introduction	215
III. Materials	217
IV. Results and discussion.....	223
V. Conclusion.....	239

Chapitre VII : Discussion générale et perspectives

I. Les microsporidies dans les écosystèmes aquatiques : une diversité insoupçonnée.....	253
II. Étendue du spectre d'hôtes des microsporidies aquatiques.....	261
III. Conclusion générale	271

Références bibliographiques des chapitres I, II et VII

Table des figures et tableaux

Figure 1 : Représentation des effets de différentes relations symbiotiques entre deux espèces.....	4
Figure 2 : Schéma de réseau trophique de complexité intermédiaire.....	6
Figure 3 : Exemple de l'effet d'un parasite sur les interactions trophiques et la structure d'un écosystème.....	8
Figure 4 : Arbre phylogénétique des eucaryotes.	10
Figure 5 : Proportion des parasites parmi les pico-eucaryotes dans le lac Pavin.	12
Figure 6 : Impact des chytrides dans le fonctionnement des réseaux trophiques.	14
Figure 7 : Chronologie de l'évolution de la position taxonomique des microsporidies, depuis leur découverte en 1857 jusqu'à aujourd'hui.....	16
Figure 8 : Schéma de l'ultrastructure d'une spore de microsporidie.	18
Figure 9 : Exemples de formes des spores de microsporidies les plus répandues.....	18
Figure 10 : Cycle de développement généralisé des microsporidies.	20
Figure 11 : Compaction du locus de l'ADNr des microsporidies vers une organisation de type procaryotique.	20
Figure 12 : Phylogénie des microsporidies classées en cinq clades.	22
Figure 13 : Distribution des hôtes des microsporidies dans les phyla de métazoaires et protistes.....	24
Figure 14 : Exemple de cas d'hyperparasitisme chez les microsporidies aquatiques.	26
Figure 15 : Diagramme de Venn représentant les principaux environnements dans lesquels vivent les hôtes des microsporidies.....	28
Figure 16 : Phylogénie récente des microsporidies en lien avec leur environnement.....	28
Figure 17 : Hôtes des microsporidies en milieu aquatique.....	30
Figure 18 : Exemples d'effets de l'infection par les microsporidies chez divers hôtes.	32
Figure 19 : Sites d'échantillonnage.	42
Figure 20 : Illustration des différentes étapes de la méthode TSA-FISH.....	54
Figure 21 : Mise au point des conditions d'utilisation de la sonde USP01.	58
Figure 22: Microsporidian phylogenetic tree based on full length SSU rDNA of 265 microsporidian species and six outgroup taxa.	88
Figure 23: Krona chart representing the affiliation of the 1531 OTUs found in the analysis.	92
Figure 24: Maximum Likelihood phylogeny of abundant OTUs affiliated to the Arlequin group (clade IV2) with other sequences belonging to this group.	94
Figure 25: Maximum Likelihood phylogeny of abundant OTUs not assigned to any group, within clade IV2, with other sequences belonging to this clade.....	96
Figure 26: A. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination of the microsporidian OTU relative abundances across samples based on Bray-Curtis distances. B. Relative abundance of identified microsporidian taxa across samples.	98

Figure 27: Taxonomic affiliation of the microsporidian OTUs.....	144
Figure 28: Relative abundances of the most abundant microsporidian genera/subgroups.....	146
Figure 29: Relative abundances of the most abundant eukaryotic phyla.	148
Figure 30: Sankey diagram showing the edges between microsporidian OTUs and eukaryotic OTUs in the co-occurrence network.....	150
Figure 31: Microsporidia infecting a rotifer (genus <i>Kellicottia</i>).	152
Figure 32: Microsporidia attached to a diatom (genus <i>Asterionella</i>) and infecting a ciliate (genus <i>Stentor</i>).	152
Figure 33: Maximum likelihood phylogeny of microsporidian sequences.	194
Figure 34: Microsporidia infecting a rotifer (genus <i>Kellicottia</i>).	196
Figure 35: Sample collection sites.	216
Figure 36: Krona charts representing the taxonomic affiliation of the microsporidian OTUs retrieved in freshwater (A) and marine (B) samples.....	222
Figure 37: Relative abundances of the most abundant microsporidian genera across freshwater and marine samples.	224
Figure 38: Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Bray-Curtis distances of the microsporidian OTUs relative abundances across samples.....	226
Figure 39: Relative abundances of the most abundant eukaryotic phyla across freshwater and marine samples.	232
Figure 40: Diagrams showing the positive correlations between microsporidian OTUs and eukaryotic OTUs in freshwater (A) and marine (B) ecosystems.....	234
Figure 41: Microsporidia infecting dinoflagellates in freshwater and marine samples.....	236
Figure 42 : Arbre phylogénétique des microsporidies présentant un nouveau cadre taxonomique. ...	258
Figure 43 : Marquages de microsporidies par FISH et DY96 (marqueur de chitine).	266
Table 1 : Informations relatives aux prélèvements pour les études de métabarcoding	44

Introduction générale

Afin de comprendre le fonctionnement des écosystèmes aquatiques et leur évolution face aux changements environnementaux, il est indispensable de connaître les modalités de transfert de matière et d'énergie au sein des réseaux trophiques. Les travaux des dernières décennies ont montré que les réseaux n'étaient pas seulement structurés autour d'une chaîne linéaire (basée sur l'assimilation photosynthétique) mais qu'ils incluaient également la boucle microbienne, véritable réseau trophique microbien, connecté à la chaîne trophique classique (Azam *et al.*, 1983). Il est donc devenu nécessaire de prendre en compte une diversité importante de groupes fonctionnels afin de modéliser le fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques. Parmi eux, les parasites semblent avoir un impact capital sur la structure des communautés. En effet, les parasites pourraient représenter une part importante de la diversité, les estimations variant de 30 à 71% tous écosystèmes confondus (Price, 1980 ; De Meeûs et Renaud, 2002 ; Dobson *et al.*, 2008). De plus, le parasitisme représenterait jusqu'à 78% des interactions trophiques au sein d'un écosystème (Lafferty *et al.*, 2006). Les parasites pourraient ainsi impacter des organismes situés à tous les niveaux et dans tous les compartiments des réseaux trophiques.

Ainsi, décrypter la diversité des parasites et leurs interactions avec les autres organismes est une étape clé vers la compréhension des flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes aquatiques, afin d'anticiper les réactions de ces écosystèmes face aux modifications environnementales (changements globaux, apports en nutriments, pollution, *etc.*). Depuis le début des années 2000, le développement des techniques moléculaires a permis une meilleure description de la diversité génétique et de la structure des communautés d'eucaryotes microbiens aquatiques (Lopez-Garcia *et al.*, 2001 ; Moon Van Der Staay *et al.*, 2001). Une importante diversité de parasites a notamment été mise en évidence dans les environnements marins et lacustres, où ceux-ci sont relativement abondants (Guillou *et al.*, 2008 ; Lefèvre *et al.*, 2008 ; Cleary et Durbin, 2016 ; Debroas *et al.*, 2017). Ces parasites peuvent jouer des rôles majeurs dans la structuration des populations hôtes (Chambouvet *et al.*, 2008 ; Kagami *et al.*, 2014), et il devient ainsi évident de les intégrer dans les modélisations de fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

Cependant, certains groupes de parasites demeurent absents de ces études visant à décrire la diversité des eucaryotes microbiens (Bass *et al.*, 2015). C'est le cas des microsporidies, parasites eucaryotes intracellulaires obligatoires, dont la diversité et les impacts restent grandement sous-estimés dans les écosystèmes aquatiques.

CHAPITRE I

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

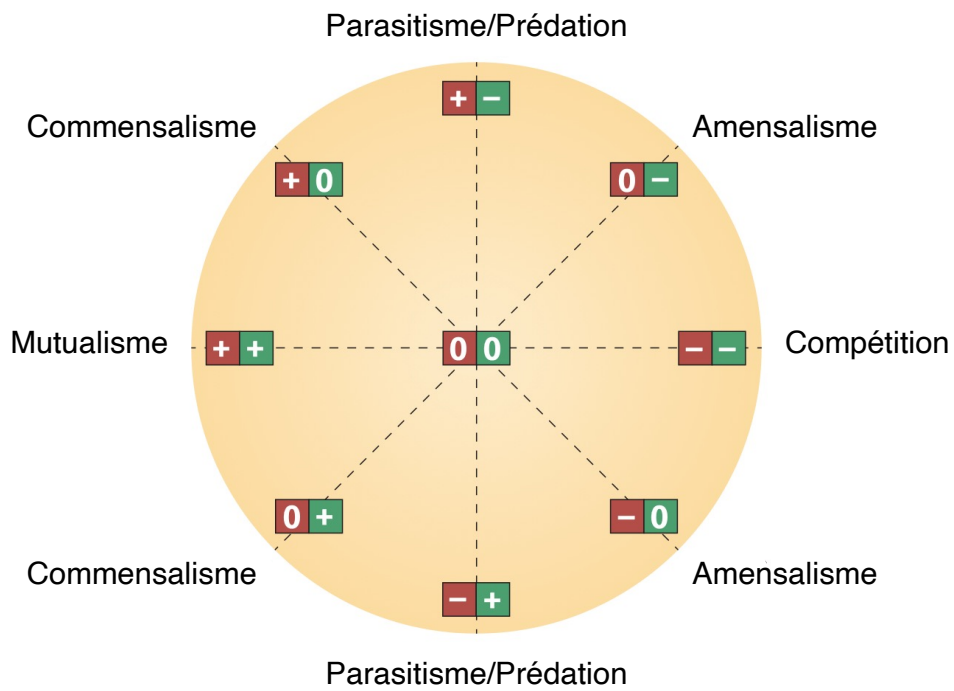


Figure 1 : Représentation des effets de différentes relations symbiotiques entre deux espèces.

Pour chaque partenaire de l'interaction (rouge : espèce 1 ; vert : espèce 2), il existe trois effets possibles de l'interaction : positif (+), négatif (-) et neutre (0). Modifié d'après Faust et Raes, 2012

I. Le parasitisme

1. Les parasites et leur impact sur les réseaux trophiques

Dans tous les écosystèmes, les individus de différentes espèces sont en constante interaction les uns avec les autres. Ces interactions sont très diverses de par leurs effets, elles sont obligatoires, facultatives ou opportunistes et peuvent être ponctuelles ou durables, rendant les individus plus ou moins interdépendants. Les interactions durables sont qualifiées de symbiotiques et sont diverses de par leurs impacts sur les différents partenaires. On retrouve ainsi généralement les interactions suivantes : mutualisme, prédation, parasitisme, commensalisme, compétition, amensalisme et neutralisme (**Figure 1**). Cependant, une interaction entre deux partenaires peut évoluer au cours du temps et varier en intensité, il est donc important de voir ces interactions comme étant dynamiques (Thompson, 1988).

Parmi les interactions interspécifiques, le parasitisme est le mode de vie le plus courant sur terre (Price 1980 ; Windsor 1998 ; Lafferty 2010). Le parasitisme est une relation biologique entre deux êtres vivants lors de laquelle le parasite tire profit (en se nourrissant, en s'abritant et/ou en se reproduisant) d'un autre organisme appelé hôte, généralement sans le tuer à court terme mais au détriment de celui-ci (Combes, 1995). Le parasitisme est un type d'interaction entre le consommateur et sa « ressource » tout comme la prédation, mais contrairement aux prédateurs, les parasites sont généralement plus petits que leurs hôtes, et vivent de façon permanente ou pendant une phase du cycle vital aux dépens de leur hôte. Ils vivent à la surface (ectoparasites) ou au sein (endoparasites) de leur hôte. Une distinction est également faite entre les macroparasites (helminthes, arthropodes, ...) et les microparasites (virus, bactéries, protistes, champignons) (Anderson et May, 1979).

Cependant, bien que cette interaction soit parmi les plus répandues, le rôle des parasites dans le fonctionnement des réseaux trophiques ainsi que leur impact sur la biologie de leurs hôtes, ont longtemps été sous-estimés (Marcogliese et Cone, 1997). En effet, les parasites n'étaient autrefois perçus que comme des organismes de faible biomasse par rapport aux organismes libres. Malgré leurs implications au niveau de la dynamique d'une population, leurs effets étaient considérés comme limités sur les écosystèmes (Windsor, 1997, 1998). Les premiers modèles de fonctionnement des réseaux aquatiques étaient ainsi constitués d'une chaîne trophique linéaire (ou chaîne alimentaire) basée sur l'assimilation photosynthétique par le phytoplancton (producteurs primaires) et les transferts d'énergie et de matière aux maillons

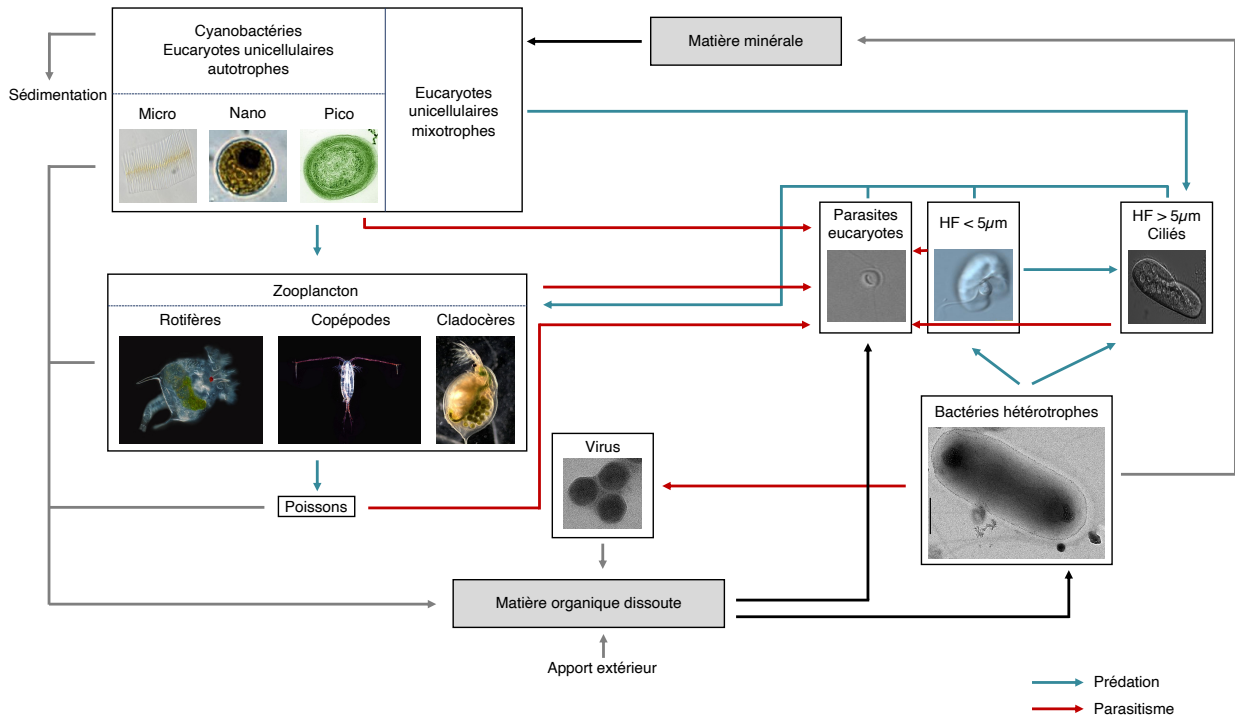


Figure 2 : Schéma de réseau trophique de complexité intermédiaire.

La chaîne trophique linéaire « initiale » (ou chaîne alimentaire) est représentée sur la gauche, partant du phytoplancton (producteurs primaires) et allant jusqu'aux poissons. Au schéma linéaire classique s'ajoute un compartiment bactérien ainsi que les protistes hétérotrophes, formant la boucle microbienne (sur la droite du schéma), qui représente la circulation de la matière organique *via* les bactéries et l'activité de broutage des protistes flagellés et ciliés, eux même consommés par le zooplancton. Les flèches bleues représentent les interactions de type prédation, les flèches rouges montrent l'impact des parasites. HF = flagellés hétérotrophes ; pico : 0,2-2 µm ; nano : 2-20 µm ; micro : 20-200 µm.

trophiques supérieurs (zooplancton et poissons) (Wetzel et Manny, 1972) (**Figure 2**). Ce schéma linéaire résultait de méthodes d'échantillonnage, de conservation et d'observation adaptées aux organismes planctoniques de grande taille et non aux plus petits. Par la suite, les avancées dans le domaine de l'écologie microbienne ont permis d'ajouter le concept de boucle microbienne au sein de ces réseaux trophiques (Azam *et al.*, 1983), mettant ainsi en évidence l'importance du compartiment microbien dans la productivité des écosystèmes aquatiques (Pomeroy *et al.*, 2007) (**Figure 2**). Le modèle de chaîne alimentaire classique a ainsi été remplacé par un modèle plus complexe de relations trophiques prenant en compte les plus petits éléments du plancton. En effet, le réseau trophique microbien est connecté de manière directe et indirecte au réseau trophique classique *via* les phénomènes de prédation, d'excrétion et de recyclage des éléments nutritifs (Pomeroy *et al.*, 2007) (**Figure 2**).

Il est ensuite apparu que les parasites étaient bien plus abondants dans les écosystèmes qu'initialement décrit, et qu'ils représentaient ainsi une importante biomasse. Il a par exemple été montré que la biomasse de différents groupes de parasites était équivalente à la biomasse des prédateurs dans différents estuaires (Kuris *et al.*, 2008). La quantité d'interactions hôte-parasite a également été montrée comme équivalente à celle des interactions prédateur-proie dans différents écosystèmes aquatiques, marins et d'eau douce (Lafferty *et al.*, 2006 ; Amundsen *et al.*, 2009). Hudson et collaborateurs, en 2006, ont également démontré que les parasites sont d'une importance majeure pour la biodiversité et la production, affirmant ainsi qu'« un système sain est un système riche en espèces parasites ». L'importance des parasites dans les écosystèmes aquatiques a ainsi été réévaluée (Lafferty *et al.*, 2008 ; Kagami *et al.*, 2014) et ils sont maintenant pris en compte dans les modèles de fonctionnement des réseaux trophiques (**Figure 2**). Leur introduction a augmenté la complexité de ces réseaux et a révélé des impacts à la fois qualitatifs (allongement des chaînes alimentaires, efficacité des transferts de carbone augmentée par exemple) et quantitatifs, sur le fonctionnement de l'écosystème aquatique (Grami *et al.*, 2011 ; Niquil *et al.*, 2011).

Concernant leurs impacts sur les hôtes, les parasites affectent la fitness de ces derniers et interviennent dans la structuration des communautés (Hudson *et al.*, 2002). Ils peuvent affecter l'hôte de différentes façons : (1) en modulant le comportement de ce dernier afin d'être transmis, (2) en orientant sa physiologie afin de l'exploiter au maximum, (3) en agissant sur son système immunitaire afin de survivre, (4) en intervenant sur la dynamique de sa population, (5) en réduisant la compétition interspécifique (un parasite peut tuer l'un de ses hôtes et n'avoir

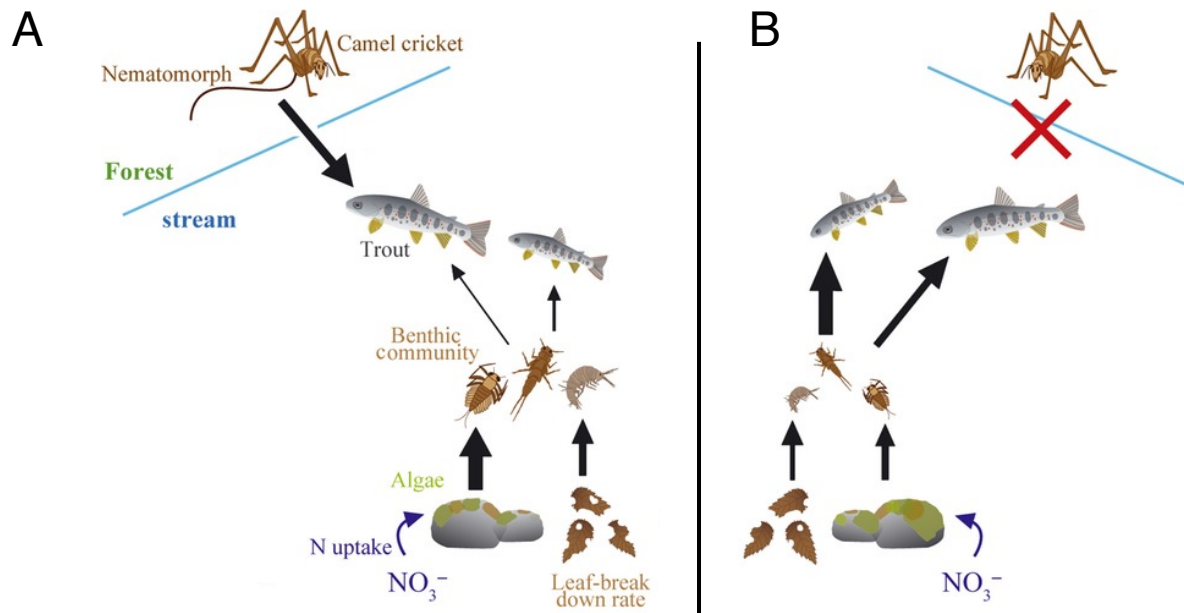


Figure 3 : Exemple de l'effet d'un parasite sur les interactions trophiques et la structure d'un écosystème.

Les flèches noires indiquent les interactions directes de consommation, leur taille indiquant la force de chaque interaction. Les interactions sont représentées (A) en présence du parasite, (B) en son absence.

Modifié d'après Sato *et al.*, 2012

aucun effet sur un autre) et (6) en modifiant le sex-ratio de l'espèce hôte (Dajoz, 2006). De par ces différents modes d'action, le parasitisme peut ainsi avoir un impact spécifique sur une espèce donnée mais aussi impacter un écosystème entier. De nombreux parasites sont en effet impliqués dans des cascades trophiques (Buck et Ripple, 2017 ; Sures *et al.*, 2017). Un parasite nématomorphe est par exemple capable de modifier la structure d'un écosystème de rivière en manipulant le comportement de son hôte orthoptère, l'amenant à pénétrer dans des habitats aquatiques, ce qui permettra au parasite de continuer son cycle de vie. Lorsque des orthoptères infectés sont présents dans l'eau, les truites vont modifier leur régime alimentaire en se nourrissant de ceux-ci et vont alors consommer moins d'invertébrés benthiques (réduction de 50% de la consommation), ce qui réduit finalement la biomasse des algues benthiques et augmente le taux de décomposition des feuilles (Sato *et al.*, 2012) (**Figure 3**). Ce parasite possède donc un effet direct sur la mortalité de son hôte, mais également un effet indirect en modulant les autres niveaux trophiques et le recyclage de la matière organique, impactant ainsi la stabilité du réseau trophique.

D'un point de vue global, les parasites ont donc des effets directs sur leurs hôtes de par leur virulence (effet sur la survie et la fécondité), ainsi que des effets indirects entraînant des cascades trophiques et une modulation des compétitions interspécifiques (Sures *et al.*, 2017 ; Combes, 2018). L'étude de leurs diversités et de leurs rôles écologiques est ainsi essentielle afin de mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

2. Diversité et impact des parasites eucaryotes microbiens dans les écosystèmes aquatiques

Le développement des techniques moléculaires et du séquençage haut-débit a permis une meilleure description de la diversité génétique et de la structure des communautés d'eucaryotes microbiens aquatiques (Lopez-Garcia *et al.*, 2001 ; Moon Van Der Staay *et al.*, 2001). En s'affranchissant des approches culturelles, ces études ont révélé l'existence de nouveaux groupes phylogénétiques (*e.g.* Burki *et al.*, 2021). Les travaux réalisés ces deux dernières décennies sur les eucaryotes microbiens dans les écosystèmes aquatiques ont notamment mis en évidence des parasites microscopiques dont on ne suspectait pas la présence dans de telles proportions (Guillou *et al.*, 2008 ; Cleary et Durbin, 2016 ; Debroas *et al.*, 2017). Ces parasites

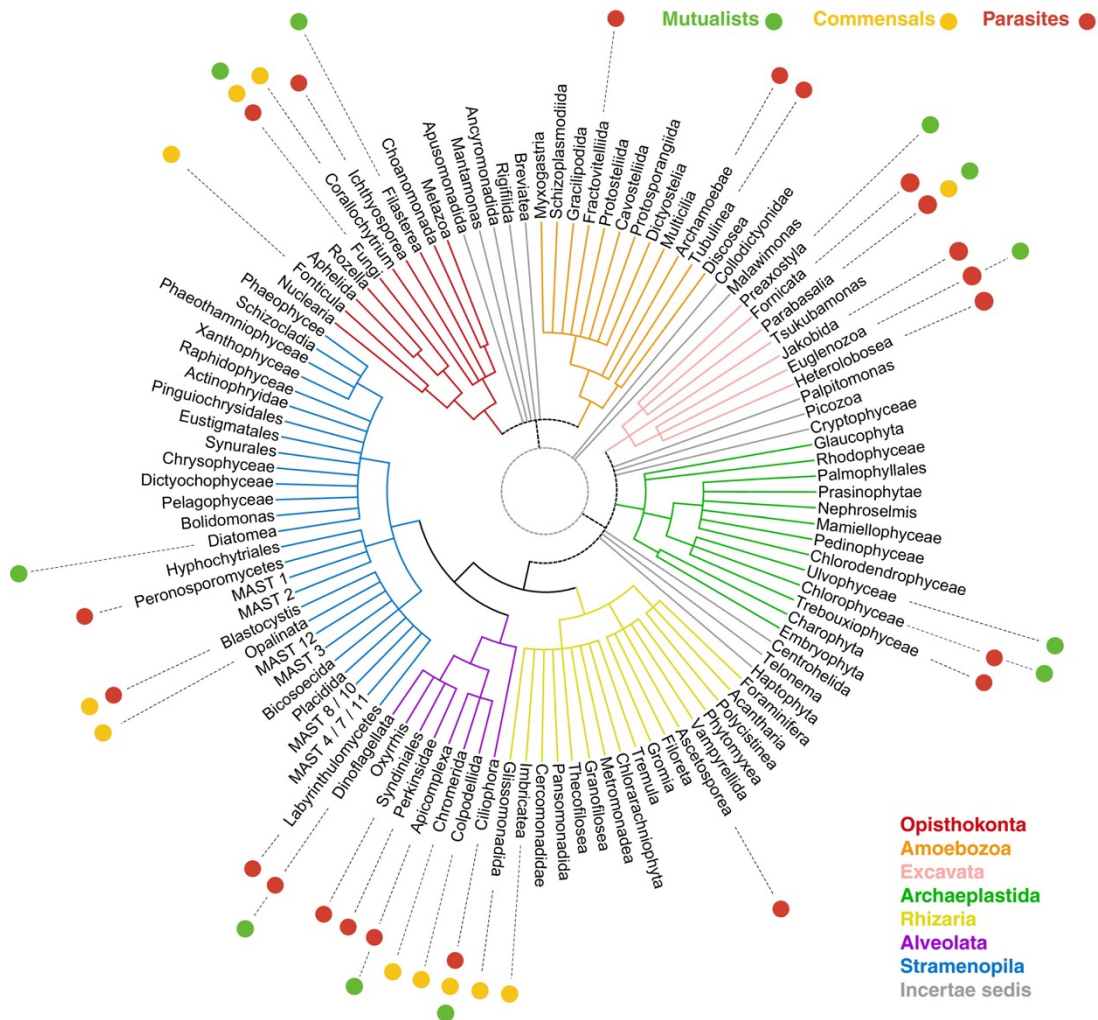


Figure 4 : Arbre phylogénétique des eucaryotes.

Les points de couleurs indiquent les groupes dans lesquels sont retrouvés des organismes mutualistes (vert), commensalistes (jaune) et parasites (rouge). Seuls les groupes pour lesquels une relation symbiotique avec les animaux a été documentée sont reflétés dans l'arbre. Les couleurs des branches représentent les « supergroupes » eucaryotes, bien que ceux-ci aient été reconsidérés depuis (voir Burki *et al.*, 2020). Modifié d'après del Campo *et al.*, 2020

« caractérisés » pour la plupart sur la base de séquences environnementales sont retrouvés dans différents phyla de l'arbre des eucaryotes (**Figure 4**).

Une grande majorité des parasites sont retrouvés parmi les champignons, les alvéolés, les Rhizaria et les straménopiles (Lefèvre *et al.*, 2008 ; Skovgaard, 2014 ; de Vargas *et al.*, 2015 ; Debroas *et al.*, 2017). Les champignons sont ubiquistes, certains sont saprophytes (décomposeurs de matière organique), d'autres sont parasites de divers organismes (phytoplancton, zooplancton, poissons) dans différents milieux aquatiques (Jobard *et al.*, 2010a ; Gleason *et al.*, 2011). Les alvéolés représentent quant à eux l'un des principaux groupes d'eucaryotes dans les écosystèmes marins (Coats *et al.*, 1996), comprenant différents phyla contenant tous des parasites (ciliés, Perkinsea, dinoflagellés, apicomplexes). Les alvéolés parasites sont ainsi très divers, et infectent des hôtes qui le sont tout autant. Les Perkinsea par exemple, identifiés en milieu marin et d'eau douce, sont majoritairement décrits comme parasites de bivalves et d'organismes phytoplanctoniques (Jobard *et al.*, 2020 ; Reñé *et al.*, 2021). Les straménopiles sont également très diversifiés et relativement abondants, et contiennent le phylum des oomycètes, connus principalement comme parasites de diatomées et d'algues brunes (Sekimoto *et al.*, 2008 ; Garvetto *et al.*, 2018). Les Cercozoa (Rhizaria), quant à eux, incluent entre autres des espèces parasites de mollusques et arthropodes (Azevedo et Hine, 2016).

Ces parasites représentent une partie non négligeable de la diversité eucaryote en milieux aquatiques. En milieu lacustre une étude a par exemple révélé que les parasites potentiels (sur la base de séquences environnementales affiliées à des groupes parasites) pouvaient représenter entre 18 et 31% (en fonction des saisons et des zones) des eucaryotes de taille inférieure à 5µm (Lefèvre *et al.*, 2008) (**Figure 5**). En milieu marin, Cleary et Durbin (2016) ont montré que les parasites représentaient plus de la moitié des séquences eucaryotes en hiver dans les eaux profondes. Un seul groupe de parasite peut même à lui seul représenter ponctuellement une part très importante de la diversité eucaryote, comme les Perkinsea, atteignant plus de 32% des séquences dans un étang en juin 2012 (Simon *et al.*, 2015).

La diversité des parasites en milieux aquatiques est souvent dominée par les champignons, notamment les chytrides, ainsi que les dinoflagellés (Guillou *et al.*, 2008 ; Jobard *et al.*, 2012, de Vargas *et al.*, 2015). Les chytrides (phylum Chytridiomycota) jouent un rôle crucial dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Ils sont abondants particulièrement en eau douce, où ils peuvent être saprophytes et parasites (Monchy *et al.*, 2011 ; Sime-Ngando, 2012 ;

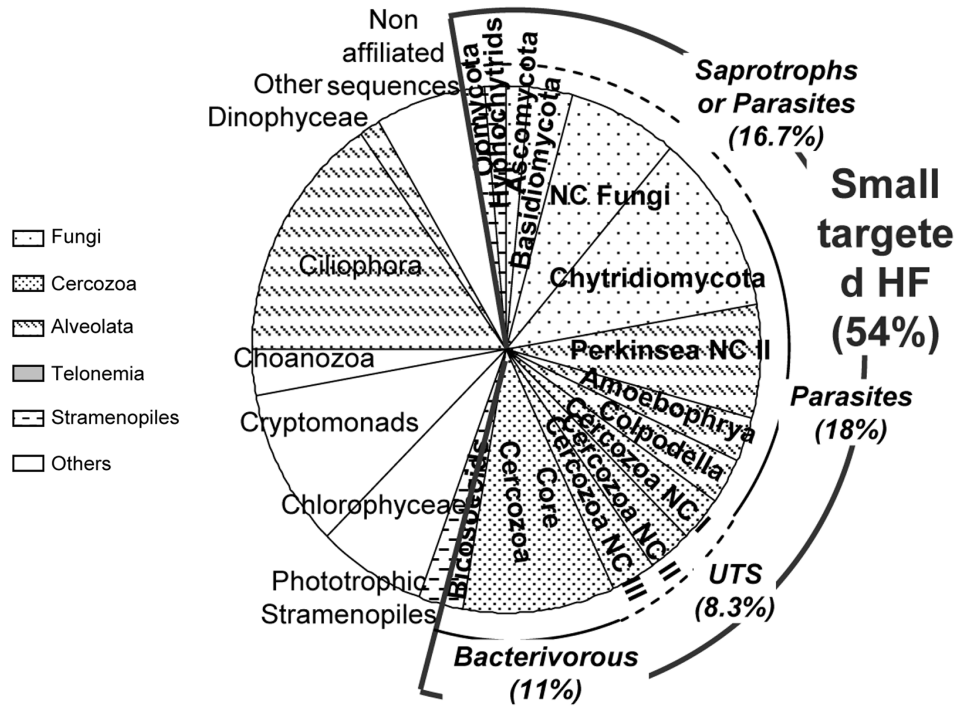


Figure 5 : Proportion des parasites parmi les pico-eucaryotes dans le lac Pavin.

Ce graphique représente les abondances relatives des OTUs dans la fraction picoplanctonique du lac Pavin en automne 2004. HF = flagellés hétérotrophes ; NC = sans représentants cultivés ; UTS = stratégie trophique non définie. Modifié d'après Lefèvre *et al.*, 2008

Laundon et Cunliffe, 2021). En milieu lacustre, les chytrides peuvent atteindre 10^9 zoospores par litre, bien que cette abondance soit très variable en fonction des saisons et des milieux (Kagami *et al.*, 2014). Les avancées techniques ont permis de les redécouvrir, notamment leur abondance, mais le contrôle des communautés algales par les chytrides est connu depuis longtemps (Canter et Lund, 1948). Il existe plusieurs centaines d'espèces de chytrides connues pour infecter principalement des espèces phytoplanctoniques, mais également le zooplancton, d'autres champignons, les plantes et les animaux (Sparrow, 1960 ; Gleason *et al.*, 2008 ; Jobard *et al.*, 2010b ; Rasconi *et al.*, 2011). Les chytrides peuvent être responsables de mortalités massives chez leurs hôtes, provoquant par exemple des changements dans la distribution et la succession du phytoplancton, ainsi que le retard ou la suppression des blooms (Frenken *et al.*, 2017). Leurs effets sur le phytoplancton sont particulièrement étudiés, et illustrent parfaitement les impacts que peuvent avoir les parasites sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Kagami *et al.*, 2014) (**Figure 6**). Les zoospores des chytrides constituent une excellente nourriture pour le zooplancton en termes de taille (2-5 μm de diamètre), de forme et de qualité nutritionnelle (riche en acides gras polyinsaturés et en cholestérols). De plus, de grandes colonies de phytoplancton peuvent être fragmentées par les infections et devenir comestibles pour le zooplancton (**Figure 6**). Les chytrides ont donc à la fois un impact sur le contrôle des successions algales et altèrent ainsi les flux d'énergie et de matière *via* les lyses cellulaires, mais également *via* la ressource nutritive qu'ils représentent pour le zooplancton.

En milieu marin, les chytrides sont également retrouvés en particulier en milieux côtiers (Gutiérrez *et al.*, 2016) mais leurs abondances restent relativement faibles par rapport à d'autres groupes de parasites (de Vargas *et al.*, 2015). Dans ces écosystèmes, ce sont généralement les dinoflagellés et plus particulièrement les Syndiniales qui dominent parmi les parasites (de Vargas *et al.*, 2015). Les dinoflagellés font partie du groupe des alvéolés (maintenant inclus dans le supergroupe TSAR ; Burki *et al.*, 2020). Les Syndiniales sont un groupe de dinoflagellés exclusivement parasites, et même parasitoïdes (parasites qui tuent inévitablement leurs hôtes). Les espèces de ce groupe sont capables d'infecter divers organismes, tels que d'autres dinoflagellés, des ciliés, des copépodes, des radiolaires, des larves de poissons ou encore des crabes (Guillou *et al.*, 2008 ; Strassert *et al.*, 2018). Parmi les Syndiniales, le genre *Amoebophrya* est particulièrement abondant en milieu marin (Chambouvet *et al.*, 2008). Ces parasites sont capables de se développer et d'infecter une large gamme d'espèces de dinoflagellés aussi bien dans les eaux côtières que dans les eaux libres ultra-oligotrophes (Siano *et al.*, 2011). Certaines espèces de dinoflagellés (par exemple les espèces du genre

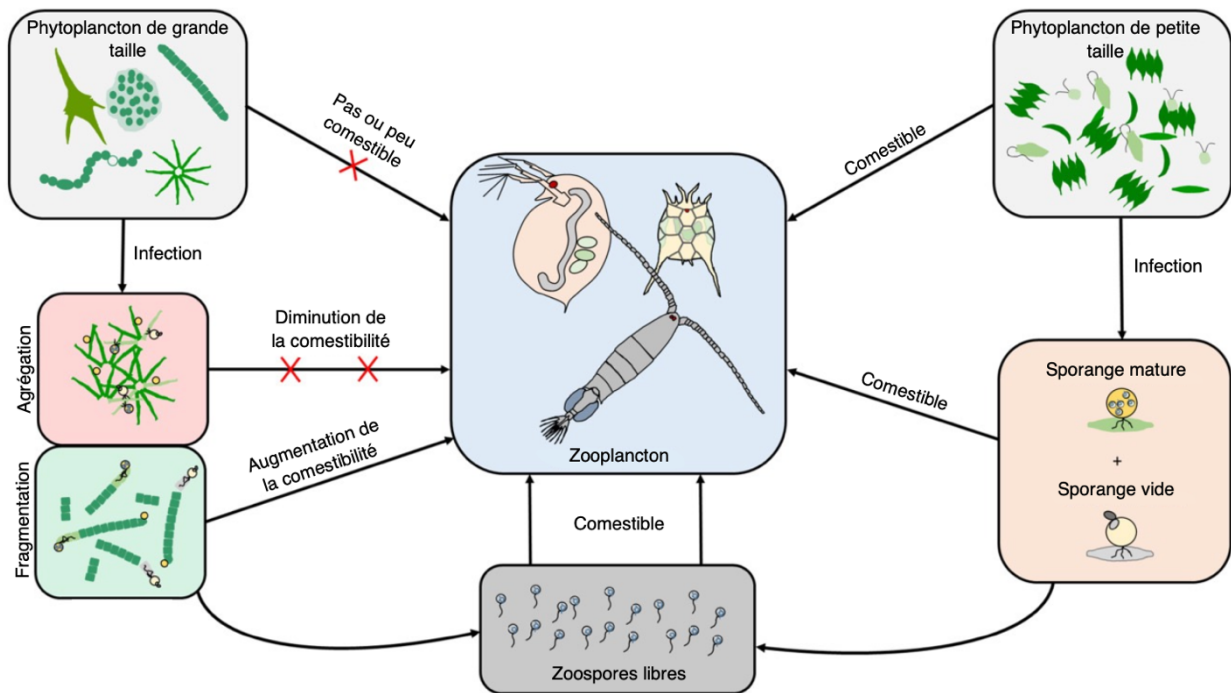


Figure 6 : Impact des chytrides dans le fonctionnement des réseaux trophiques.

Les petites espèces phytoplanctoniques peuvent être broutées par le zooplancton mais les grandes espèces phytoplanctoniques constituent des proies peu (ou non) comestibles. Les infections par les chytrides sur les grandes espèces de phytoplancton peuvent induire des changements dans leur comestibilité. En effet, l'infection peut provoquer une agrégation des cellules hôtes (non comestible pour le zooplancton) ou leur fragmentation (comestible). Les chytrides représentent également eux même une source d'alimentation puisque les sporanges (attachés aux hôtes phytoplanctoniques) seront également consommés par le zooplancton, ainsi que les zoospores libres. Modifié d'après Frenken *et al.*, 2017

Alexandrium) peuvent provoquer d'importantes efflorescences épisodiques ainsi que la production de toxines, et *Amoebophrya* joue un rôle décisif dans le contrôle de ces événements en limitant et prévenant les blooms toxiques de dinoflagellés (Chambouvet *et al.*, 2008 ; Velo-Suárez *et al.*, 2013). Le rôle des infections par *Amoebophrya* est non négligeable puisque leur impact sur la dynamique des populations de dinoflagellés responsables de blooms serait plus important que celui du zooplancton brouteur, en ayant le potentiel d'éliminer une population hôte entière en quelques jours (Montagnes *et al.*, 2008 ; Velo-Suarez *et al.*, 2013). Enfin, le flux de carbone pourrait également être impacté par ces infections dans les écosystèmes marins car les dinospores relâchées à la fin de l'infection peuvent être ingérées par les ciliés, créant alors un nouveau lien dans le réseau trophique (Salomon *et al.*, 2009).

Ces exemples illustrent ainsi comment les parasites peuvent impacter la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Autant en milieu d'eau douce qu'en milieu marin, les parasites ont la capacité d'impacter les populations de leurs hôtes, ainsi que les populations d'autres organismes en contact avec leurs hôtes. Ils sont ainsi responsables de la modulation des réseaux trophiques au travers de leurs impacts sur les communautés et les cycles de l'énergie et de la matière.

Au cours des dernières décennies, les progrès technologiques, notamment le séquençage à haut débit, ont donc permis de décrire un nombre important de nouveaux groupes eucaryotes (notamment parmi les parasites) (*e.g.* Singer *et al.*, 2021) et ont révolutionné notre compréhension des réseaux trophiques aquatiques. En revanche, malgré la découverte croissante de séquences environnementales, cette diversité reste biaisée. En effet, de par leurs divergences génétiques, certains groupes d'eucaryotes sont souvent absents des études visant à décrire la diversité globale des eucaryotes, ou plus spécifiquement des parasites. C'est le cas par exemple des Myxozoa, de nombreux alvéolés, ou encore des microsporidies (Bass *et al.*, 2015). Ces dernières sont des parasites intracellulaires obligatoires apparentés aux champignons, et qui sont génétiquement divergentes des autres eucaryotes en raison de leur évolution rapide et de la réduction importante de leurs génomes (Keeling et Fast, 2002). En conséquence, les amorces ciblant classiquement les régions conservées du gène de l'ARNr 18S chez les eucaryotes ne permettent pas d'amplifier les microsporidies (Marande *et al.*, 2009 ; Hadziavdic *et al.*, 2014 ; Hugerth *et al.*, 2014). La diversité globale des microsporidies ainsi que leurs impacts sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques sont donc largement méconnus.

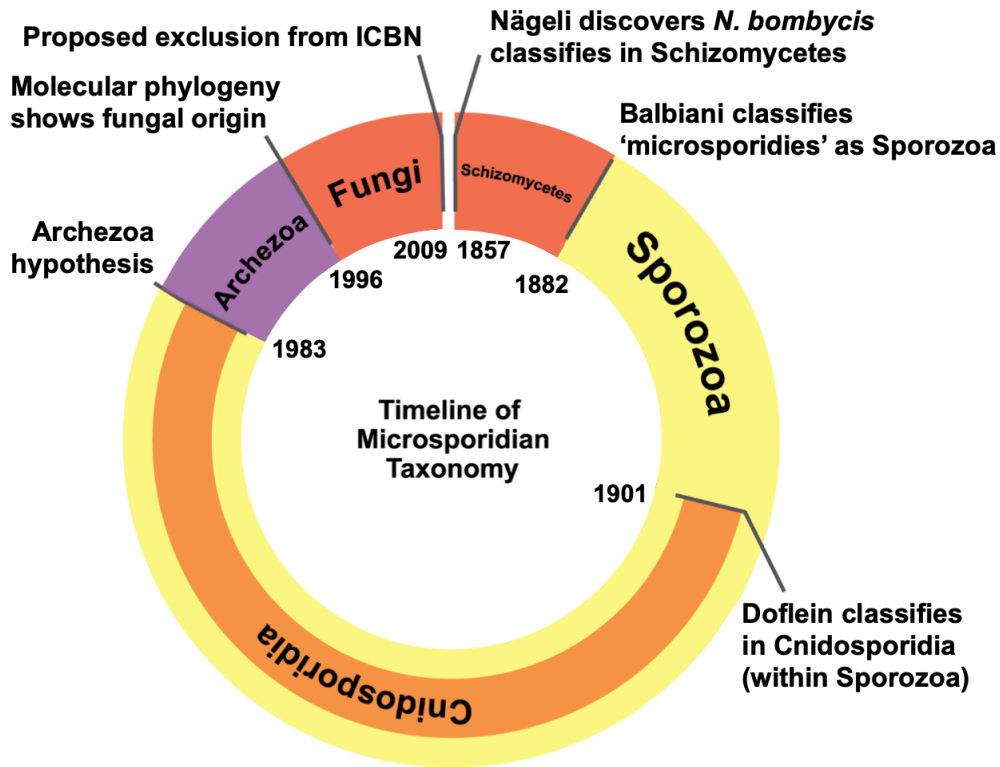


Figure 7 : Chronologie de l'évolution de la position taxonomique des microsporidies, depuis leur découverte en 1857 jusqu'à aujourd'hui.

Lors de leur première description en 1857, les microsporidies étaient classées parmi les champignons schizomycètes. Elles ont par la suite été considérées comme des protistes sporozoaires (et plus précisément comme des membres du sous-groupe des Cnidosporidia). En 1983, Cavalier-Smith a suggéré que les microsporidies constituaient une lignée ancienne et primitive ayant évolué avant l'origine des mitochondries, et les premières données moléculaires ont d'abord soutenu cette hypothèse (Vossbrinck *et al.*, 1987). L'accumulation des données génomiques a ensuite révélé que les microsporidies seraient en réalité apparentées aux champignons, bien que leur relation exacte avec ceux-ci reste controversée. Modifié d'après Keeling, 2009

II. Les microsporidies

La première microsporidie formellement décrite d'un point de vue taxonomique fut *Nosema bombycis*, en 1857 par Nägeli. Dans ce rapport, Nägeli traite du travail de Pasteur sur la pébrine du vers à soie (*Bombyx mori*) et utilise pour la première fois le terme de microsporidie (Nägeli, 1857). La pébrine est une maladie qui décima les élevages de ver à soie au cours du 19^{ème} siècle, mais qui fut enrayerée grâce aux travaux de Pasteur qui proposa une méthode de « grainage cellulaire » qui consistait à trier les œufs de vers à soie infectés de ceux qui étaient sains (Pasteur, 1870). A cette époque, les microsporidies étaient décrites comme des champignons schizomycètes, un groupe qui incluait différentes levures et bactéries (Nägeli, 1857) (**Figure 7**). Les microsporidies furent ensuite considérées comme un groupe distinct d'organismes unicellulaires (Balbiani, 1882). Bien plus tard, en 1992, Sprague créa un phylum propre aux microsporidies « Microspora », mis à jour plusieurs fois par la suite (Sprague *et al.*, 1992 ; Vossbrinck *et al.*, 2014). Aujourd'hui, les microsporidies sont décrites comme un groupe d'organismes extrêmement divers, affiliés aux champignons (Karpov *et al.*, 2014). Cependant, leur position phylogénétique reste en débat en raison de leur taux d'évolution élevé, de la réduction et de la perte d'organites cellulaires ainsi que de la perte de voies métaboliques essentielles (Williams *et al.*, 2002 ; Thomarat *et al.*, 2004 ; Corradi *et al.*, 2010) (**Figure 7**).

1. Généralités

1.1. Caractéristiques générales et cycle de développement

Les microsporidies constituent un groupe diversifié d'eucaryotes comprenant environ 1 600 espèces réparties dans près de 220 genres (Bojko *et al.*, 2022), et sont retrouvées dans tous types d'environnements (Stentiford *et al.*, 2013 ; Didier *et al.*, 2014 ; Williams *et al.*, 2018). Le nombre d'espèces pourrait être beaucoup plus élevé, certains l'estimant à plus de 100 millions (Larsen *et al.*, 2017). Ce sont des parasites unicellulaires, intracellulaires obligatoires. La plupart des espèces infectent des métazoaires (bien que quelques espèces infectant des eucaryotes unicellulaires soient décrites, Stentiford *et al.*, 2013) et 17 espèces sont connues comme étant pathogènes de l'Homme, notamment chez les personnes immunodéprimées (Didier *et al.*, 2014 ; Fayer et Santin-Duran 2014).

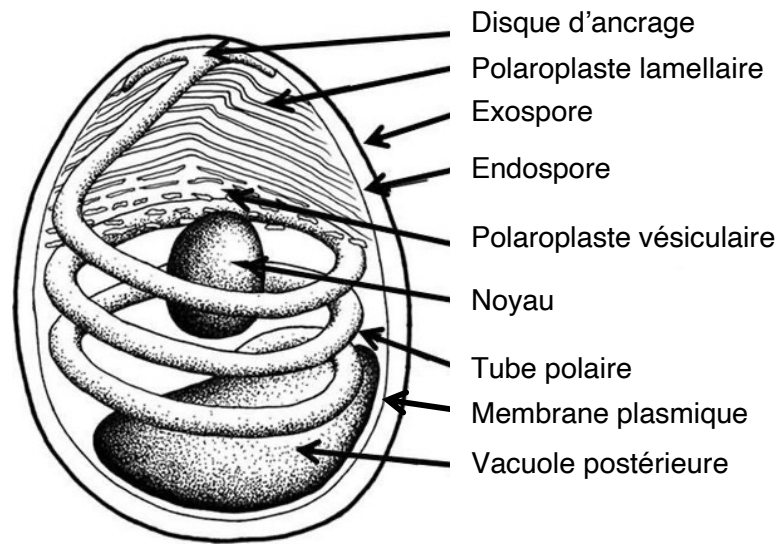


Figure 8 : Schéma de l'ultrastructure d'une spore de microsporidie.

La paroi de la spore est composée de 3 couches : l'exospore, l'endospore (contenant de la chitine) et la membrane plasmique. La spore contient le tube polaire enroulé (ancré au pôle apical au disque d'ancrage), le noyau, les polaroplastes lamellaire et vésiculaire, et la vacuole postérieure. Selon l'espèce, la forme de la spore (**Figure 9**), le nombre de noyaux (1 ou 2) et le nombre de spires du tube polaire varient. Modifié d'après Keeling et Fast, 2002

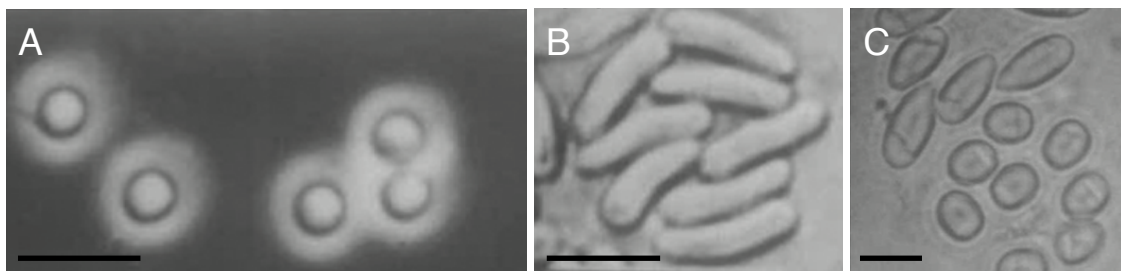


Figure 9 : Exemples de formes des spores de microsporidies les plus répandues.

(A) Spores sphériques de *Coccospora micrococcus*. (B) Spores en forme de bâtonnets de *Resiomeria odonatae*. (C) Spores ovoïdes et pyriformes d'*Amblyospora callosa*. Echelles = 5µm. Modifié d'après Vávra et Larsson, 2014

Les microsporidies produisent une forme de résistance et de dissémination : la spore (**Figure 8**). Les spores de microsporidies sont hautement persistantes dans l'environnement et permettent l'infection de nouveaux hôtes. En effet, celles-ci contiennent à la fois le sporoplasme infectieux et un appareil unique, spécifique au phylum des microsporidies : le tube polaire (Vávra et Larsson, 2014). La spore a une taille pouvant aller de 1 μm à 30 μm selon l'espèce, mais la plupart des espèces présentent des spores de taille comprise entre 2 et 8 μm (Vávra et Larsson, 2014). La forme de la spore est également une propriété morphologique permettant de caractériser les espèces (**Figure 9**).

Lors du cycle de développement (**Figure 10**), suite à une stimulation environnementale, le tube polaire se dévagine rapidement de la spore, et son extrémité entre en contact avec la cellule hôte, servant de conduit pour le passage du sporoplasme infectieux dans la cellule hôte (Han *et al.*, 2017). Des analyses *in vitro* ont montré que divers paramètres, notamment les changements locaux de pH, de concentration en sel, de rayonnement UV et de température, pouvaient favoriser ou inhiber la dévagination du tube polaire et la décharge du contenu sporal (Weiss *et al.*, 2014). Le sporoplasme est injecté dans le cytoplasme de la cellule hôte, ou chez de rares espèces dans le noyau de la cellule hôte (Cali et Takvorian, 2014). S'en suit alors une phase proliférative (appelée mérogonie) au cours de laquelle les mérontes se répliquent activement et forment des sporontes (le passage de mérontes à sporontes est caractérisé par l'épaississement de la membrane cellulaire) (**Figure 10**). Une phase de maturation donne ensuite lieu à des sporoblastes. Ceux-ci subissent une différenciation qui donne lieu à des spores matures (la formation des spores à partir de mérontes est appelée sporogonie) (**Figure 10**). Ces spores peuvent alors infecter d'autres cellules environnantes, être transportées vers de nouveaux sites à l'intérieur de l'hôte ou être libérées et infecter d'autres hôtes (Keeling et Fast, 2002). Le développement des mérontes est généralement réalisé au contact direct du cytoplasme de la cellule hôte ou bien, pour certaines espèces, au sein d'une vacuole parasitophore (Bigliardi et Sacchi, 2001).

Les microsporidies peuvent se transmettre de différentes manières : par une transmission horizontale (entre hôtes non apparentés, souvent par voie trophique), ou de façon verticale (de la femelle hôte à sa progéniture). Une transmission mixte (combinant transmissions verticale et horizontale) est également observée chez un certain nombre d'espèces hôtes (Dunn et Smith, 2001), comme pour *Pleistophora mulleri* chez son hôte amphipode (MacNeil *et al.*, 2003a). Souvent, la transmission horizontale est associée à une forte virulence, contrairement à la

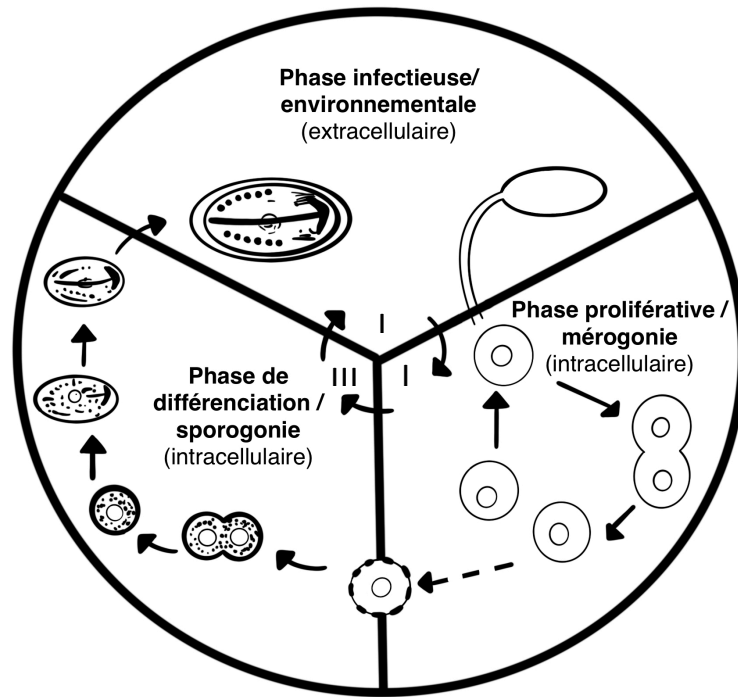


Figure 10 : Cycle de développement généralisé des microsporidies.

La phase I est la seule partie extracellulaire du cycle durant laquelle les spores germent, entraînant l'expulsion rapide du tube polaire au travers duquel le sporoplasme infectieux sera transféré dans la cellule hôte. La phase II est la phase proliférative, la première phase du développement intracellulaire. La transition vers la phase III, phase de différenciation, représente l'engagement des organismes dans la formation de spores. Modifié d'après Cali *et al.*, 2017

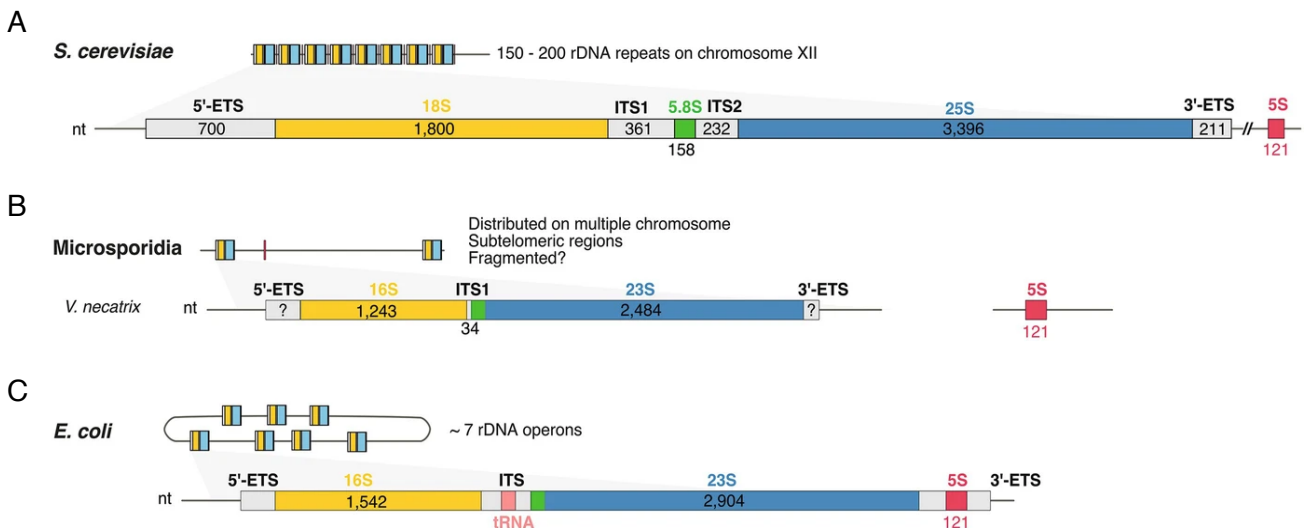


Figure 11 : Compaction du locus de l'ADNr des microsporidies vers une organisation de type procaryotique.

Représentation schématique d'un seul locus d'ADNr, sous un diagramme indiquant la distribution génomique de tous les loci d'ADNr, provenant (A) de *S. cerevisiae*, (B) de microsporidies (taille des nucléotides de *Vairimorpha necatrix*), et (C) de *E. coli*. Les gènes et les tailles d'espaceurs connus sont indiqués et dessinés à l'échelle à des fins de comparaison. Modifié d'après Jespersen *et al.*, 2022

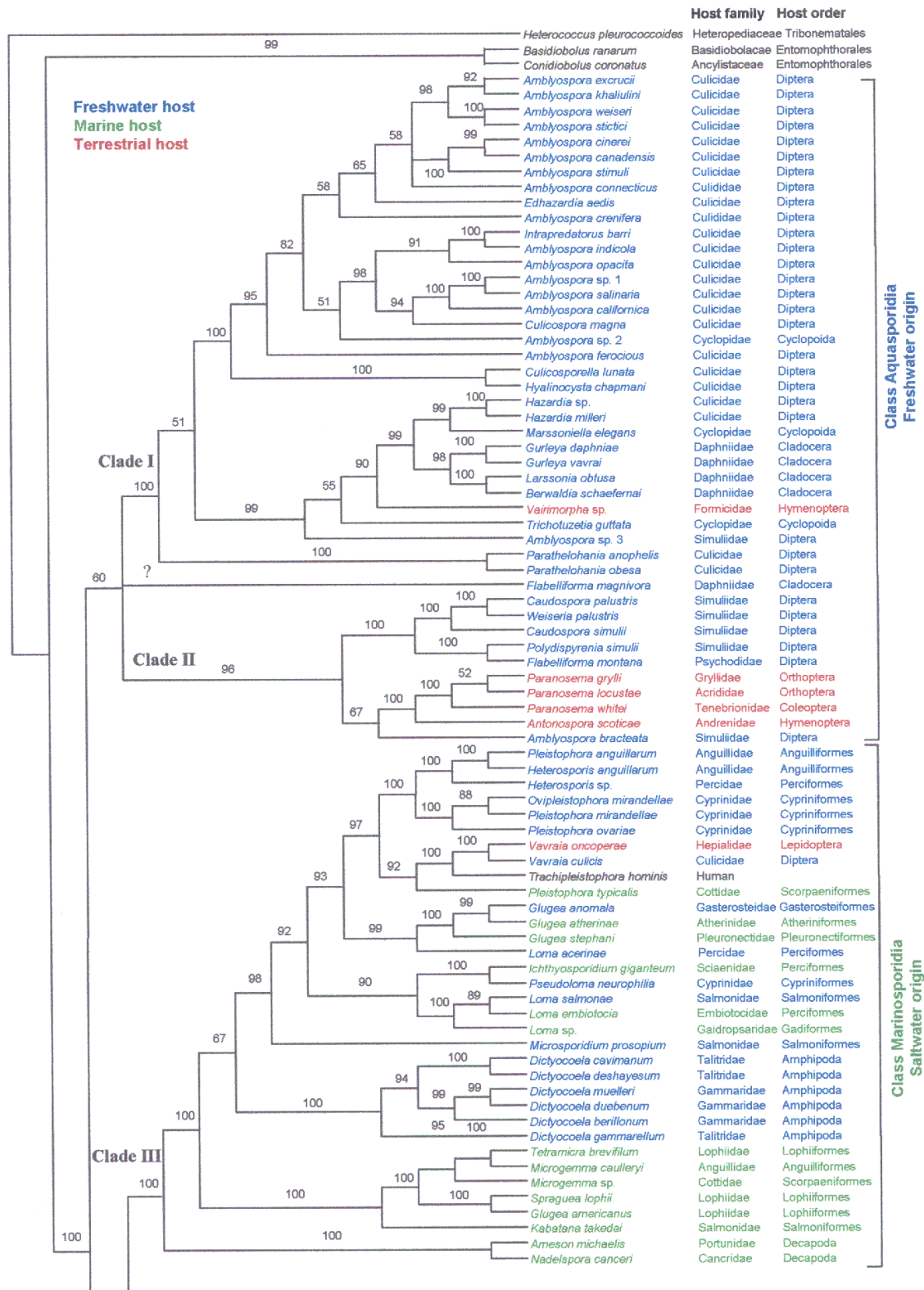
transmission verticale généralement moins virulente, en particulier pour les femelles hôtes chargées de la transmission à leur descendance (Dunn et Smith, 2001). La transmission verticale peut parfois jouer un rôle déterminant dans le maintien et la dispersion des microsporidies, comme chez *Halmitosporidium tvaerminnensis* qui met en place ce mode de transmission afin de survivre dans les œufs de durée lors de la diapause des daphnies (Zbinden *et al.*, 2008).

Outre la présence d'un tube polaire, d'autres caractéristiques sont spécifiques aux microsporidies. Celles-ci ne possèdent pas à proprement parler de mitochondries, mais sont dotées de reliques mitochondriales, appelées mitosomes, et sont donc dans l'incapacité de produire de l'ATP, les rendant ainsi dépendantes de leurs hôtes (Dean *et al.*, 2018). Les microsporidies présentent également un appareil de Golgi atypique par rapport aux autres eucaryotes, non structuré en dictyosomes (Beznoussenko *et al.*, 2007) et sont également dépourvues de peroxyosomes (Vávra et Lukeš, 2013). Enfin, leurs ribosomes sont structurellement plus proches de ceux d'organismes procaryotiques, de type 70S (Ishihara et Hayashi, 1968 ; Curgy *et al.*, 1980). En effet, ceux-ci sont composés d'ARN ribosomiaux (ARNr) 16S et 23S, et l'ARNr 5,8S de type eucaryotique est fusionné à l'ARNr 23S (Vossbrinck et Woese, 1986 ; Vossbrinck *et al.*, 1987 ; Jespersen *et al.*, 2022) (**Figure 11**).

Les microsporidies sont parmi les eucaryotes possédant les plus petits génomes. En effet, *Encephalitozoon hellem* (parasite de mammifères) présente un génome de seulement 2,18Mb ; le plus gros génome chez les microsporidies étant celui de *Edhazardia aedis* (parasite de moustique) avec 51,35 Mb (Han *et al.*, 2021).

1.2. Classification et diversité

L'origine des microsporidies a fait l'objet de nombreux débats en raison de leurs caractéristiques spécifiques présentées précédemment (Keeling, 2009). Durant les dernières décennies, les microsporidies ont été classées phylogénétiquement proche des champignons, soit comme une branche basale de ces derniers, soit comme un groupe frère (Weiss *et al.*, 2000 ; Capella-Gutiérrez *et al.*, 2012 ; Corradi et Selman, 2013 ; Karpov *et al.*, 2014). En effet, suite à différentes analyses moléculaires (James *et al.*, 2013), les microsporidies ont été considérées comme étant des champignons hautement dérivés et possédant comme plus proche parent un autre groupe de parasite, les Cryptomycota (incluant *Rozella*). Cependant, le recours à la phagotrophie et l'absence de paroi typique des champignons chez certains stades de *Rozella*



(Powell *et al.*, 2017) a remis en question la réelle affiliation fongique des Cryptomycota, et ainsi celle des microsporidies (Corsaro *et al.*, 2022). Cependant, les microsporidies présentant des caractéristiques morphologiques et moléculaires partagées avec les champignons (*e.g.* présence de chitine dans la paroi, tréhalose comme source de sucre (Han et Weiss, 2017)), leur position phylogénétique par rapport à ceux-ci est souvent débattue. Certains auteurs considèrent ainsi que les microsporidies et les Cryptomycota forment ensemble soit la lignée la plus basale des champignons (James *et al.*, 2020), soit son parent le plus proche (Karpov *et al.*, 2014). Dernièrement, la plupart des études portant sur les microsporidies emploient les termes de « fungus-related » ou « Fungi-like organisms » (*e.g.* Murareanu *et al.*, 2021 ; Jespersen *et al.*, 2022).

Le phylum des microsporidies regroupe les « canonical microsporidia » (ou microsporidies « classiques ») qui possèdent toutes les caractéristiques évoquées précédemment, ainsi que d'autres microsporidies plus atypiques considérées comme primitives qui possèdent une version rudimentaire du tube polaire et ne montrent pas d'étape correspondant à la mérogonie dans leur cycle de développement (Mikhailov *et al.*, 2017 ; Corsaro *et al.*, 2019). A cela pourrait également s'ajouter une importante diversité de séquences environnementales précédemment affiliées aux Cryptomycota. En effet, de nombreuses séquences environnementales ont été phylogénétiquement regroupées avec *Rozella* au sein du phylum des Cryptomycota, en l'absence de séquences appartenant aux microsporidies dans ces phylogénies (Lara *et al.*, 2010 ; Jones *et al.*, 2011). *Rozella* est un genre regroupant des espèces parasites d'oomycètes, d'autres champignons, et de chytrides (Spatafora *et al.*, 2017). Bass et collaborateurs, en 2018, ont montré qu'une importante partie de cette diversité est en réalité regroupée au sein des microsporidies, et distinctement séparée de *Rozella*. Le phylum des microsporidies regrouperait ainsi les microsporidies classiques (« canonical », ou LB-Microsporidia pour « long-branch microsporidia »), les microsporidies « primitives », ainsi que toute une diversité environnementale initialement reliée à *Rozella* (Bass *et al.*, 2018). Cependant, ce point de vue est débattu, et le lien évolutif entre les microsporidies et les séquences affiliées à *Rozella* est toujours discuté à l'heure actuelle (Corsaro *et al.*, 2022).

Une analyse phylogénétique effectuée en 2005 par Vossbrinck et Debrunner-Vossbrinck sur 125 espèces (appartenant à 60 genres), a donné lieu à une classification contenant 5 clades de microsporidies (en excluant les microsporidies dites primitives) (**Figure 12**). Ces clades étaient regroupés en 3 groupes majeurs correspondant en partie à l'environnement dans lequel les hôtes

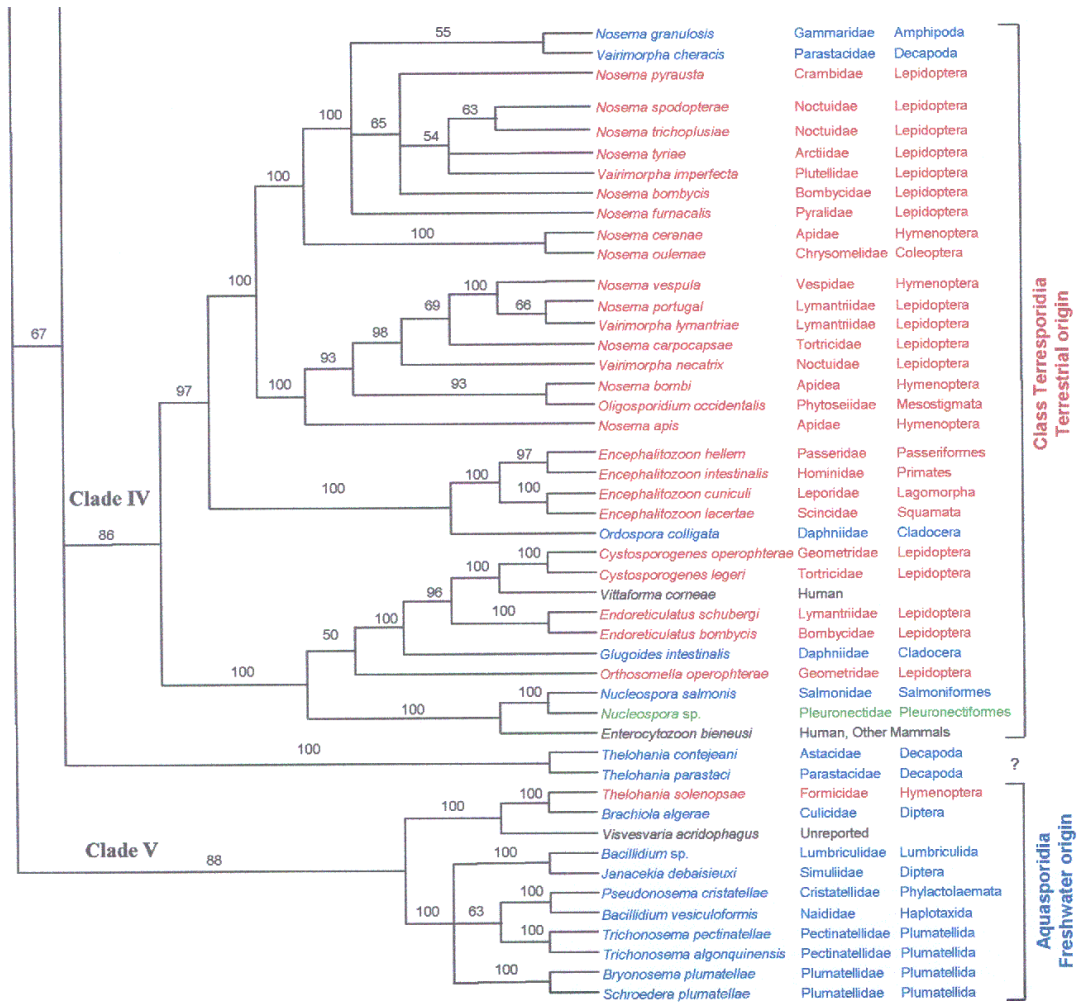


Figure 12 : Phylogénie des microsporidies classées en cinq clades.

Les microsporidies provenant d'hôtes d'eau douce sont indiquées en bleu, celles provenant d'hôtes marins en vert et celles provenant d'hôtes terrestres en rouge. Les microsporidies provenant d'hôtes humains ou non connus sont en noir. Vossbrinck et Debrunner-Vossbrinck, 2005

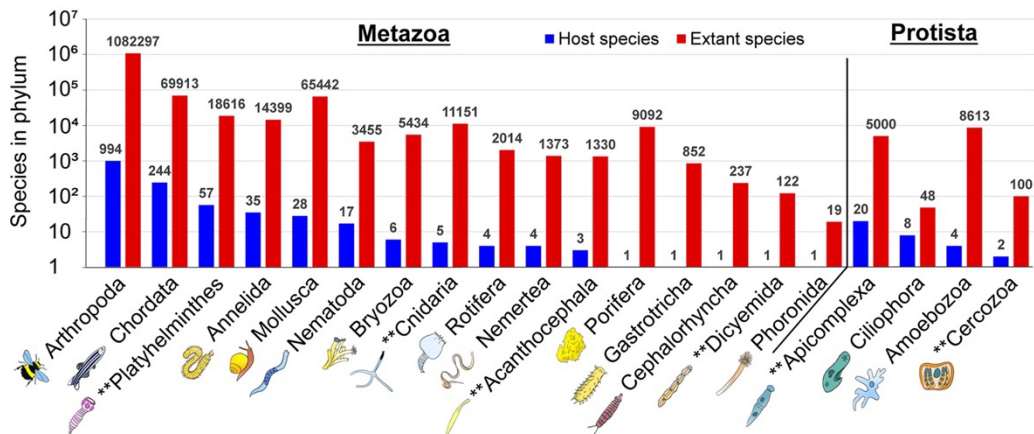


Figure 13 : Distribution des hôtes des microsporidies dans les phyla de métazoaires et protistes.

Le nombre d'espèces hôtes dans chaque embranchement (bleu) et le nombre total d'espèces existantes dans chaque embranchement (rouge) sont indiqués, (**) embranchements où la majorité des hôtes sont également des parasites, (n = 1 436 espèces hôtes). Murareanu *et al.*, 2021

étaient retrouvés. Ainsi le groupe des Aquasporidia correspondait aux clades I, II et V dans lesquels étaient retrouvées des espèces parasitant majoritairement des hôtes vivant en eau douce. Les Marinosporidia (clade III) étaient décrits comme infectant principalement des organismes marins, et les Terresporidia (clade IV) des hôtes terrestres (des insectes principalement) (**Figure 12**). Cette classification a rapidement fait l'objet de critiques (Larsson, 2005), puisqu'elle n'utilisait pas une approche globale incluant des critères morphologiques et moléculaires et que les regroupements par habitat d'hôtes révélaient déjà des exceptions. Williams et collaborateurs (2018) ont par ailleurs démontré l'incohérence de cette classification en partie basée sur la niche écologique habitée par les microsporidies et leurs hôtes. Une confusion entre deux clades (III et V) est également née suite aux nouveaux travaux de Vossbrinck et collaborateurs en 2014, depuis lesquels certains auteurs utilisent l'une ou l'autre numérotation pour un même clade (*e.g.* Corsaro *et al.*, 2019 ; Quiles *et al.*, 2019). De plus, certaines espèces n'étaient classifiées dans aucun clade (Vossbrinck et Debrunner-Vossbrinck, 2005). Depuis, la classification des microsporidies a été réexaminée à différentes reprises (*e.g.* Park et Poulain, 2021), incluant nos travaux présentés dans le chapitre III de ce manuscrit.

1.3. Spectre d'hôtes et habitats

Les microsporidies sont particulièrement étudiées comme parasites de métazoaires et certaines espèces présentent une importance écologique et économique majeur en raison des hôtes qu'elles infectent. Elles sont par exemple connues et étudiées pour leur impact sur les abeilles par leur contribution dans le phénomène d'effondrement des colonies (*e.g.* Paxton, 2010). Elles sont également responsables de nombreuses infections chez les crustacés et poissons (Stentiford *et al.*, 2013), et posent problème en laboratoire en infectant fréquemment les poissons zèbres et les drosophiles (Niehus *et al.*, 2012 ; Kent et Sanders, 2020). Les microsporidies sont également parfois utilisées comme agents de biocontrôle contre des insectes nuisibles. *Paranosema locustae* par exemple sert d'agent de contrôle contre des criquets et sauterelles ravageurs de différentes cultures (Bjørnson et Oi, 2014). Une autre microsporidie pourrait diminuer la transmission de *Plasmodium falciparum* par le moustique *Anopheles arabiensis* (Herren *et al.*, 2020). Chez l'Homme, 17 espèces sont connues, certaines étant également présentes chez une grande variété de mammifères et d'oiseaux différents, suscitant ainsi des inquiétudes quant au transfert zoonotique (Hinney *et al.*, 2016 ; Han et Weiss, 2017 ; Li *et al.*, 2019). *Enterocytozoon bieneusi*, l'espèce la plus fréquemment retrouvée chez l'Homme, est par exemple également

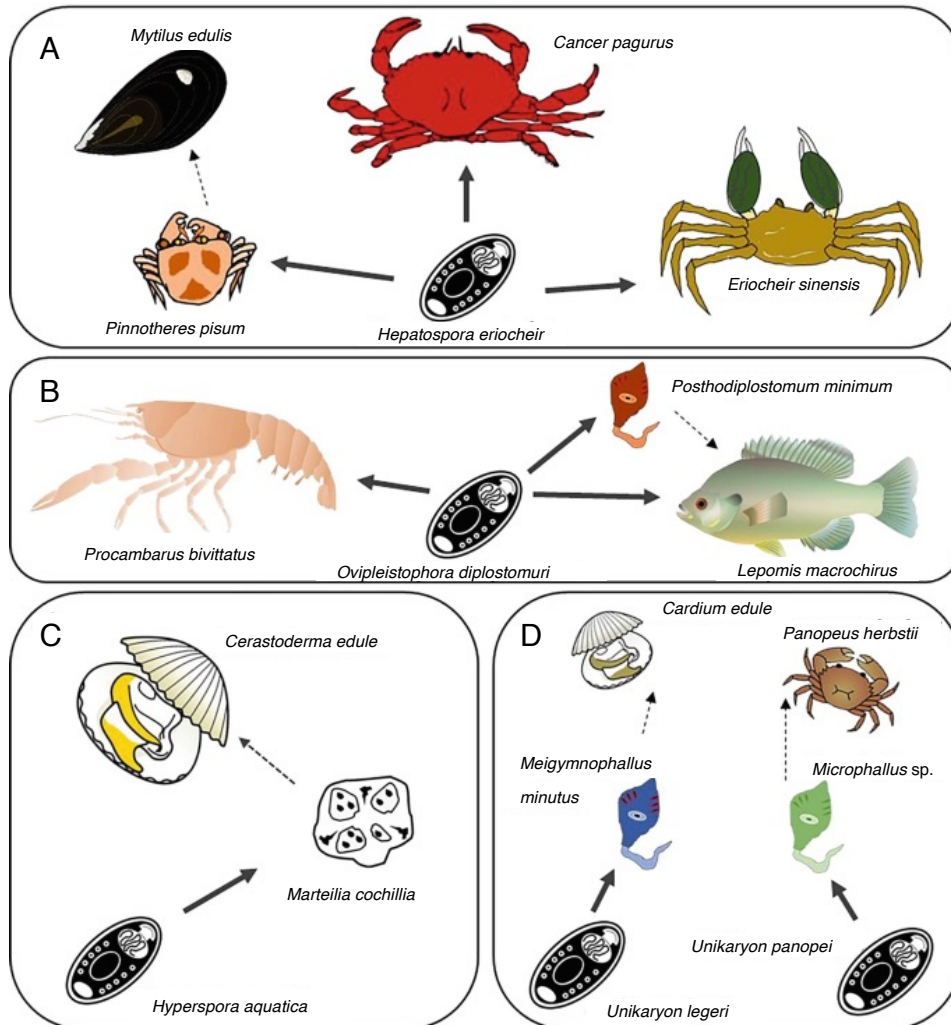


Figure 14 : Exemple de cas d'hyperparasitisme chez les microsporidies aquatiques.

(A) *Hepatospora eriocheir* a été identifiée chez trois crustacés, dont l'un est un parasite de la moule *Mytilus edulis*. (B) *Ovipleistophora diplostomuri* infecte directement les écrevisses, les poissons et les trématodes. Ces derniers infectent également le poisson et peuvent transmettre le parasite. (C) *Hyperspora aquatica* infecte le protiste *Marteilia cochillia*, un parasite des mollusques bivalves. (D) Deux espèces du genre *Unikaryon* infectent chacune des digènes, qui à leur tour infectent des mollusques et des crustacés. Modifié d'après Bojko et Stentiford, 2022

parasite d'animaux domestiques (*e.g.* chiens, cochons d'inde, chats, chèvres) chez lesquels l'infection est souvent asymptomatique mais présente un risque de transfert à l'Homme (Han *et al.*, 2021).

Murareanu et collaborateurs, en 2021, ont analysé le placement taxonomique de 1 436 hôtes de microsporidies, leur permettant de déterminer que des infections ont été décrites chez 16 phyla de métazoaires ainsi que 4 phyla de protistes (**Figure 13**). Les arthropodes et les chordés regroupent à eux seuls plus de 1 200 espèces hôtes (994 et 244 respectivement). Leur analyse a également permis de montrer que les phyla de métazoaires qui n'ont jusqu'ici jamais été décrits comme hôtes présentent en moyenne 26 fois moins d'espèces décrites que les autres, suggérant ainsi que l'absence de description de microsporidies chez ces phyla pourrait provenir d'un sous échantillonnage de ces hôtes (Murareanu *et al.*, 2021).

De nombreuses microsporidies sont également décrites comme hyperparasites (infectant des organismes eux-mêmes parasites) (**Figure 13, 14**). En effet, parmi les phyla décrits comme hôtes de microsporidies, six contiennent une majorité de parasites (Murareanu *et al.*, 2021). *Geusia gamosysti* et *Pleistophoridium hyperparasiticum*, par exemple, sont des parasites de grégarines (apicomplexes), elles-mêmes parasites d'insectes aquatiques (Codreanu-Balcescu et Codreanu, 1976 ; Rühl et Korn, 1979), et *Nosema naegeli* est parasite d'un cestode (*Bothriophalus calviceps*) lui-même parasite d'une anguille (Stentiford *et al.*, 2013).

Enfin, concernant le spectre d'hôte des microsporidies à l'échelle de l'espèce, environ 80 % des espèces de microsporidies décrites (avec des données sur les hôtes) sont spécialistes (*i.e.* décrites comme n'infectant qu'un seul hôte). Les autres espèces sont plus généralistes, certaines étant capables d'infecter plus de dix hôtes (Murareanu *et al.*, 2021 ; Willis et Reinke, 2022), d'autres ayant la capacité d'infecter à la fois des vertébrés et des invertébrés (Stentiford *et al.*, 2016).

En plus de leur large spectre d'hôtes, les microsporidies sont également retrouvées dans une large variété d'environnements (terrestres, marins, eaux douces et saumâtres). Plus de 69% des microsporidies sont présentes en milieu aquatique, certaines étant présentes à la fois en milieu terrestre et aquatique (Bojko et Stentiford, 2022). Murareanu et collaborateurs, en 2021, ont examiné la répartition des hôtes pour lesquels des données environnementales sont disponibles. Parmi ces hôtes, 37% sont retrouvés en eau douce, 25% en milieu marin et 14% en eau saumâtre (Murareanu *et al.*, 2021) (**Figure 15**). Par ailleurs, ils ont identifié que plus de 27% des hôtes sont retrouvés dans au moins deux environnements. Les microsporidies aquatiques représentent

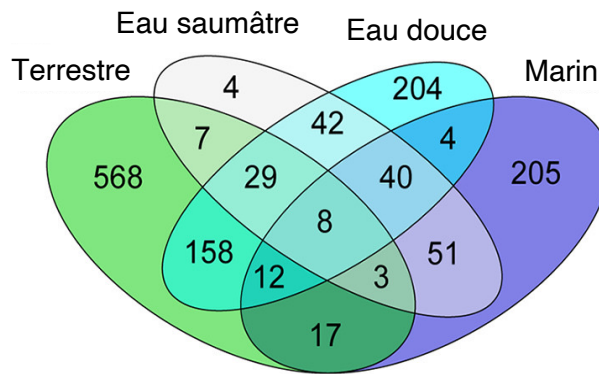


Figure 15 : Diagramme de Venn représentant les principaux environnements dans lesquels vivent les hôtes des microsporidies.

n = 1 352 espèces hôtes. Modifié d'après Murareanu *et al.*, 2021

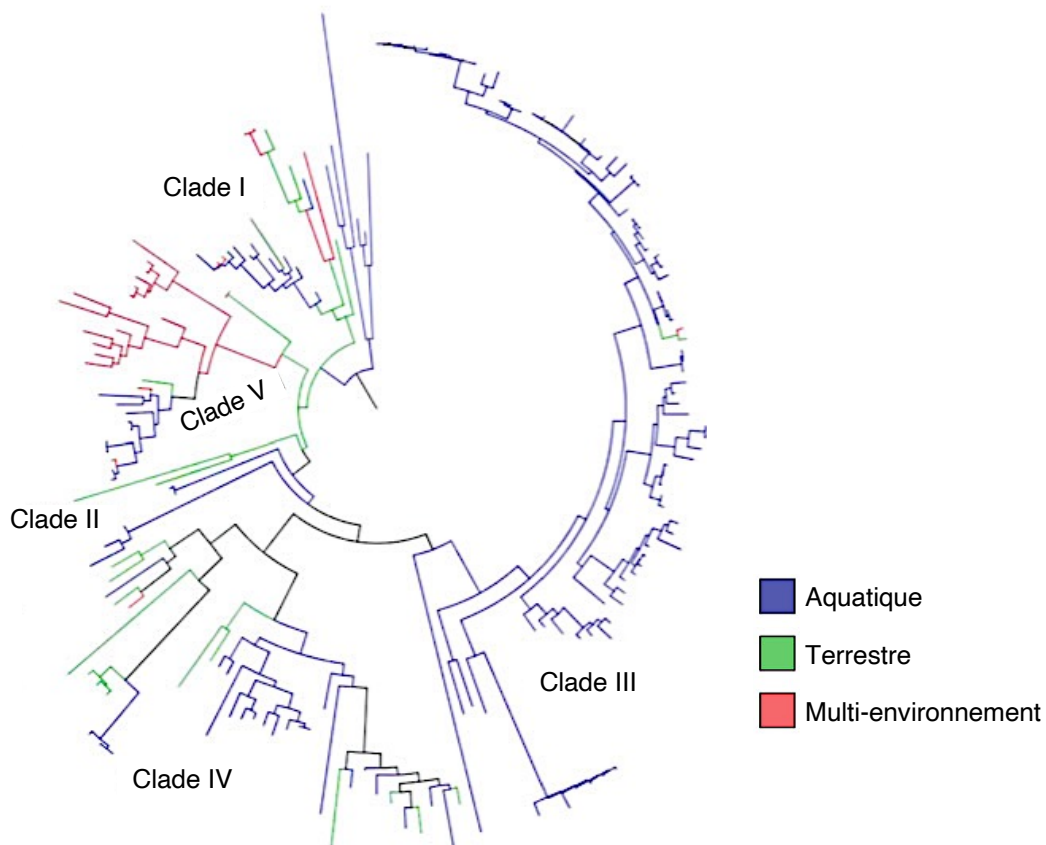


Figure 16 : Phylogénie récente des microsporidies en lien avec leur environnement.

L'arbre comprend toutes les espèces de microsporidies aquatiques et plusieurs terrestres, et indique l'origine environnementale de chaque espèce. Modifié d'après Bojko et Stentiford, 2022

ainsi la plus large diversité du phylum, infectant des hôtes très divers. Leur impact sur les milieux aquatiques, encore sous-estimé, pourrait ainsi être important.

2. Les microsporidies dans les milieux aquatiques

2.1. Diversité des microsporidies aquatiques

La diversité des microsporidies en milieu aquatique est pour la grande majorité décrite par des études ciblées sur des hôtes d'intérêt (*e.g.* poissons et crustacés comestibles, insectes auxiliaires et domestiques, bioindicateurs, humain). En effet, à l'exception des études incluses dans ce manuscrit, une seule étude environnementale a porté sur l'analyse de la diversité des microsporidies aquatiques (Williams *et al.*, 2018). Comme évoqué précédemment dans ce chapitre, les microsporidies sont généralement absentes des études de métabarcoding visant à décrire la diversité eucaryote en raison de leur forte divergence génétique avec ces derniers. De plus, les méthodes de filtration et/ou d'extraction utilisées peuvent ne pas leur être adaptées.

Les microsporidies parasites d'hôtes présents en milieux aquatiques sont retrouvées dans les cinq clades initialement décrits par Vossbrinck et Debrunner-Vossbrinck en 2005 (Bojko et Stentiford, 2022) (**Figure 16**). En effet, bien que le clade IV ait été décrit comme contenant des parasites d'hôtes terrestres, ceux-ci sont en fait retrouvés dans tous les environnements. En milieu aquatique (tous écosystèmes confondus), les microsporidies sont décrites comme parasites de vertébrés (mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens, poissons), mais surtout d'invertébrés (arthropodes, mollusques, annélides, cnidaires, bryozoaires, rotifères, helminthes, acanthocéphales, gastrotriches, spongiaires, phoronidiens, Dicyemida, céphalorhynques et kinorhynches) avec 137 espèces formellement décrites comme parasites d'invertébrés aquatiques (Stentiford *et al.*, 2013 ; Murareanu *et al.*, 2021 ; Bojko et Stentiford, 2022). Enfin, les microsporidies sont plus rarement décrites comme parasites de protistes appartenant aux ciliés, apicomplexes, cercozoaires et amibozoaires (Murareanu *et al.*, 2021).

Parmi les ~1 600 espèces de microsporidies décrites, 202 sont décrites sur le plan taxonomique par la combinaison de techniques ultrastructurales et génétiques, chez des hôtes aquatiques et semi-aquatiques (Bojko et Stentiford, 2022). Les crustacés, insectes et poissons représentent à eux seuls plus de 88% des hôtes décrits pour ces microsporidies (**Figure 17**).

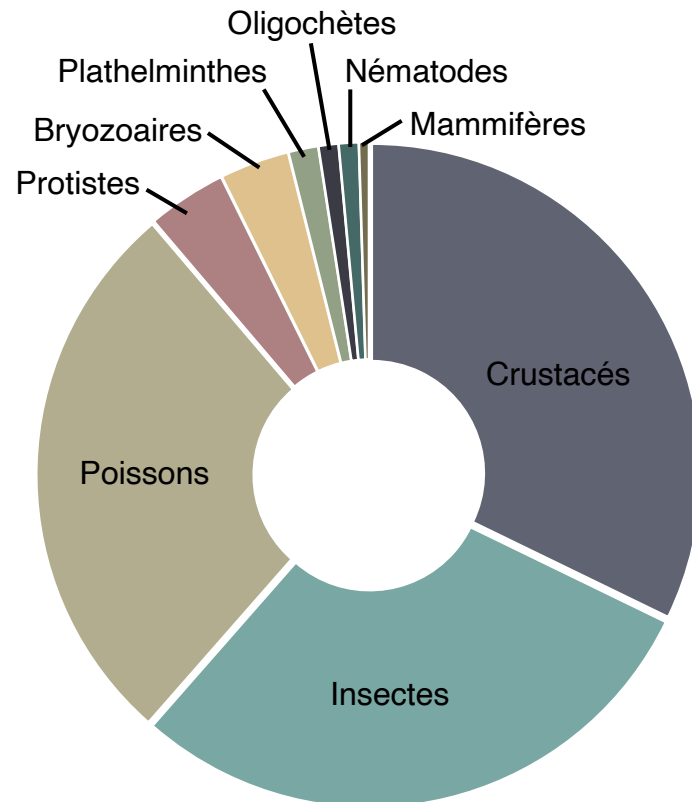


Figure 17 : Hôtes des microsporidies en milieu aquatique.

Seules 202 espèces de microsporidies, décrites d'un point de vue génétique et morphologique, ont été considérées. Réalisé à partir de Bojko et Stentiford, 2022

En eau douce, les microsporidies sont majoritairement décrites comme parasites de poissons, de crustacés (copépodes, cladocères, amphipodes, décapodes) et d'insectes (larves de diptères, de trichoptères, ou d'odonates). On trouve également quelques genres de microsporidies parasitant des bryozoaires, des annélides ou des mollusques (Murareanu *et al.*, 2021). Quelques rares espèces sont connues pour infecter des protistes (ciliés et grégarines), via des descriptions souvent uniquement morphologiques (Lutz et Splendore, 1908 ; Kruger, 1956 ; Codreanu-Balcescu et Codreanu, 1976 ; Rühl et Korn, 1979 ; Görtz, 1987 ; Fokin *et al.*, 2008). Chez les ciliés par exemple, seulement deux espèces de microsporidies sont caractérisées par des approches morphologiques et moléculaires : *Euplotespora binucleata* et *Globosporidium paramecii* parasitant les ciliés *Euplotes woodruffi* et *Paramecium aurelia*, respectivement (Fokin *et al.*, 2008 ; Yakovleva *et al.*, 2020). Chez les rotifères, des espèces des genres *Brachionus* et *Asplanchna* ont été décrites comme hôtes (observations morphologiques uniquement) (Gorbunov et Kosova, 2001 ; Wolska et Mazurkiewicz-Zapalowicz, 2013).

En milieu marin, les principaux hôtes décrits sont les poissons et les crustacés (Bojko et Stentiford, 2022). C'est également dans ce milieu qu'a été identifié *Hyperspora aquatica*, une microsporidie parasite du protiste *Martelia cochillia* (paramyxide parasite de mollusque) (Stentiford *et al.*, 2017) (**Figure 14C**). Cette microsporidie est par ailleurs phylogénétiquement proche de certaines infectant des crustacés (clade III), suggérant un potentiel rôle de vecteur de la part du protiste pour la circulation des microsporidies chez les mollusques (Stentiford *et al.*, 2017). Les amibozoaires et la plupart des grégarines décrits comme hôtes de microsporidies sont retrouvées en milieu marin (*e.g.* Rotari *et al.*, 2015 ; Corsaro *et al.*, 2016 ; Mikhailov *et al.*, 2016), ici encore avec des observations généralement uniquement morphologiques.

Williams et collaborateurs, en 2018 ont montré que les études ciblant spécifiquement les microsporidies et sans a priori sur leurs hôtes (études de diversité globale) avaient le potentiel de révéler une grande diversité. A partir d'échantillons marins et d'eau douce, ils ont en effet identifié une diversité nouvelle de microsporidies répartie dans les 5 clades initialement décrits. Leur étude a ainsi permis de révéler que la classification des microsporidies en 3 grands groupes en fonction de l'environnement dans lequel elles (ou leurs hôtes) étaient retrouvées n'était plus pertinente. Ils ont également pu observer que certaines microsporidies semblaient spécifiques à un environnement (voir même à un échantillon) et ainsi pourraient être spécifiques d'un hôte, alors que certaines étaient parfois retrouvées dans des milieux très différents (marin et d'eau douce). Ces dernières pourraient faire partie des microsporidies généralistes et infecter des hôtes très divers habitant des environnements tout aussi divers, ou encore n'avoir qu'un seul

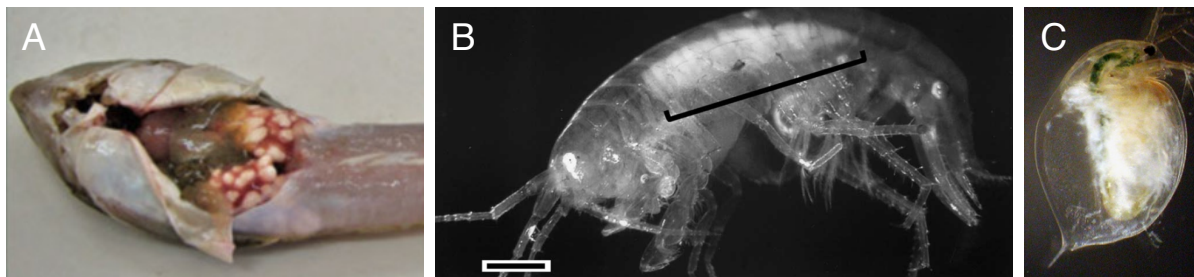


Figure 18 : Exemples d'effets de l'infection par les microsporidies chez divers hôtes.

(A) La microsporidie *Obruspora papernae* responsable de xénomes dans les ovaires du poisson *Callionymus filamentosus*. Modifié d'après Schuster *et al.*, 2022

(B) *Crangonyx pseudogracilis* (amphipode) infecté par la microsporidie *Fibrillanosema crangonycis*. L'infection provoque une opacité accrue de l'ovaire (barre noire). Échelle = 1 mm. Modifié d'après Galbreath *et al.*, 2004

(C) La microsporidie *Halmitosporidium tvaerminnensis* provoque une opacité des tissus en donnant un aspect « blanchâtre » à son hôte *Daphnia magna*. Modifié d'après Ebert, 2005

hôte retrouvé dans différents environnements ; comme les ciliés et nématodes par exemple, tolérant de larges gammes de salinité (Williams *et al.*, 2018).

2.2. Impact sur les populations hôtes

L'impact des microsporidies sur leurs hôtes peut être de différentes natures. Les effets chez les vertébrés sont majoritairement décrits pour les poissons, chez lesquels les infections par des microsporidies provoquent couramment des retards de croissance, un amaigrissement, une fécondité réduite et des taux de mortalité élevés (Schuster *et al.*, 2022) (**Figure 18**). Chez les reptiles et les amphibiens par exemple, les conséquences écologiques des infections sont peu connues car ce sont généralement des observations uniques ou résultant d'études en laboratoire (Bojko et Stentiford, 2022).

Les effets des infections microsporidiennes sont en revanche mieux connus chez les invertébrés, en particulier pour les insectes et crustacés. Ainsi, certaines des infections semblent être chroniques, avec une mortalité minimale de l'hôte (Didier *et al.*, 2014) ; d'autres affectent la survie et/ou la fécondité de leurs hôtes, pouvant parfois mener jusqu'à l'extinction de la population hôte, à l'instar de *Hamiltosporidium magnivora* qui peut conduire à l'extinction de la population hôte de daphnies en laboratoire (Ebert *et al.*, 2000). Certaines microsporidies peuvent induire une distorsion du sex-ratio par la mort ou la féminisation des mâles. *Amblyospora californica* provoque par exemple une infection bénigne chez les moustiques femelles (qui transmettent le parasite à la progéniture), et une infection plus importante menant à la mort chez les hôtes mâles (conduisant à la libération de spores pour la transmission horizontale) (Andreadis, 1985). Chez les gammarés, une distorsion du sex-ratio est constatée chez beaucoup d'espèces avec pour cause la féminisation des mâles par la perturbation du développement de la glande androgène chez les juvéniles (Terry *et al.*, 2004 ; Jahnke *et al.*, 2013). Enfin, un cas d'infection bénéfique sur la survie de l'hôte a été reporté chez *Gammarus roeseli* infecté par *Nosema granulosis*, bien que les mécanismes expliquant cet effet restent à déterminer (Haine *et al.*, 2007).

Les effets sur la survie et la fécondité diffèrent donc en fonction du parasite et de l'hôte (Ebert *et al.*, 2000), mais également en fonction des ressources. En effet, Koella et Agnew (1997) ont mis en évidence une augmentation des effets de la microsporidie *Edhazardia aedis* sur son hôte *Aedes aegypti* lorsque la disponibilité en nourriture diminuait. Les microsporidies peuvent

également être à l'origine de succession des populations hôtes, comme chez un trichoptère (*Brachycentrus americanus*) montrant une dynamique cyclique de densité qui serait dirigée par son parasite (Kohler et Hoiland, 2001). La plupart de ces effets ont été rapportés chez des hôtes d'eau douce et sont probablement identiques mais peu étudiés chez les hôtes en milieu marin (Stentiford *et al.*, 2013).

Les microsporidies, au-delà de l'effet direct sur leurs hôtes et les pertes économiques qu'elles entraînent, peuvent également avoir des effets indirects en affectant les organismes avec lesquels interagissent leurs hôtes, ayant ainsi un impact à plus grande échelle. *Brachycentrus americanus*, le trichoptère montrant une dynamique dirigée par son parasite, montre également des pics d'abondance coïncidant avec l'infection d'un trichoptère concurrent par une autre microsporidie (Kohler et Hoiland, 2001). Autre exemple, l'infection de daphnies par *Halmitosporidium tvaerminnensis* entraîne une réduction de la fécondité et de la longévité mais également une opacité des tissus des daphnies, ce qui les rend alors plus vulnérables face à leurs prédateurs (Ebert, 2005 ; Vizoso et Ebert, 2005) (**Figure 18**). Enfin, chez l'amphipode *Gammarus duebeni celticus*, hôte spécifique de la microsporidie *Pleistophora mulleri*, la mobilité est lourdement affectée lors de l'infection suite à une dégénérescence de la musculature abdominale, l'empêchant ainsi de chasser (Fielding *et al.*, 2005). L'infection rend les amphipodes hôtes également plus vulnérables au cannibalisme par les individus sains (conduisant ainsi à la transmission du parasite) ainsi qu'à l'amphipode invasif *Gammarus pulex* (MacNeil *et al.*, 2003a, 2003b ; Bunke *et al.*, 2019).

Par leurs impacts, les microsporidies semblent ainsi participer de façon directe et indirecte à la dynamique des populations dans les écosystèmes. Cependant, ce que nous savons des microsporidies et de leurs impacts s'arrête majoritairement à celles qui parasitent de gros organismes (crustacés, insectes). En extrapolant leur diversité et leurs effets sur des organismes de plus petite taille représentant les premiers maillons des réseaux trophiques, leur impact pourrait être majeur, à l'instar d'autres parasites mentionnés dans ce chapitre.

III. Objectifs de la thèse et organisation du mémoire

Cette analyse bibliographique met en évidence l'intérêt porté aux parasites dans les écosystèmes aquatiques ces dernières décennies. Comme nous l'avons vu, certains parasites représentent une partie non négligeable de la diversité eucaryote et sont responsables de la modulation des réseaux trophiques au travers de leurs impacts sur les communautés et les cycles de l'énergie et de la matière. Il est donc indispensable de décrypter la diversité des parasites ainsi que les interactions qu'ils développent avec les autres organismes. Malgré cet intérêt croissant, certains parasites restent absents des études visant à décrire leur diversité, à l'instar des microsporidies. Leur diversité, sans *a priori*, dans les écosystèmes aquatiques ainsi que leur spectre d'hôte sont largement sous-estimés et très peu étudiés, leurs impacts sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes restant alors globalement méconnus.

L'objectif général de ces travaux de thèse était d'améliorer nos connaissances sur les microsporidies en milieu aquatique. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à leur diversité, ainsi qu'à leur spectre d'hôtes dans des compartiments jusqu'ici sous-échantillonnés. En conséquence, diverses questions ont orienté les travaux menés durant cette thèse : Quelle est la diversité des microsporidies dans les milieux d'eau douce et marins ? Comment varie cette diversité au cours du temps et au travers des différents écosystèmes ? Ces variations sont-elles en lien avec leurs hôtes ? Quels sont leurs hôtes parmi les organismes à la base du fonctionnement des réseaux trophiques ?

Différentes recherches présentées dans ce manuscrit ont donc été menées afin de répondre à ces questions. La suite de ce mémoire de thèse s'articule ainsi :

- Le chapitre II présente les principales méthodes utilisées au cours de ce travail.
- Le chapitre III présente une étude, publiée en 2021 dans *Environmental Microbiology*, visant à créer une base de données de référence complète positionnant les microsporidies dans un cadre phylogénétique hiérarchisé. Nous montrons également la faisabilité de l'application de cette méthodologie à l'étude des microsporidies environnementales.
- Le chapitre IV expose les résultats d'une étude, publiée en 2022 dans *Environmental Microbiology*, qui visait (i) à décrire la diversité des microsporidies dans un environnement lacustre et à évaluer les variations de cette diversité au cours d'une

- année, (ii) à identifier de nouvelles associations entre microsporidies et hôtes eucaryotes parmi les protistes et le microzooplancton.
- Le chapitre V présente une étude, publiée en 2022 dans *Microbial Ecology*, qui a permis de mettre en évidence, au travers de deux approches, une nouvelle association entre une microsporidie et un rotifère dans un lac avec une importante prévalence.
- Le chapitre VI est une étude présentant et comparant la diversité des microsporidies ainsi que leurs hôtes potentiels dans différents environnements marins et d'eau douce. En révision (*Limnology and Oceanography*).

Enfin, une discussion générale (chapitre VII) permet d'aborder et d'intégrer l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse et d'évoquer de futures perspectives de recherche afin d'évaluer et de comprendre l'impact des microsporidies sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

CHAPITRE II

PRINCIPALES MÉTHODES UTILISÉES

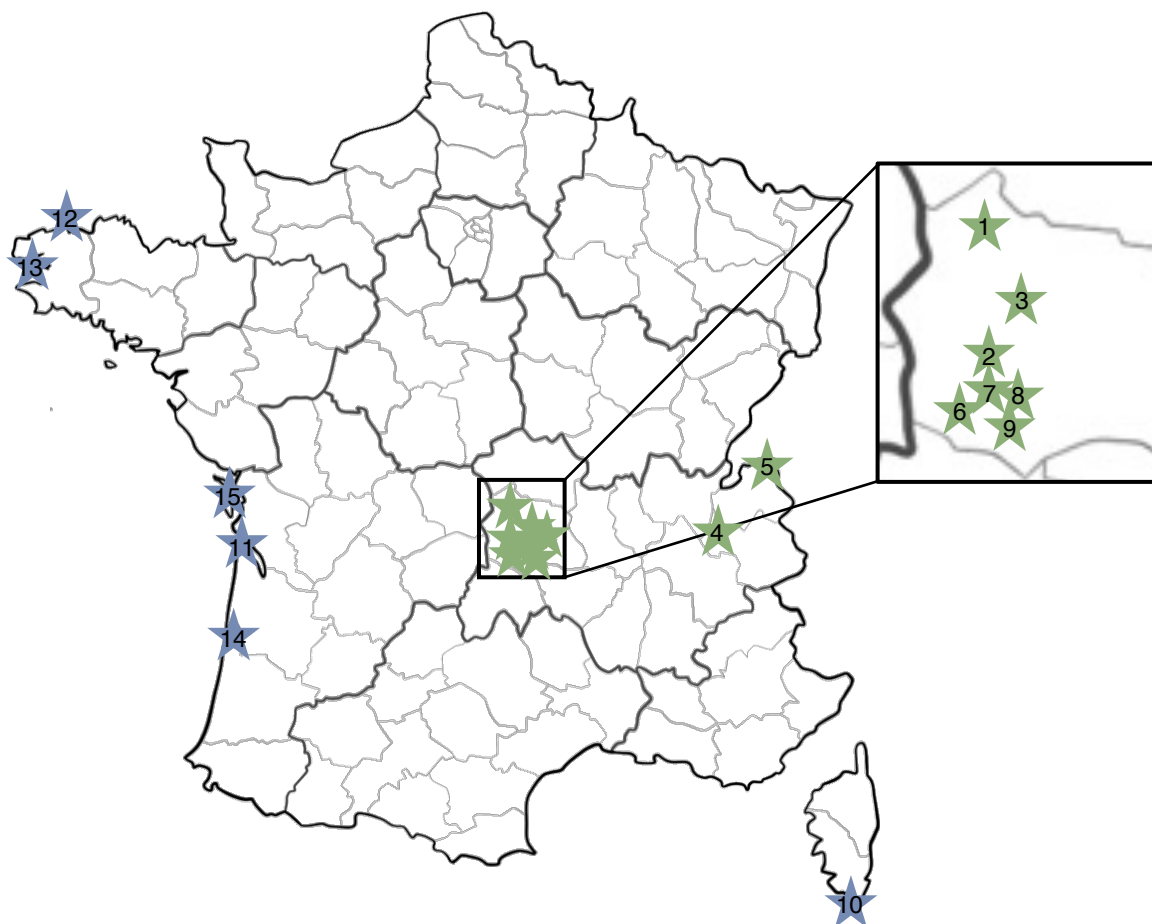


Figure 19 : Sites d'échantillonnage.

Les échantillons ont été collectés en France, en milieu d'eau douce (étoiles vertes) : 1 lac Saint-Gervais, 2 lac Chambon, 3 lac d'Aydat, 4 lac du Bourget, 5 lac Léman, 6 lac Chauvet, 7 lac Pavin, 8 marais de l'Estivadoux, 9 lac Bourdouze ; et en milieu marin (étoiles bleues) : 10 Corse, 11 Royan, 12 Roscoff, 13 rade de Brest, 14 bassin d'Arcachon, 15 La Rochelle.

Afin d'étudier la diversité des microsporidies dans les environnements aquatiques, une approche de métabarcoding a été employée (Chapitres III, IV et VI). Le métabarcoding est une approche très répandue pour l'analyse de la diversité des communautés microbiennes environnementales, ciblant un marqueur spécifique, et permettant théoriquement une évaluation exhaustive des organismes présents dans un échantillon (Geisen *et al.*, 2019).

Les données de séquençage générées lors des études de métabarcoding nous ont également permis de réaliser des réseaux de cooccurrence afin de mettre en évidence de potentielles associations entre microsporidies et eucaryotes (Chapitres IV et VI).

Enfin, la méthode TSA-FISH a également été utilisée lors de ces travaux de recherches, afin d'observer des microsporidies en association avec de potentiels nouveaux hôtes (Chapitres IV, V et VI).

I. Métabarcoding

1. Prélèvements et conservation des échantillons

Au total, 15 sites ont été étudiés lors de cette thèse (**Figure 19**). La première étude (chapitre III) a porté sur deux lacs du Massif central : Aydat et Pavin. La seconde (chapitre IV) s'est concentrée sur le lac d'Aydat. Enfin, la dernière étude (chapitre VI) a intégré 13 nouveaux sites de prélèvement, 7 d'eau douce en plus des lacs Aydat et Pavin (lacs : Saint-Gervais, Chambon, Bourget, Léman, Chauvet, Bourdouze ; marais : Estivadoux), ainsi que 6 sites marins (Arcachon, La Rochelle, Brest, Roscoff, Royan, Corse). La **Table 1** donne les coordonnées et le type d'écosystème de chacun des sites, ainsi que les dates de prélèvement.

Après l'échantillonnage, toujours réalisé dans la zone euphotique (voir **Table 1** pour les informations complémentaires relatives aux différents prélèvements : volume, profondeur, fraction, nombre de filtres), l'eau a été filtrée successivement à travers des toiles de porosité différentes afin d'obtenir différentes fractions de taille (0,8-10 μm ; 10-50 μm ; 50-150 μm ; chapitre III / 0,8-10 μm ; 10-150 μm ; chapitre IV / 0,8-150 μm ; chapitre VI). La fraction 0,8-10 μm permet majoritairement de concentrer les spores libres de microsporidies, leur taille étant généralement inférieure à 10 μm (Murareanu *et al.*, 20121). Les autres fractions de taille avaient pour but de concentrer les protistes et espèces microplanctoniques susceptibles d'être infectés par des microsporidies. Une partie de la biomasse microbienne de chaque fraction de taille a

Table 1 : Informations relatives aux prélèvements pour les études de métabarcoding.

A

Site	Date	Volume (litres)	Profondeur	Fractions (µm)	Nombre de filtres
Aydat 45°39' 50'' N, 2° 59' 04'' E Lac eutrophe	21/04/2016	10	ZEI 4,4 m	0,8-10 / 10-50 / 50-150	1 / fraction
	24/05/2016	6-10	ZEI 3,2 m	0,8-10 / 10-50 / 50-150	1 / fraction
	23/06/2016	6-10	ZEI 5,5 m	0,8-10 / 10-50 / 50-150	1 / fraction
Pavin 45°29' 45'' N, 2° 53' 16'' E Lac oligomésotrophe	21/04/2016	10	ZEI 7,5 m	0,8-10 / 10-50 / 50-150	1 / fraction
	24/05/2016	6-10	ZEI 7,5 m	0,8-10 / 10-50 / 50-150	1 / fraction
	23/06/2016	6-10	ZEI 14,8 m	0,8-10 / 10-50 / 50-150	1 / fraction

B

Site	Date	Volume (litres)	Profondeur	Fractions (µm)	Nombre de filtres	Filtre TSA-FISH
Aydat 45°39' 50'' N, 2° 59' 04'' E Lac eutrophe	19/11/2018	14	ZEI 3 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	17/12/2018	14	ZEI 5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	14/01/2019	14	ZEI 2,5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	20/02/2019	14	ZEI 2 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	01/04/2019	14	ZEI 5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	18/04/2019	14	ZEI 5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	06/05/2019	14	ZEI 1,8 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	27/05/2019	14	ZEI 5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	29/05/2019	14	ZEI 5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	03/06/2019	14	ZEI 5,5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	06/06/2019	14	ZEI 2,8 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	11/06/2019	14	ZEI 3 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	14/06/2019	14	ZEI 9,5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	17/06/2019	14	ZEI 9,5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	20/06/2019	14	ZEI 9,5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	01/07/2019	14	ZEI 10 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	29/07/2019	14	ZEI 9 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	02/09/2019	14	ZEI 8 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	08/10/2019	14	ZEI 8 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
	04/11/2019	14	ZEI 5 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X
02/12/2019	14	ZEI 4,3 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X	
07/01/2020	14	ZEI 4,3 m	0,8-10 / 10-150	2 / fraction	X	

C

Site	Coordonnées	Type d'écosystème	Date	Volume (litres)	Profondeur	Fraction (µm)	Nombre de filtres	Filtre TSA-FISH
Saint-gervais	46°02' 17'' N, 2° 48' 54'' E	Eau douce - Hypereutrophe	30/06/2021	10	Surface	0,8-150	4	X
Chambon	45°34' 10'' N, 2° 55' 26'' E	Eau douce - Eutrophe	01/07/2021	15	Surface	0,8-150	4	X
Aydat	45°39' 50'' N, 2° 59' 04'' E	Eau douce - Eutrophe	01/07/2021	15	ZEI 5,75 m	0,8-150	4	X
Bourget	45°44' 48'' N, 5° 51' 34'' E	Eau douce - Oligomésotrophe	06/07/2021	9,5	ZEI 10 m	0,8-150	4	X
Léman	46°27' 09'' N, 6° 35' 19'' E	Eau douce - Mésotrophe	07/07/2021	9,5	ZEI 10 m	0,8-150	4	X
Chauvet	45°27' 36'' N, 2° 49' 50'' E	Eau douce - Oligotrophe	22/07/2021	17	ZEI 9 m	0,8-150	4	X
Pavin	45°29' 45'' N, 2° 53' 16'' E	Eau douce - Oligomésotrophe	22/07/2021	14,5	ZEI 11 m	0,8-150	4	X
Estivadoux	45°29' 31'' N, 2° 54' 05'' E	Eau douce - Marais temporaire	22/07/2021	2,5	Surface	0,8-150	4	X
Bourdouze	45°28' 11'' N, 2° 55' 31'' E	Eau douce - Oligotrophe	22/07/2021	16	ZEI 2 m	0,8-150	4	X
Corse	41°28' 13'' N, 9° 04' 03'' E	Marin - Baie	31/08/2021	22	Surface	0,8-150	2	
Royan (Vaux-Sur-Mer)	45°37' 42'' N, 1° 03' 55'' W	Marin - Estuaire	15/08/2021	5	Surface	0,8-150	3	
Roscoff	48°46' 40'' N, 3° 56' 15'' W	Marin - Côtier	18/06/2021	9	Surface	>3	2	
Brest	48°18' 33'' N, 4° 26' 54'' W	Marin - Baie	22/06/2021	20	Surface	>3	4	
Arcachon	44°40' 08'' N, 1° 09' 52'' W	Marin - Baie	23/09/2021	10	Surface	0,8-150	4	X
La Rochelle	46°05' 03'' N, 1° 18' 29'' W	Marin - Côtier	27/09/2021	11,5	Surface	0,8-150	4	X

(A) Prélèvements dans les lacs d'Aydat et Pavin pour l'étude présentée en chapitre III. (B) Prélèvements dans le lac d'Aydat pour l'étude présentée en chapitre IV. (C) Prélèvements dans différents milieux d'eau douce et marins pour l'étude présentée en chapitre VI. ZEI = zone euphotique intégrée.

été recueillie sur des filtres en polycarbonate de porosité 0,8 μm (Millipore, Burlington, MA) à une pression inférieure à 15 kPa pour ne pas endommager les cellules. Les filtres ont été stockés à -80°C jusqu'à extraction des acides nucléiques (à sec pour les filtres destinés à l'extraction d'ADN ; dans un tampon RLT (RNeasy Mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) avec 1% de 2-mercaptoéthanol pour les filtres destinés à l'extraction d'ARN). Le reste de la biomasse microbienne a été utilisé pour la préparation des échantillons TSA-FISH (voir point III.2.).

2. Extractions d'acides nucléiques

Les spores de microsporidies sont relativement résistantes aux traitements chimiques en raison d'une paroi épaisse, contenant entre autres de la chitine. Il est ainsi nécessaire de réaliser une extraction incluant différentes étapes, dont une digestion mécanique et chimique de la paroi et une extraction au phénol-chloroforme (Weiss, 2000).

Les filtres destinés à l'extraction d'ADN (conservés dans des tubes Eppendorf) ont été recouverts du tampon d'extraction (glucose [50 mM], EDTA [10 mM], Tris [25 mM]). Les échantillons ont été agités trois fois pendant 30 secondes à 30 Hz (Bead Beater Retsch, Haan, Allemagne) et le surnageant a été récupéré. 0,1g de billes de verre de 0,1 mm (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) ont été ajoutés aux filtres et les échantillons ont à nouveau été agités, et le surnageant a été ajouté au premier. De l'EDTA [pH8] et une solution de lysozyme (concentrations finales 0,1 M et 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivement) ont été ajoutés au surnageant et les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 15 à 30 minutes sous agitation. Une solution de dodécylsulfate de sodium (1,8 % final), de la protéinase K (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ final) et de la RNaseA (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ final) ont ensuite été ajoutés, et les échantillons ont été incubés à 37°C pendant au moins 60 minutes. Une solution de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) (concentration finale de 1 % dans une solution de NaCl 0,7 M) a été ajoutée, et les échantillons ont été incubés à 65°C pendant 10 minutes. Les acides nucléiques ont été extraits avec l'ajout d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1 ; pH 7,9) et une centrifugation pendant 20 minutes à 15000g à 4°C . La phase aqueuse contenant les acides nucléiques a été conservée et purifiée en ajoutant du chloroforme-alcool isoamylique (24:1) et en centrifugeant pendant 20 minutes à 15000g à 4°C . A la phase aqueuse a été ajouté de l'isopropanol (0,6 volumes) afin de précipiter les acides nucléiques, pendant une incubation de 12 heures à 4°C . Après centrifugation pendant 1 heure à 15000g à 4°C , le culot d'ADN a été rincé à l'éthanol et remis en suspension dans 20 μL d'eau stérile.

Lors de l'une des études (chapitre IV), en plus d'une extraction de l'ADN, l'ARN a également été extrait en vue d'une analyse des communautés actives. Les filtres destinés à l'extraction d'ARN ont subi un premier broyage de trois cycles pendant 30 secondes à 30 Hz, le surnageant a été conservé. 400 µl de tampon RLT avec 1% de 2-mercaptoéthanol et 0,1 g de billes de verre de 0,1 mm ont été ajoutés et un second broyage a été effectué dans les mêmes conditions, le surnageant a été conservé avec le premier. L'extraction d'ARN a ensuite été réalisée avec un kit RNeasy Mini (Qiagen) selon les recommandations du fabricant, avec un triple traitement à la DNase I. L'ARN a finalement été élué dans 30 µl d'eau sans RNase. La qualité et la quantité d'ARN ont été analysées avec le kit RNA screen Tape et le système 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), et l'absence d'ADN a été vérifiée par PCR. L'ADNc a été obtenu par transcriptase inverse avec une SuperScript III et des amorces aléatoires (Invitrogen, Waltham, MA) selon les recommandations du fabricant.

3. Amplification par PCR

A la suite de la première étude validant l'application du métabarcoding pour l'étude de la diversité des microsporidies environnementales (chapitre III), le protocole ainsi que les conditions d'amplification par PCR ont été légèrement modifiés, et la purification a été réalisée avec un autre kit. Nous avons donc choisi de détailler ici le protocole utilisé dans les chapitres IV et VI (Les différences de protocole sont consultables dans la partie matériel et méthodes du chapitre III).

L'amplification de la région V1-V3 du gène codant pour l'ARNr 18S chez les microsporidies a été réalisée à l'aide du couple d'amorces universelles V1F (CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC) et 530R (CCGCGGCTGCTGGCAC) (Baker *et al.*, 1994 ; Weiss *et al.*, 1994). Chaque PCR a été réalisée dans un volume total de 30 µl contenant 6 µl de tampon Green GoTaq Flexi 5X, 2,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,18 µl d'ADN polymérase GoTaqG2 Flexi (Promega, Madison, WI ; 5 U µl⁻¹), 0,6 µl de dNTP (10 mM / dNTP), 0,3 µl de BSA (50 mg.ml⁻¹) et 0,6 µl d'amorces (10 µM / amorce). Après évaluation de la quantité d'ADN extraite pour chaque échantillon par un dosage au Qubit 3 Fluorometer (Invitrogen), 1 µl d'ADN à environ 50 ng/µl était ajouté au mélange. Les conditions d'amplification consistaient en une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 35 cycles de 1 minute à 95°C, 1 minute 30 secondes à 62°C, et 1 minute 30 secondes à 72°C, puis une élongation finale de 7 minutes à 72°C.

Dans les chapitres IV et VI, l'amplification de la région V4 des eucaryotes totaux (à l'exclusion des Microsporidies) a été réalisée à l'aide de l'amorce universelle 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTA) (Caporaso *et al.*, 2011) et de l'amorce eucaryote 951R (TTGGYRAATGCTTTCGC) (Mangot *et al.*, 2013). Chaque PCR a été réalisée dans le mélange décrit ci-dessus. Les conditions d'amplification consistaient en une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 33 cycles de 1 minute à 95°C, 1 minute à 55°C, et 1 minute 30 secondes à 72°C, puis une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Les amplicons ont été purifiés et concentrés à l'aide du kit d'extraction sur gel QIAquick (Qiagen). Les échantillons ont ensuite été séquencés sur des instruments MiSeq Illumina, en 2x300 pb pour la première étude présentée dans le chapitre III (GATC Biotech, Konstanz, Allemagne), et en 2x250 pb pour les études suivantes (chapitres IV et VI ; Biofidal, Vaulx-en-Velin, France ; Microsynth AG, Balgach, Switzerland).

4. Analyse des amplicons et affiliation taxonomique

Les données de séquençage ont été traitées à l'aide du pipeline PANAM2 (Phylogenetic Analysis of Next-generation AMplicons v2 - <https://github.com/meb-team/PANAM2>) (Taib *et al.*, 2013). Les séquences comportant des bases 'N' ambiguës, celles inférieures à 200 pb (300 pb, chapitre III), les chimères ou les erreurs de séquençage dans les amorces ont été éliminées. Les séquences ont ensuite été assemblées (chevauchement de 50 pb minimum entre les reads forward et reverse, maximum de 2 mismatches dans le chevauchement) et regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) avec un seuil de similarité de 99% pour les microsporidies (voir chapitre III) et de 95% pour les autres eucaryotes (Mangot *et al.*, 2013 ; Debroas *et al.*, 2017). Ensuite, les séquences représentatives de chaque OTU ont été affiliées en utilisant une base de données de référence (Freshwater-database : <https://github.com/panammeb/Freshwater-database>). Cette base de données contient des séquences de références eucaryotes extraites de la base de données SSU Ref SILVA (Pruesse *et al.*, 2007), des séquences typiques d'eau douce identifiées dans des études précédentes (*e.g.* Debroas *et al.*, 2015) et 528 séquences de 265 espèces de microsporidies (voir chapitre III). Enfin, un traitement final a consisté à éliminer les OTUs représentant moins de 0,005% (Bokulich *et al.*, 2013) du total des reads (ou moins de 0,05% dans un échantillon, chapitre III). Les données ont été normalisées en utilisant la méthode SRS (Scaling with Ranked Subsampling ; Beule et Karlovsky, 2020 ;

chapitre IV et VI) ou la raréfaction (phyloseq ; R Development Core Team, 2011 ; McMurdie et Holmes, 2013 ; chapitre III).

Toutes ces étapes nous ont ainsi permis d’aboutir à une table d’abondance, ou table d’OTUs, représentant l’abondance relative de chacun des OTUs dans nos différents échantillons.

II. Réseaux de cooccurrence

En utilisant des données méta-omiques (dont les données de métabarcoding), il est possible d’inférer des réseaux de cooccurrence à l’aide d’outils statistiques (Faust et Raes, 2012), permettant ainsi de détecter des associations entre micro-organismes (*e.g.* Chaffron *et al.*, 2010 ; Lima-Mendez *et al.*, 2015). En effet, les tables d’OTUs peuvent servir d’entrée aux méthodes d’inférence de réseaux, basées sur l’idée que les abondances sont façonnées par les interactions écologiques (Faust et Raes, 2012). Ainsi, des relations positives entre deux espèces sont déduites lorsqu’elles cooccurrent et des relations négatives sont déduites lorsqu’elles s’excluent mutuellement. Par exemple, les co-exclusions pourraient refléter une relation de compétition, alors que la cooccurrence pourrait être le signe d’un mutualisme. Le parasitisme peut être plus difficile à prévoir car le parasite dépend de son hôte mais peut aussi faire diminuer son abondance. Cependant, il a été montré que le parasitisme, malgré son impact potentiellement néfaste sur l’hôte, est toujours retrouvé comme un lien positif (une cooccurrence) entre les deux partenaires (Weiss *et al.*, 2016). Ces réseaux sont utilisés pour redécouvrir des associations déjà connues (permettant ainsi de confirmer la validité de l’approche), mais sont principalement utilisés afin de prédire des relations encore inconnues. Nous avons ainsi employé cette approche afin de détecter de potentielles associations hôte-parasite entre microsporidies et autres eucaryotes planctoniques (chapitres IV et VI).

Différentes méthodes sont utilisées pour l’inférence de réseaux de cooccurrence. Certaines sont basées sur l’inférence statistique (dissimilarité, corrélation et régression), d’autres, plus récentes, utilisent des modèles graphiques probabilistes (Layeghifard *et al.*, 2017). Dans tous les cas, pour l’inférence de réseaux, il est important de filtrer les OTUs de faible abondance, afin de ne pas établir de lien positif entre deux OTUs présentant de nombreux zéros dans le jeu de données (les taxons impliqués pourraient être réellement absents dans les échantillons ou varier indépendamment en dessous de la limite de détection) (Röttjers et Faust, 2018 ; Faust, 2021). Un autre problème rencontré est l’utilisation de données compositionnelles. Il est

communément admis que les données de séquençage sont compositionnelles puisque les abondances microbiennes sont souvent normalisées à la même somme totale de reads par échantillon en raison de la profondeur de séquençage variable selon les échantillons. Par conséquent, les associations microbiennes sont déduites des abondances relatives qui ne sont pas indépendantes (les changements dans l'abondance relative d'un taxon vont nécessairement influencer l'abondance relative des autres). De plus, il est maintenant reconnu que les données de séquençage sont par nature compositionnelles, puisque les instruments de séquençage sont limités dans leur capacité et fournissent donc de base des abondances relatives (Gloor *et al.*, 2017). Afin de faire face à ce problème, certaines méthodes d'inférence de réseaux ont été adaptées à l'utilisation de données compositionnelles, telles que SparCC (Friedman et Alm, 2012) ou encore SPIEC-EASI (Kurtz *et al.*, 2015).

Au cours de ces travaux de thèse, deux méthodes différentes ont été utilisées. Dans l'étude présentée dans le chapitre IV, le réseau de cooccurrence a été construit en utilisant SPIEC-EASI (SParse Inverse Covariance Estimation for Ecological Association Inference ; Kurtz *et al.*, 2015), une méthode parmi celles utilisant des modèles graphiques probabilistes. En revanche, pour l'étude présentée dans le chapitre VI, le nombre d'échantillons étant insuffisant pour utiliser cette méthode, nous avons utilisé le calcul des coefficients de corrélation de Spearman. La première méthode a été déterminée comme particulièrement efficace face à d'autres méthodes, en termes de précision et de capacité à supprimer les liens indirects. En effet, elle permet théoriquement de ne créer des liens entre OTUs que si leurs abondances ne sont pas conditionnellement indépendantes et s'il existe une relation entre eux qui ne peut pas être expliquée par un autre lien (comme un autre OTU) (Kurtz *et al.*, 2015 ; Röttgers et Faust, 2018). Cette méthode est également particulièrement adaptée aux données compositionnelles, en incluant une étape de transformation développée pour ce type de données. Les méthodes « classiques » comme celles utilisant les coefficients de corrélation sont progressivement délaissées pour des méthodes d'inférence de réseau plus sophistiquées (nécessitant cependant un nombre important d'échantillons), mais présentent tout de même une efficacité proche de ces dernières (Hirano et Takemoto, 2019 ; Faust, 2021).

Pour le chapitre IV, les OTUs ayant une abondance totale supérieure à 0,05% ont été inclus, et les données brutes ont été utilisées (avant normalisation), la fonction SpiecEasi comprenant une étape de normalisation (transformation log-ratio centrée) permettant d'atténuer le biais de compositionnalité (Aitchison, 1981). Le réseau de cooccurrence a été construit en utilisant la

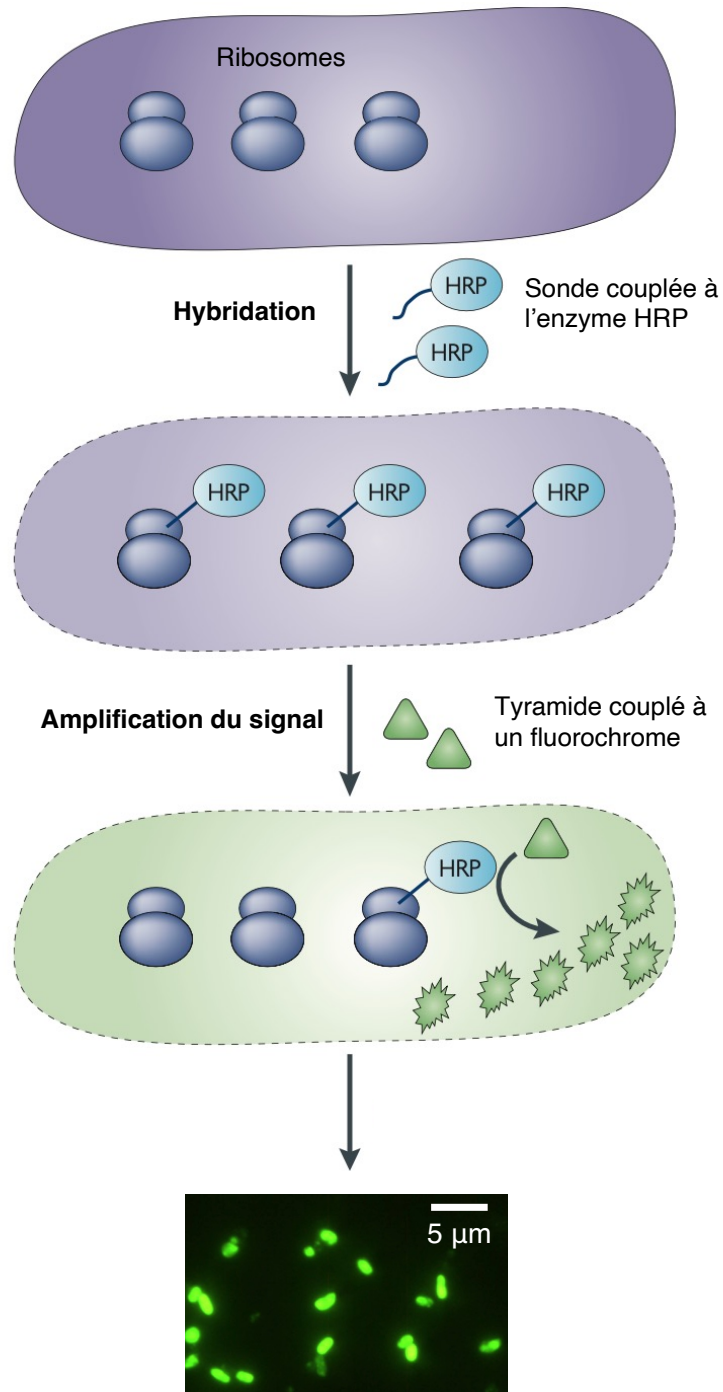


Figure 20 : Illustration des différentes étapes de la méthode TSA-FISH.

Une sonde oligonucléotidique couplée à l'enzyme HRP va s'hybrider de façon spécifique sur la séquence cible (ici l'ARNr 18S des microsporidies). Le tyramide, substrat de l'enzyme, associé à un fluorochrome est ensuite ajouté : l'enzyme HRP va alors transformer le tyramide (*via* une radicalisation oxydative) qui se fixera dans les cellules. Pour chaque enzyme, plusieurs réactions sont réalisées, ce qui permet une amplification du signal. Modifié d'après Amann et Fuchs, 2008

méthode « neighbourhood selection » (Meinshausen et Bühlmann, 2006). Nous avons utilisé les paramètres de SPIEC-EASI déterminés comme ceux générant les graphiques les moins denses par Benoiston (2019) : $\lambda.min.ratio = 0,001$, $n\lambda = 20$, $rep.num = 20$.

Pour le chapitre VI, nous avons également appliqué un filtre d'abondance, seuls les OTUs présentant une abondance totale supérieure à 0,05% ont été inclus. Les coefficients de corrélation ρ de Spearman ont été calculés, et nous avons utilisé la correction de Benjamini-Hochberg (Benjamini et Hochberg, 1995) afin de diminuer le taux de fausse découverte dû aux tests multiples. Une corrélation a été considérée comme valide lorsque $\rho > 0,8$ et la p-value associée $< 0,01$.

III. TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification – Fluorescence *In Situ* Hybridization)

La méthode FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) permet de détecter des microorganismes libres dans l'environnement et/ou de les localiser en association avec d'autres organismes (attachés ou au sein de leurs hôtes pour les parasites) (Amann *et al.*, 2001). Cette technique est basée sur l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique couplée à un fluorochrome qui va s'hybrider spécifiquement sur une séquence cible (FISH « classique »). Le TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification-FISH), quant à lui, fait intervenir une sonde couplée à l'enzyme HRP (Horseradish Peroxydase) et le substrat de cette enzyme (le tyramide) associé à un fluorochrome. Cette deuxième technique (également appelée CARD-FISH ; CAtalyed Reported Deposition-FISH) permet une amplification du signal, alors de 10 à 20 fois plus important qu'avec la méthode FISH « classique » (Schonhuber *et al.*, 1997). Elle est ainsi indispensable avec des échantillons environnementaux pour lesquels la technique « classique » ne permet pas l'obtention de signaux fluorescents suffisamment intense.

Les principales étapes de la méthode TSA-FISH sont résumées sur la **Figure 20**.

1. Design et mise au point de l'utilisation d'une sonde universelle pour la détection des microsporidies

La sonde USP01 (5' GTCAGGCAGAATCAACCTGG 3') a été dessinée par Aurore Dubuffet en amont de cette thèse, avec pour objectif de créer une sonde universelle pour la détection des microsporidies. *In silico*, celle-ci peut s'hybrider (0 mismatch) avec 87% des espèces sur lesquelles un alignement est possible. En revanche, elle est capable de s'hybrider avec 100% des séquences de microsporidies obtenues lors des études de métabarcoding présentées dans ce manuscrit (Chapitres III, IV et VI). Elle est ainsi parfaitement adaptée à la détection et l'observation de microsporidies présentes en milieu aquatique. De plus, *in silico*, la sonde ne s'hybride avec aucune séquence qui n'appartient pas au phylum des microsporidies.

Avec la méthode FISH (avec ou sans amplification), deux paramètres permettent d'obtenir une hybridation spécifique des sondes sur les séquences cibles : la concentration en formamide dans le tampon d'hybridation, et la température d'hybridation.

Le formamide est un agent déstabilisant des liaisons hydrogènes et est ainsi un dénaturant couramment utilisé dans les techniques d'hybridation pour ajuster la stringence. A mesure que la concentration de formamide dans le tampon d'hybridation augmente, les duplex sonde/cible se dénaturent. La dénaturation se déroulant plus rapidement pour des duplex non compatibles que pour des correspondances parfaites, il existe une gamme optimale de concentration de formamide qui élimine efficacement la réponse du signal du aux organismes non cibles tout en conservant un signal élevé pour les cibles (Yilmaz *et al.*, 2012). De même, la température permet, lorsqu'elle est haute, de casser les liaisons hydrogènes et ainsi de dénaturer l'ADN et d'empêcher des mésappariements de se former. Par conséquent, si la température choisie et/ou la teneur en formamide sont trop basses, la sonde pourra s'hybrider avec une séquence qui n'est pas parfaitement complémentaire (hybridation non spécifique). A l'inverse, si la température choisie et/ou la concentration en formamide sont trop hautes, il n'y aura pas d'hybridation entre la sonde et une séquence complémentaire.

J'ai ainsi déterminé les conditions d'hybridation de la sonde USP01 sur deux espèces de microsporidies cultivées au laboratoire : *Anncaliia algerae* et *Encephalitozoon cuniculi*. La première a été considérée comme une espèce non cible, car elle présente un mismatch avec la sonde USP01, tandis que la seconde est une espèce cible (aucun mismatch). L'objectif était d'identifier les conditions permettant d'avoir à la fois un signal net sur l'espèce cible et

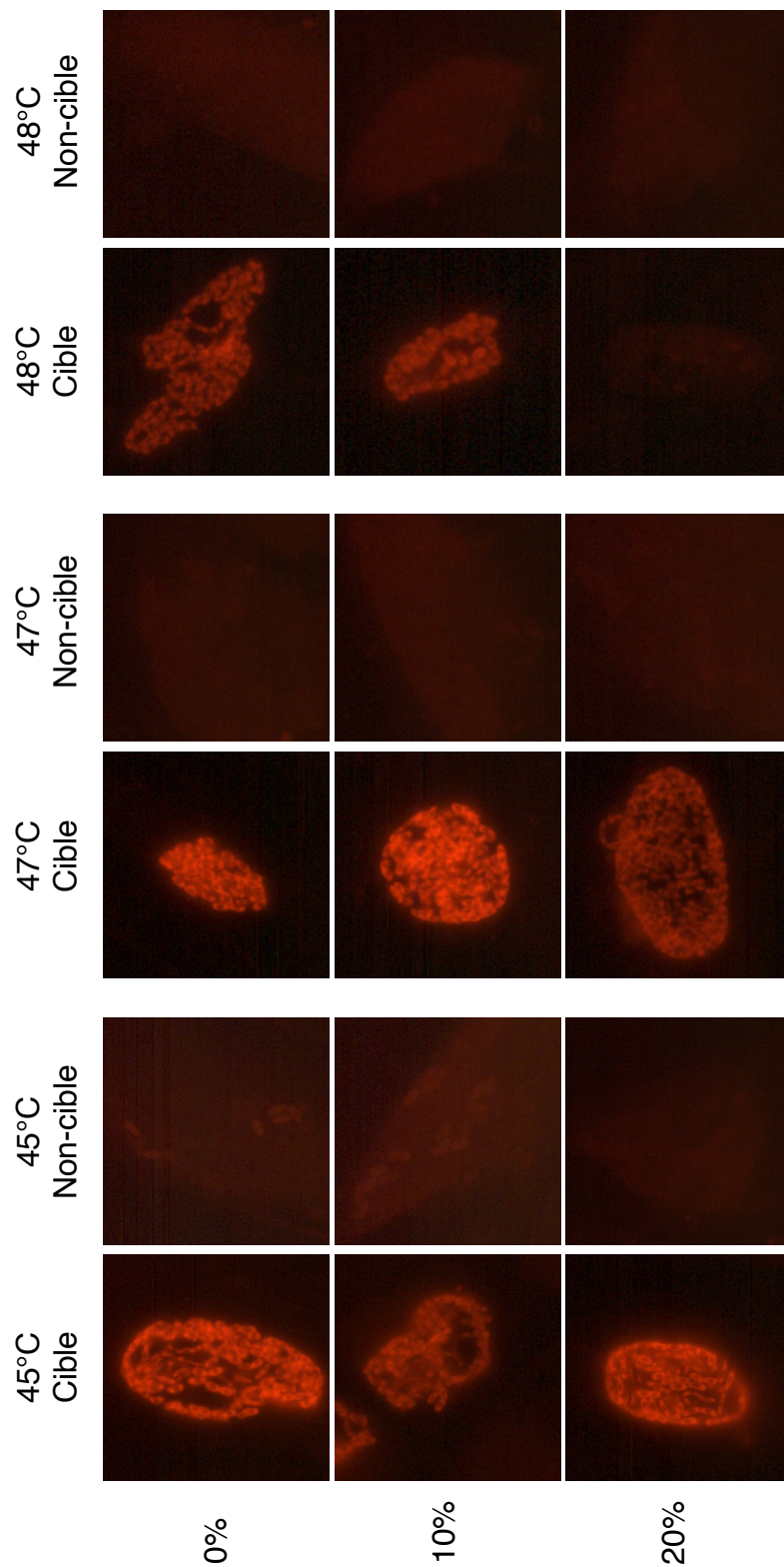


Figure 21 : Mise au point des conditions d'utilisation de la sonde USP01.

La sonde a été testée, à différentes températures et avec un tampon d'hybridation contenant différents pourcentages de formamide, sur l'espèce cible *E. cuniculi* et sur l'espèce non cible *A. algerae*. A 45°C et 20% de formamide ainsi qu'à 47°C sans formamide, il n'y a pas d'hybridation sur l'espèce non cible et un signal d'hybridation intense sur l'espèce cible. Avant ces conditions, un léger signal est visible sur l'espèce non cible. Dès 47°C et 20% de formamide, une perte progressive du signal sur l'espèce cible est constatée.

l'absence de signal sur l'espèce non cible. Plusieurs essais ont été réalisés en faisant varier la température de 40°C à 52°C, et la concentration en formamide de 0% à 50% dans le tampon d'hybridation.

Les premières mises au point afin d'identifier les conditions de parfaite stringence pour la sonde USP01 ont été réalisées en FISH « classique », avec la sonde couplée au fluorochrome Cy3. Ces conditions ont été obtenues à 45°C et 20% de formamide, ainsi qu'à 47°C et 0% de formamide (**Figure 21**). Cependant, avec la méthode TSA-FISH et sur des échantillons environnementaux, il s'est avéré que les conditions optimales étaient 45°C et 10% de formamide. Ces conditions permettaient un meilleur signal sur l'espèce cible en culture, ainsi qu'une nette amélioration du bruit de fond sur des échantillons environnementaux. En effet, les conditions optimales d'hybridation peuvent changer entre une sonde couplée à un fluorochrome et la même sonde couplée à l'enzyme HRP (Riou *et al.*, 2017). Hoshino et collaborateurs (2008) ont montré que, pour les mêmes conditions d'hybridation, le complexe sonde-HRP/séquence cible se dissociait plus rapidement que le complexe sonde-fluorochrome/séquence cible, démontrant bien la nécessité de revoir les conditions d'hybridation après chaque modification du protocole, en particulier lors du passage au TSA-FISH.

2. Préparation des filtres environnementaux

Pour certains prélèvements (**Table 1**), une partie du filtrat de la fraction 10-150 µm (voir point I.1.) a été conservée pour les marquages en TSA-FISH.

Après fixation au paraformaldéhyde (concentration finale à 2%) pendant 24 heures à 4°C, 10 à 50 ml de chaque échantillon ont été filtrés sur filtres de polycarbonate de porosité 0,8 µm (Millipore), à une pression n'excédant pas 15 kPa. Les filtres ont ensuite été déshydratés avec trois bains successifs (trois minutes chacun) à l'éthanol 50, 80 et 100%, et conservés à -20°C jusqu'à analyse. Pour chaque marquage en TSA-FISH, une culture de la microsporidie *E. cuniculi* a été utilisée comme témoin positif. Le même échantillon a été employé sans sonde dans le tampon d'hybridation, afin de servir de témoin négatif.

3. Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Le tampon d'hybridation (formamide déionisé à 10%, NaCl 0,9 M, Tris-HCl 20 mM [pH 7,5], dodécylsulfate de sodium 0,01%, réactif de blocage 10% [Roche Diagnostics/Boehringer], sonde USP01-HRP [0,5µM, final]) a été déposé sur des lames recouvertes de parafilm. Les filtres, coupés en sections, ont été retournés face contre le tampon d'hybridation déposé sur les lames. L'hybridation a été réalisée dans une chambre humide à 45°C, sur la nuit. Les sections de filtres ont ensuite été transférées dans 4mL de tampon de lavage (450 mM NaCl, 0,01 % de dodécylsulfate de sodium, 20 mM Tris-HCl [pH 7,5]), à 47°C pendant 20 minutes ; cette opération a été réalisée trois fois. Les filtres ont ensuite été déposés dans un tampon d'équilibration, ou tampon TNT (Tween 20 à 7%, NaCl 150 mM, Tris-HCl 100mM [pH 7,5]), à température ambiante, au noir, pendant 15 minutes.

4. Amplification du signal par réaction du Tyramide (TSA)

Après l'équilibration dans le bain de TNT, les filtres ont été retournés face contre des lames recouvertes de parafilm sur lesquelles a été déposé la solution de TSA : mélange (1 :1) de sulfate de dextran à 40% (Sigma-Aldrich) et de diluant d'amplification 1X (Perkin-Elmer, Waltham, MA), auquel est ajouté un volume d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) couplé au tyramide (PerkinElmer) pour 50 volumes de réaction. La réaction d'amplification a été réalisée à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. Les filtres ont ensuite été transférés dans deux bains successifs de 4 ml de tampon TNT à 55°C (préchauffé au préalable) pendant 20 min chacun pour arrêter la réaction enzymatique et éliminer le sulfate de dextran.

5. Observation des lames

Après un dernier rinçage à l'eau stérile de 5 minutes à température ambiante, les sections de filtres ont été mises à sécher pendant 30 minutes minimum, à l'obscurité. Elles ont ensuite été montées entre lame et lamelle dans un mélange contenant le réactif anti-fading AF1 (Citifluor ; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), le milieu de montage Vectashield (Vector

laboratories, Burlingame, CA) et du DAPI (4',6-diamidino- 2-phenylindole) (~ 80% : 20% : 0,2%).

Les échantillons marqués en TSA-FISH ont été observés en routine sur deux microscopes à épifluorescence disponibles au laboratoire, un Leica DM IRB (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) et un Zeiss Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Un microscope confocal, Zeiss LSM 980, a également été utilisé (Chapitre V) pour observer certaines interactions hôte-parasite avec plus de précision, en permettant une coupe plus fine pour l'observation de la superposition des marquage FISH et DAPI.

CHAPITRE III

DÉFINITION D'UN CADRE PHYLOGÉNÉTIQUE
POUR L'ÉTUDE DES COMMUNAUTÉS DE
MICROSPORIDIES PAR MÉTABARCODING ET
APPLICATION AUX ÉCOSYSTÈMES LACUSTRES

Contexte de l'étude

Les microsporidies constituent un vaste groupe de parasites intracellulaires obligatoires apparentés aux champignons, connus principalement comme parasites de vertébrés et d'invertébrés. En effet, les microsporidies sont couramment décrites comme parasites d'organismes d'intérêt (*e.g.* insectes auxiliaires, bioindicateurs, humains, poissons et crustacés comestibles). Elles sont présentes dans tous types d'environnements, en particulier dans les milieux aquatiques dans lesquels environ 70% des microsporidies sont retrouvées. Pourtant, ce groupe de parasites est généralement absent des études de métabarcoding visant à décrire la diversité des parasites et/ou des microeucaryotes dans les écosystèmes lacustres. Leur absence dans ces études pourrait être en grande partie due à l'utilisation d'amorces « universelles eucaryotes » classiquement utilisées mais qui ne sont pas adaptées aux microsporidies, celles-ci étant extrêmement divergentes des autres eucaryotes. Par ailleurs, la taxonomie des microsporidies reposant principalement sur des caractères morphologiques et n'étant pas compatible avec les analyses phylogénétiques (Vossbrinck et Debrunner-Vossbrinck, 2005 ; Tokarev *et al.*, 2020), les séquences obtenues par séquençage à haut débit pouvaient être attribuées de manière incorrecte en utilisant les bases de données disponibles.

L'objectif de cette étude était ainsi de développer une approche adaptée aux microsporidies, pour l'étude de leur diversité en métabarcoding. Pour cela, une base de données de référence reposant sur l'analyse phylogénétique de 265 espèces de microsporidies, permettant de les classer dans un cadre hiérarchisé cohérent, a été développée. Un nouvel arbre phylogénétique deux fois plus exhaustif que les arbres de référence identifiant neuf clades au sein des microsporidies (hors microsporidies primitives) a ainsi été proposé. Cette base de données, ainsi que des amorces et un seuil de clusterisation adaptés ont ensuite été utilisés afin d'étudier la diversité des microsporidies dans deux lacs d'eau douce.

Ce travail, initié par Aurore Dubuffet et Cécile Lepère avant le début de ma thèse, constitue le point de départ des recherches que j'ai développées par la suite. J'ai contribué à ce premier article en participant à l'analyse de la diversité des communautés de microsporidies (raréfaction, indices de diversité, analyses multivariées) et à l'écriture du manuscrit.

A phylogenetic framework to investigate the microsporidian communities through metabarcoding and its application to lake ecosystems

Aurore Dubuffet¹, Marina Chauvet, Anne Moné, Didier Debroas and Cécile Lepère

¹ Corresponding author: aureore.dubuffet@uca.fr

CNRS, Laboratoire Microorganismes : Génome Et Environnement, Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

Publié dans *Environmental Microbiology* – Juin 2021

doi: 10.1111/1462-2920.15618

I. Abstract

Microsporidia are obligate intracellular eukaryotic parasites known to parasitize many species of the animal kingdom as well as some protists. However, their diversity is underestimated, in part as a consequence of the failure of ‘universal’ primers to detect them in metabarcoding studies. Besides, due to the inconsistency between taxonomy and phylogenetic data, available databases may assign incorrectly sequences obtained with high-throughput sequencing. In this work, we developed a comprehensive reference database which positions microsporidian SSU rRNA gene sequences within a coherent ranked phylogenetic framework. We used this phylogenetic framework to study the microsporidian diversity in lacustrine ecosystems, focusing on < 150 µm planktonic size fractions. Our analysis shows a high diversity of Microsporidia, with the identification of 1531 OTUs distributed within seven clades, of which 76% were affiliated to clade IV2 and 20% to clade I (nomenclature presented hereby). About a quarter of the obtained sequences shared less than 85% identity to the closest known species, which might represent undescribed genera or families infecting small hosts. Variations in the abundance of Microsporidia were recorded between the two lakes sampled and across the sampling period, which might be explained by spatio-temporal variations of their potential hosts such as microeukaryotes and metazooplankton.

II. Introduction

For long underestimated, the diversity of parasites and their central role in the functioning of ecosystems are nowadays recognized (Lafferty *et al.*, 2006; Dobson *et al.*, 2008; Lafferty *et al.*, 2008). For example, it is estimated that about 40% of species, all ecosystems combined, are parasites (Dobson *et al.*, 2008) and that more than 75% of the trophic links include parasites (Lafferty *et al.*, 2006). However, these parasites only represent 5% of the described species (Costello, 2016) and further studies are needed to reveal the extent of their diversity and to clarify their role in ecosystems. The advent of molecular approaches, in particular metabarcoding, has revealed a considerable diversity of microeukaryotes (< 200 µm) in different types of ecosystems, including parasite groups which can represent up to 50% of the total diversity (Cleary and Durbin, 2016; Lepère *et al.*, 2016; Mahé *et al.*, 2017). In lacustrine ecosystems, these studies highlighted the presence of several group of putative parasites, such as chytrids (Fungi), Apicomplexa and Perkinsea (Alveolates; Debroas *et al.*, 2017). Some groups of parasites, however, are largely absent from these studies (see Bass *et al.*, 2015 for review). This is the case of Microsporidia, which are obligate unicellular intracellular parasites related to Fungi (Vavra and Lukes, 2013). Because of their rapid evolution and significant reduction of their genomes (Keeling and Fast, 2002), they are genetically divergent from other eukaryotes, making the primers conventionally targeting the conserved regions of the rRNA 18S gene ineffective (Marande *et al.*, 2009; Hadziavdic *et al.*, 2014; Hugerth *et al.*, 2014). Some studies attempted to characterize the diversity of this phylum using Microsporidia-specific primers, mainly in particular hosts such as daphnids, amphipods or mosquitoes (Weigl *et al.*, 2012; Quiles *et al.*, 2019; Trzebny *et al.*, 2020) but more rarely in environmental samples (Ardila-Garcia *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2018).

Based on ultrastructural, ecological (*e.g.*, host species, habitat, transmission route) and tissue tropism criteria, more than 1300 Microsporidia species have been described so far (Vossbrinck *et al.*, 2014), most infecting one or several closely related hosts. This may nevertheless represent only a minor fraction of their real diversity, as the number of microsporidian species is estimated to approach the number of all animal species (Keeling and Fast, 2002; Larsen *et al.*, 2017). Microsporidia are found in all ecosystems, and particularly in aquatic ecosystems which harbour about 50% of the described genera (Stentiford *et al.*, 2013a). Vertebrates, crustaceans and insects alone account for nearly 80% of known microsporidian hosts (Stentiford *et al.*, 2013a; Weiss and Becnel, 2014; Stentiford *et al.*, 2016). Such proportion however is likely due to biases towards the search of infectious agents in hosts of sanitary (human, disease vector

insects such as mosquitoes), veterinarian (domestic and farm animals), agronomic (auxiliary insects and pests) or ecological importance (daphnids, amphipods). As a result, the global diversity of Microsporidia is largely unknown, particularly in small sized hosts, such as protists which represent only 10 of the 7366 microsporidian SSU sequences listed in the databases (NCBI consultation 18/11/2020 with the key words 'small subunit ribosomal' + microsporidia).

In this work, we used a targeted metabarcoding approach to specifically study the microsporidian diversity in lake ecosystems, focusing on planktonic fractions containing small sized hosts. High-throughput sequencing classically produces thousands of sequences, which need to be assigned taxonomically in order to perform comparisons between samples. Such assignments are based on databases that link sequences to taxonomy. We first checked the consistency between available databases and phylogenetic data, and found that they are either weakly detailed or contain several errors. We thus built a comprehensive reference database which positions microsporidian SSU rRNA gene sequences within a coherent ranked phylogenetic framework covering the microsporidian diversity. Moreover, we addressed the question of operational taxonomic unit (OTU) definition in Microsporidia. Indeed, sequences of taxonomic marker genes with high similarity scores are classically clustered into OTUs, themselves considered as proxies for species. We therefore determined the clustering threshold that maximizes the recovery of distinct species and/or genera for microsporidian SSU sequences. Using this framework, we highlighted a considerable uncovered microsporidian diversity in our samples, and evidenced spatio-temporal variations in the abundance of many Microsporidia species.

III. Experimental procedures

1. Microsporidia database

An exhaustive search of all Microsporidia species for which a SSU sequence is available was conducted (last update: March 2020), using hundreds of publications and the NCBI database (nucleotides and WGS sequences). We focused on the canonical Microsporidia, characterized by a specific invasion apparatus known as the polar tube, an extreme genome compaction, a lack of true mitochondria, and an rRNA operon of prokaryote-like size and structure (Wadi and Reinke, 2020). We also included sequences from Chytridiopsida and Metchnikovellida,

considered as unusual Microsporidia as they lack some of the typical features of Microsporidia (Mikhailov *et al.*, 2016; Corsaro *et al.*, 2019). When several sequences were found for a species, we kept the longest or the most consensual one. We found 337 microsporidian species with a SSU sequence. We then selected the species for which the full length of the SSU rRNA gene was available (at least 90% of the V1-V9 region, 265 sequences, Supporting Information 1). Their taxonomic assignments were searched in public databases (NCBI, SILVA, PR², PHYMYCO-DB) and compared with several microsporidian phylogenies (Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005; Smith, 2009; Vossbrinck *et al.*, 2014; Corsaro *et al.*, 2019) and a recent taxonomic review (Wijayawardene *et al.*, 2018).

As none of the public databases was satisfying (see results), we built an extensive phylogeny of Microsporidia, based on their full-length SSU gene sequences. These sequences, as well as six outgroup sequences (from *Rozella allomycis*, *Paramicrosporidium sp.*, *Nucleophaga sp.* and *Mitosporidium daphnia*), were aligned using the online version of MAFFT [ver. 7; Computational Biology Research Consortium (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>); Katoh *et al.*, 2005] with the E-INS-i multiple alignment method, leaving gappy regions, a gap opening penalty of 1.0 and gap extension penalty extension of 0.0. The alignment was checked using MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) and both ends were trimmed. The resultant alignment was analysed by Maximum Likelihood (ML) and Neighbour joining (NJ) using MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). A General Time-Reversible (GTR) model of evolution with gamma-distributed rate heterogeneity (G) and a proportion of invariable sites (I) (GTR + G + I) was used to create the ML tree, with 500 bootstrap replications and partial deletion (85%). The NJ tree was obtained using the Kimura-2-parameter model with a gamma distribution of 4, partial deletion (85%) and 1000 bootstraps. Metadata (habitat and hosts) were reported on the ML tree using iTOL (Letunic and Bork, 2016). Similar phylogenetic analyses were done using the region of the SSU gene which was chose for the metabarcoding analysis described below (V1–V3, corresponding to the first three variables regions of the SSU gene). These trees were used to define three phylogenetic ranks inside the Microsporidia phylum: clade, group and genus. This classification (see results and discussion section) was subsequently used to assign the OTUs obtained from environmental samples.

2. OTU definition

We tested different clustering thresholds on selected SSU sequences (species with a clear genus affiliation, and for which the full length of the SSU gene was available, 255 sequences) in order to determine which one could maximize the recovery of distinct genera and species. Full-length and V1–V3 sequences were aligned with the Needleman-alignment algorithm and a distance matrix was obtained with the `pairwise.seqs` command in Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Then, the average neighbour algorithm was used with clustering thresholds ranging from 100% (unique sequences) to 90% in steps of 1%. The number of obtained OTUs was then compared to the number of species (255) and genera (104) in the dataset (% recovery).

3. Study sites and sampling procedure

The study was conducted in two lakes (Massif Central, France). Lake Pavin (45° 55' N and 2° 54' E) is an oligo-mesotrophic lake with an area of 0.44 km² and a maximum depth of 92 m, at an altitude of 1197 m above sea level. It is a meromictic lake characterized by the presence of two permanent stratified layers. Lake Aydat (45° 39' 50'' N, 2° 59' 04'' E) is a dimictic and eutrophic lake with a maximum depth of 15 m, situated at an altitude of 825 m. In April, May and June 2016, water samples were collected in the euphotic zone of both lakes at a permanent station located at the deepest zone of the water column.

Of note, 6–10 L of water were filtered successively through 150 µm, 50 µm and 10 µm pore-size filters in order to concentrate Microsporidia spores (< 10 µm fraction) and planktonic species susceptible to host Microsporidia (10–50 and 50–150 µm fractions). The microbial biomass of each size-fraction was collected on 0.8 µm pore-size (pressure, < 10 kPa) polycarbonate filters (Millipore, Molsheim, France) and stored at 80°C until further analysis.

4. Nucleic acids extraction, amplification and sequencing

Filters were covered with the extraction buffer (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris). Of note, 0.1 g of 0.1 mm glass beads were added and samples were homogenized in a bead beater (3 pulses for 30s at 30Hz). Tubes were then centrifuged during 1 min at 600g. EDTA

pH8 and a lysozyme solution (final concentrations 0.1 M and 1.5 mg ml⁻¹ respectively) were added to the supernatant and incubated at 37°C for 30 min. Then sodium dodecyl sulfate (1.8%, final), proteinase K (100 µg ml⁻¹, final) and RNaseA (50 µg ml⁻¹, final) were added, and samples were incubated at 37°C for at least 60 min. A cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) solution (final concentration 1% in a 0.7 M NaCl solution) was added, and samples were incubated at 65°C for 10 min. Nucleic acids were extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1); the aqueous phase containing nucleic acids was kept and purified by adding chloroform-isoamyl alcohol (24:1). After isopropanol (0.6 vol) addition, the nucleic acids were precipitated at 20°C for 12 h. After centrifugation, the DNA pellet was ethanol rinsed and resuspended in 20 µl of water.

Amplification of the V1–V3 region of the Microsporidia small subunit rDNA was performed using the universal microsporidian V1F (CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC) and 530R (CCGCGGCTGCTGGCAC) primers set (Baker *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1994) modified by adding barcodes. Each PCR was performed in a total volume of 30 µl containing 3 µl of 10 NH₄ reaction buffer, 1.2 µl of 50 mM MgCl₂, 0.15 µl of EurobioTaqII (Eurobio, Les Ulis, France, 5 U µl⁻¹), 0.6 µl of 10 mM each dNTP, 0.3 µl of 50 mg ml⁻¹ BSA and 1.2 µl of each 5 µM primer. The amplification conditions consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 35 cycles for 1 min at 94°C, 1 min 10 s at 61°C and 1 min at 72°C and a final elongation of 7 min at 72°C.

The PCR products were run on a 1.2% agarose gel electrophoresis. The amplicons were purified and concentrated using the MinElute gel extraction kit (Qiagen[®], Courtaboeuf, France), and quantified using the Agilent 2200 TapeStation system and the D1000 ScreenTape kit (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Finally, the purified amplicons for each sample were pooled at equimolar concentrations and sent to GATC Biotech (Konstanz, Germany) for library preparation and paired-end (2 x 300 bp) sequencing on a MiSeq Illumina instrument (San Diego, CA).

5. Amplicons analysis & phylogenetic affiliation

The MiSEQ data were assembled with the VSEARCH tool (Rognes *et al.*, 2016). These sequences were then subjected to four cleaning procedures: (i) no undefined bases (Ns), (ii) a minimum sequence length of 300 bp, (iii) no sequencing error in the forward and reverse

primers and (iv) no chimeras (Edgar *et al.*, 2011). After this cleaning step and demultiplexing process, the remaining DNA sequences were clustered at 99%. The representative OTUs were then affiliated by similarity and phylogeny using a custom curated reference database (Freshwater-database: <https://github.com/panammeb/Freshwater-database>). This database contains eukaryote references extracted from the SSURef SILVA database (Pruesse *et al.*, 2007), typical freshwater lineages identified in previous studies (*e.g.*, Debroas *et al.*, 2015), and 528 sequences from the 265 microsporidian species (107 genera) we analysed in the microsporidian phylogenetic tree (full length SSU sequences). After a comparison of the OTUs with the Freshwater-database by a similarity approach (VSEARCH tool), trees of OTUs with their closest reference sequences were built in FastTree (Price *et al.*, 2010) (see the detailed pipeline in Debroas *et al.*, 2017). Taxonomic assignment was conducted according to two methods: nearest neighbour (NN) and last common ancestor (LCA) affiliations. This process was implemented in the pipeline PANAM (Phylogenetic Analysis of Next-generation Amplicons; <https://github.com/panammeb/>) and is described in more detail in Taib *et al.*, 2013. Affiliations to groups and genera were considered as valid when identity scores were $\geq 85\%$ and $\geq 94.5\%$ respectively (empirical thresholds based on comparisons between affiliations and phylogenetic analyses, not shown).

Since the clustering threshold we used (99%) may generate OTUs resulting from sequencing errors, we only kept for the final analysis OTUs representing more than 0.05% of the total reads in at least one sample. Two samples were removed from the analysis since they contained less than 20,000 reads. Data were finally normalized using rarefaction with the phyloseq package on R (R Development Core Team, 2011; McMurdie and Holmes, 2013).

6. Diversity indices

Community richness and diversity indices (Richness observed, Chao1, Shannon and Simpson) were calculated using vegan package on R (R Development Core Team, 2011; Oksanen *et al.*, 2017). Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordinations, based on a Bray–Curtis dissimilarity matrix (Bray and Curtis, 1957; Paliy and Shankar, 2016), were performed to depict the difference in Microsporidia community compositions among the samples using the R vegan package (R Development Core Team, 2011; Oksanen *et al.*, 2017).

7. Phylogenetic analysis of OTUs

All OTUs obtained in this analysis were assigned at least to a clade, but 24% of them were not assigned to a group. We therefore performed phylogenetic analyses (for each clade) on OTUs not assigned to a group in order to determine whether new groups could be highlighted. Besides, only 48% of the OTUs were assigned to a genus. We checked the accuracy of affiliations to genera and highlighted potential new genera through phylogenetic analyses in each identified group. We focused our analyses on abundant OTUs (> 1% of reads in at least one sample, 95 OTUs), as they represent between 53% and 92% of the total reads in each sample. We included in these analyses several sequences from undescribed microsporidian species (found through BLAST search and/or bibliographic review), in addition to species from our database. After alignment using the MAFFT algorithm (Katoh *et al.*, 2005), ML trees were obtained using a GTR model of evolution with gamma-distributed rate heterogeneity (G) and a proportion of invariable sites (I) (GTR + G + I), with 200 bootstrap replications and partial deletion (85%), using MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Relative abundances were plotted on these trees using iTOL (Letunic and Bork, 2016).

IV. Results and discussion

1. OTU definition for Microsporidia

Metabarcoding analyses usually produce thousands of sequences, which are then clustered into OTUs to produce 'species equivalents' (Eren *et al.*, 2011; Alberdi *et al.*, 2018). For eukaryotic SSU sequences, a similarity threshold of 95% (Caron *et al.*, 2009; Debroas *et al.*, 2015) or alternatively 97% (Cleary and Durbin, 2016; Bista *et al.*, 2017) is usually employed. However, an incorrect clustering threshold could cause oversplitting or undersplitting of sequences into species equivalents, resulting in either inflated or underestimated species counts (Alberdi *et al.*, 2018). We therefore addressed this issue by applying different clustering thresholds on the full-length and V1–V3 sequences of the Microsporidia species we selected. Such analysis indicated that an important proportion of microsporidian species has highly similar SSU sequences (about 13% of species clustered together with a 99% clustering threshold) or even identical sequences (0.4% (full-length) and 2.7% (V1–V3) of species clustered together with a 100% clustering threshold) (Supporting Information 2). None of the clustering thresholds may in this way

generate OTUs that could be identified with high accuracy at the species level, thus highlighting the limits of this gene marker for species discrimination. Besides, thresholds for species delineation may vary according to the lineages, since some species belonging to the same genera have sometimes less than 90% identity (Zhang *et al.*, 2016), while some share more than of 99.5% identity in other genera (Tokarev *et al.*, 2020). For the later genera, combination of different molecular markers is then sometimes required to improve phylogenetic resolution (Bacela-Spychalska *et al.*, 2018; Tokarev *et al.*, 2020). As 100% of genera could nevertheless be distinguished using a 99% threshold on V1–V3 sequences, we chose to keep this threshold and only consider affiliations to genera as valid in further analyses.

2. Available databases are not reliable for microsporidian classification

OTUs assignment to phylogenetic clades requires the use of a reliable reference database, in which species are classified into several taxonomic ranks. As assignment lies on the comparison between OTUs and reference sequences, the efficiency of OTU classification depends on the degree to which taxonomic classification of reference sequences fits their evolutionary relationships. However, it is largely recognized that taxonomic designation of Microsporidia, based primarily on morphological characters, is inconsistent with phylogenetic analyses (Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005; Stentiford *et al.*, 2013b; Tokarev *et al.*, 2020). We thus primarily checked whether taxonomic information contained in various public databases was consistent with microsporidian phylogenetic data, focusing on the species for which the full length of the SSU gene was available (265 sequences). We found that taxonomic data found in GenBank (Federhen, 2012) are largely in disagreement with the phylogenetic clusters identified in the literature (Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005; Smith, 2009; Vossbrinck *et al.*, 2014; Corsaro *et al.*, 2019; Supporting Information 1). In SILVA (Quast *et al.*, 2013), many of these microsporidian species are lacking (12%, Supporting Information 1) or when present, often assigned incorrectly to phyla which are not Microsporidia (21%, Supporting Information 1). Besides, SILVA, as well as PR² (a database dedicated to protists; Guillou *et al.*, 2013), do not include any taxonomic rank between phyla and genera (see Supporting Information 1). PHYMYCO-DB (Mahé *et al.*, 2012), a database dedicated to Fungi, does not contain microsporidian sequences. The existing databases being inappropriate, another one based on the phylogeny rather than on morphological characters, was thus required.

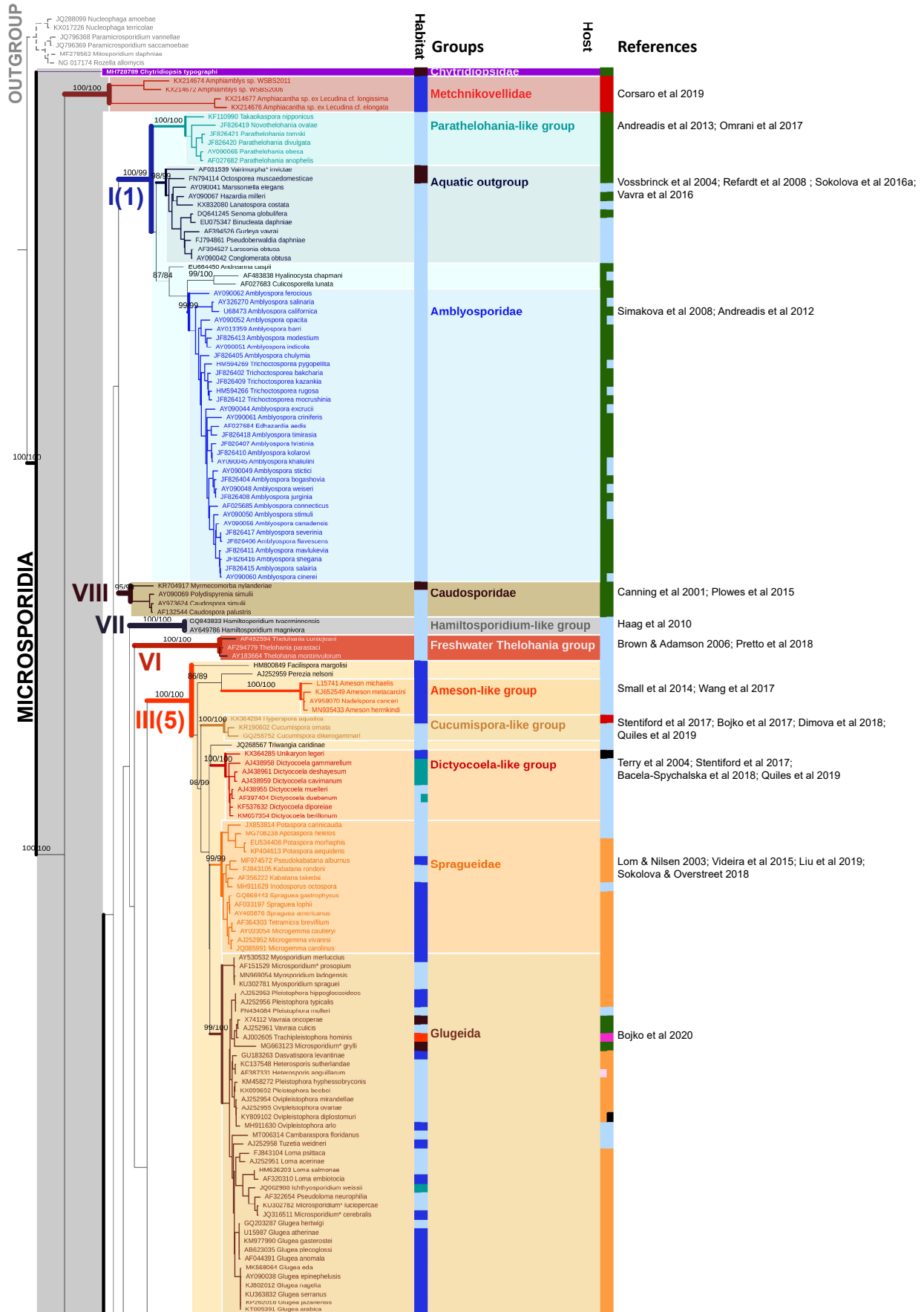
Although the microsporidian taxonomy should probably be revised (as discussed in Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005 and Stentiford *et al.*, 2013b), our objective was simply here to provide a practical classification of microsporidian species which could be used to analyse metabarcoding data.

3. Extensive phylogeny of Microsporidia

We built a phylogenetic tree which is twice more exhaustive than the previously published reference trees (Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005; Vossbrinck *et al.*, 2014). NJ and ML phylogenetic trees obtained on the full-length sequences placed canonical Microsporidia in a monophyletic group, with Metchnikovellids and Chytridiopsidae at the basal position of the microsporidian phylogenetic tree (**Fig. 22**). A total of 10 clades were identified (nine for canonical Microsporidia numbered with Latin names, and one for Metchnikovellidae), all being supported by high bootstrap values (> 85%).

Former reference trees identified five major clades in canonical Microsporidia (Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005; Vossbrinck *et al.*, 2014). It should however be noted that clade numbering between these two reference publications differs, as 'clade 5' in Vossbrinck *et al.*, 2014 corresponds to 'clade III' in Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005, and vice-versa. As a result, clade numbering for Microsporidia is currently confusing, since some publications follow the former and others the later (including in recent publications, see Zhang *et al.*, 2016 or Quiles *et al.*, 2019 for example). We chose here to keep the oldest clade numbering, as in proportion more publications refer to it.

Among the 10 clades we highlighted, four of them (clades I, III, IV and V) were largely in agreement with the ones formerly described (Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005; Smith, 2009; Vossbrinck *et al.*, 2014; Corsaro *et al.*, 2019, see comparison in Supporting Information 4). The biggest clade (clade IV, thus considered as a 'super-clade', 86 species) was here subdivided into two clades (IV1 and IV2). Such division was supported by high bootstrap values, a clear genetic divergence, and literature data (Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005; Vossbrinck *et al.*, 2014; Trzebny *et al.*, 2020). However, we found only a weak overlap for the clade II, which species composition already differed markedly between the former reference phylogenies (Supporting Information 4). As we included several new species in the current phylogenies, it appears that former clade II could be split into three different clades



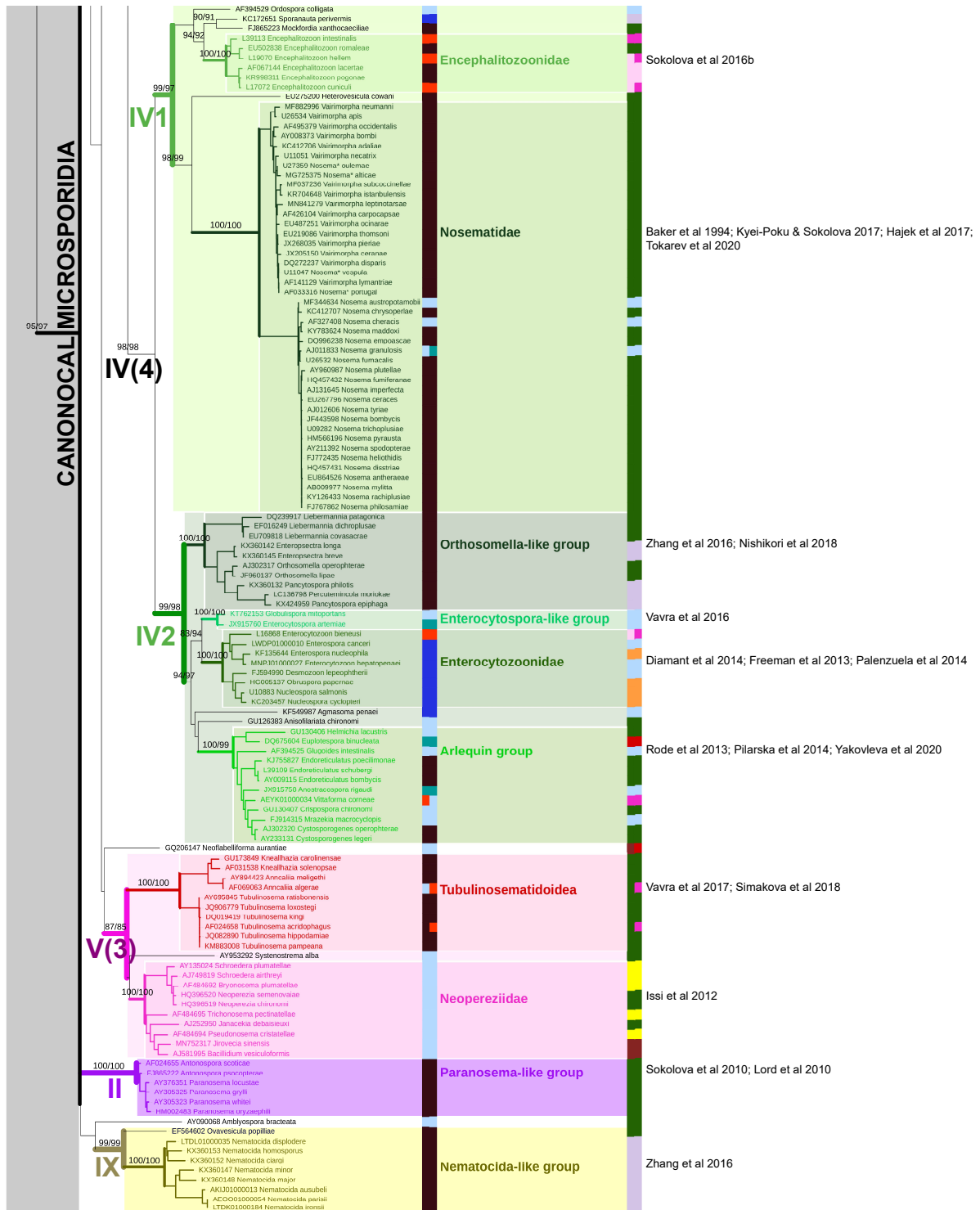


Figure 22: Microsporidian phylogenetic tree based on full length SSU rDNA of 265 microsporidian species and six outgroup taxa (1127 positions).

Values above branches indicate the ML and Neighbour Joining bootstrap supports (the same topology has been obtained, at least at the clade and group levels). Bootstraps below the group level are not shown to lighten the figure. Nine clades (highlighted with background colours, and Latin numbers I to IX) are identified for canonical Microsporidia and one for unusual Microsporidia (Metchnikovellidae). Correspondence between different clade numbering systems is provided for the four major clades recovered in all phylogenetic analyses (Latin numbers: this study and Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005; Arabic numbers: Vossbrinck *et al.*, 2014). Within these clades, 1 to 5 groups are identified (highlighted with branches and species names colours), for a total of 22 groups. References to other studies that support these groups are provided, and listed in Bibliography for Supporting Information. Colour strips indicate hosts (different colours can be given for a single species when different hosts are known) and habitat (different colours can be given for a single species when different habitats are known). Tree annotated using the interactive Tree of Life (iTOL) server (Letunic and Bork, 2016). The alignment used to build the phylogenetic tree is provided in Supporting Information 3.

(here II, VIII and IX). Eventually, we introduce two distinct novel clades (VI and VII), containing species which were either unclassified (Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005; Smith, 2009) or included in clade 5 (Vossbrinck *et al.*, 2014) probably due to long branch attraction.

Within these clades, we furthermore identified 22 'groups' of species, also supported by high bootstrap values ($\geq 95\%$) and previous phylogenetic studies (**Fig. 22**). We named these groups according to the names given in these studies when available, or according to a representative genus (*i.e.*, *genera name* – like group) for the others. Again, a strong discrepancy between these phylogenetic data and taxonomy provided in NCBI was found (Supporting Information 5). However, our data were mostly in agreement with the microsporidian taxonomy, since most of the phylogenetic 'groups' we identified corresponded to families reviewed in Wijayawardene *et al.*, 2018 (Supporting Information 6). Other groups included species classified in various families [such as the 'Aquatic group' (Vossbrinck *et al.*, 2004), which contains representatives of the Caudosporidae, Gurleyidae and Agglomeratidae families (Wijayawardene *et al.*, 2018)], or species not assigned yet to any family (such as representatives of the Orthosomella-like or Nematocida-like groups). All these groups were recovered in the phylogeny based on the V1–V3 region, highlighting the relevance of this region (Supporting Information 7).

Some trends in terms of habitats and to a lesser extent of hosts are characterizing these clades or groups (**Fig. 22**). Clades I, VI, VII, VIII, as well as Neopereziidae (clade V) mostly contain species infecting freshwater hosts, such as Crustacea, aquatic Diptera or Bryozoa, while clades II, IV1, IX and Tubulinosematidoidea (clade V) contain mostly species infecting terrestrial hosts. Clade III contains aquatic (freshwater and marine) species. One group within clade IV2 however, contains microsporidian species infecting very different hosts (ciliates, insects, crustacean, human) found in diverse habitats (terrestrial, freshwater, brackish). We named this group 'Arlequin group' to reflect this variability. Clades and groups highlighted by this phylogenetic analysis and literature review were thereafter used to classify OTUs in our metabarcoding analysis. Sequences included in the phylogeny, as well as other full-length SSU sequences of the same species (total of 528 sequences), were included in a database used to study eukaryotic communities in freshwater environments (Debroas *et al.*, 2017).

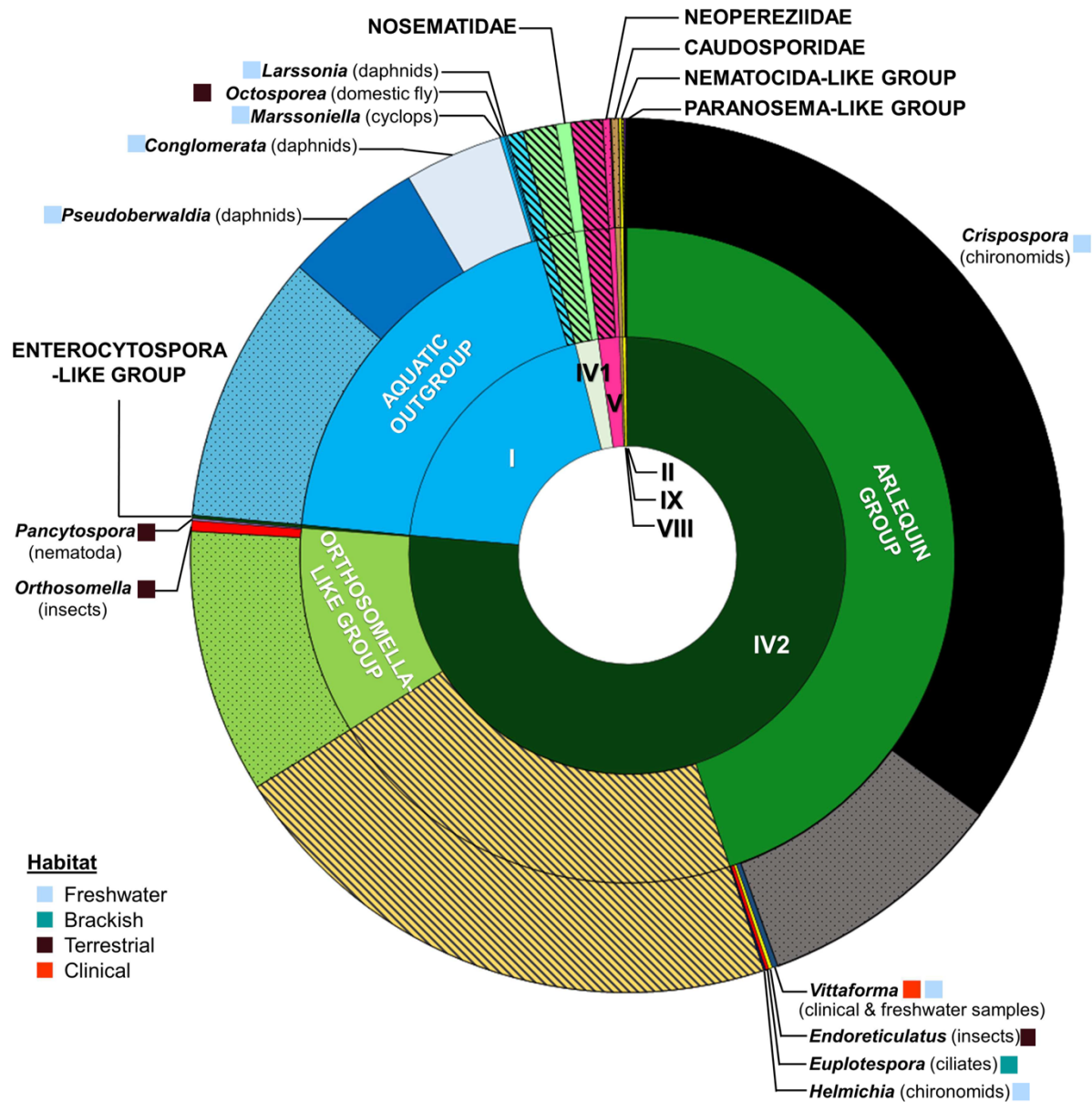


Figure 23: Krona chart representing the affiliation of the 1531 OTUs found in the analysis.

Inner circles represent clades, and deeper taxonomic ranks (groups and genera) are presented in outer circles. Group names are given in capital letters, and genera names in *italic*. For identified genera, habitats are shown with coloured squares and host species are given in brackets. Seven clades are represented, although most OTUs fall in clades I and IV2. A large proportion of OTUs are unidentified at the group (stripe patterns) or genus (dot patterns) level. Among OTUs identified at the genera level, most are assigned to genera known to parasitize freshwater hosts.

4. Application of the proposed methodology to study the lacustrine microsporidian diversity

So far, only two studies attempted to characterize the diversity of Microsporidia in environmental samples, focusing mostly on terrestrial and marine habitats (Ardila-Garcia *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2018). Both studies highlighted new diversity across all areas of the microsporidian tree. However, due to the low number of sequences obtained in these studies (25 and 745 respectively, with a maximum of 20 OTUs per sample), comparisons of microsporidian communities between habitats were either not done or could only uncover a general variability between samples. In this study, we use our expertise database combined with the use of specific primers to characterize the diversity of Microsporidia in two lake ecosystems (planktonic samples) as well as its spatio-temporal variations through metabarcoding.

Diversity

After quality filtering and clustering at 99%, 1,135,287 reads were obtained, and 91% of them were assigned to Microsporidia. After removal of the two samples which contained < 20,000 reads (Pavin, April, fraction 50–150 µm and Pavin, June, fraction 10–50 µm) and normalization, 323,904 reads were assigned to the microsporidian classification we defined above. This analysis revealed a considerable diversity, since 1531 OTUs were obtained in total. However, the Microsporidia community was dominated by few highly abundant OTUs, since 95 'abundant' OTUs (> 1% in at least one sample) covered more than 75% of the total reads. These results highlight, together with those of Ardila-Garcia *et al.*, 2013 and Williams *et al.*, 2018, the necessity to sample more environments in order to reveal the extent of the environmental microsporidian diversity.

All OTUs obtained in this study belonged to the canonical Microsporidia, and were distributed within seven clades (over the 10 clades identified for Microsporidia). The microsporidian community was clearly dominated by clades IV2 and I, which represent respectively 76% and 20% of the OTUs (**Fig. 23**). The remaining OTUs were classified into clades IV1 (< 2%), V (< 1.5%), II (< 0.2%), VIII (< 0.2%) and IX (< 0.2%).

Nine groups (over the 21 belonging to the canonical Microsporidia) were represented. Three of them accounted for more than 74% of the OTUs: Aquatic outgroup (clade I, 19%), Arlequin

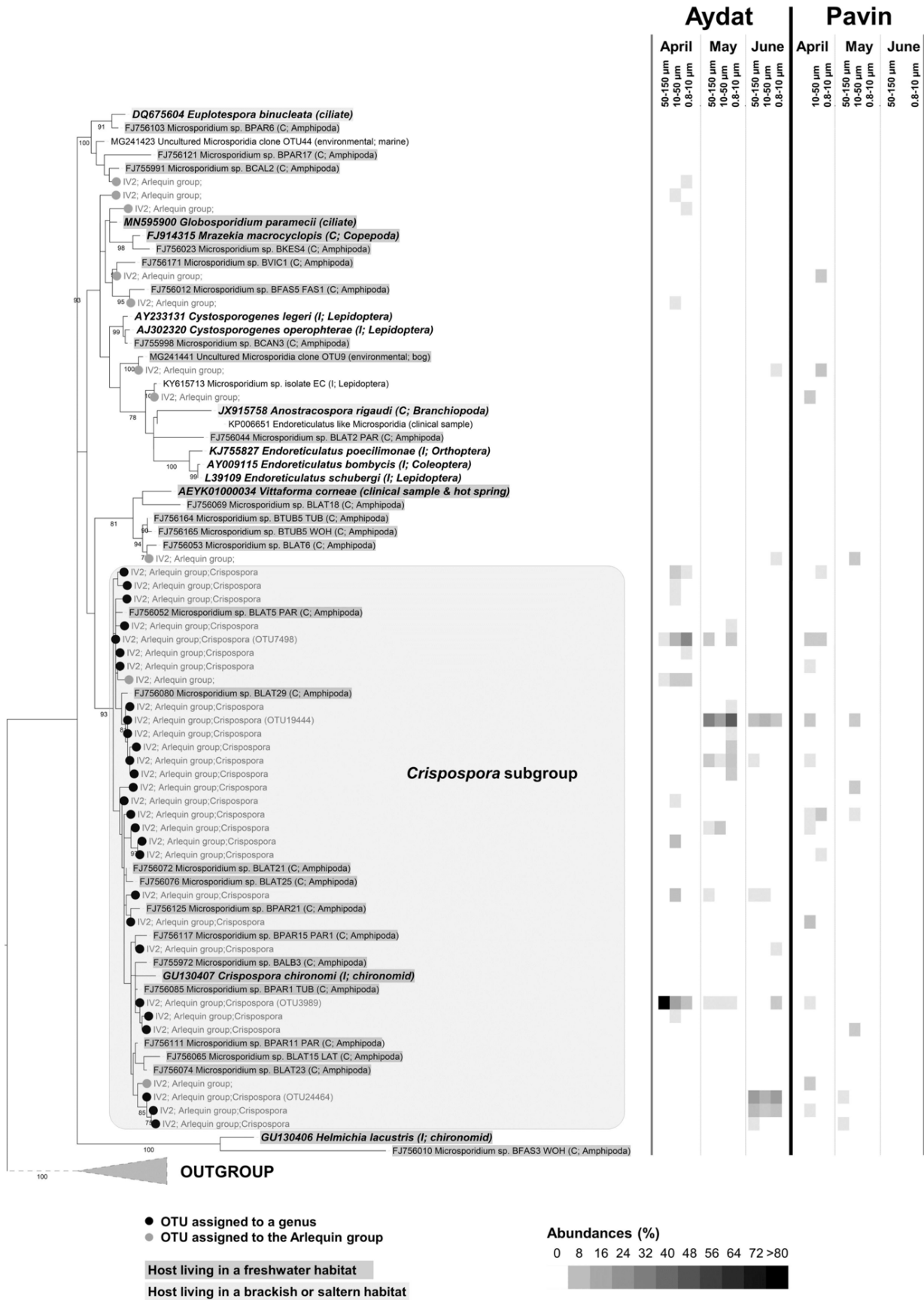


Figure 24: Maximum Likelihood phylogeny of abundant OTUs (> 1% of reads in at least one sample) affiliated to the Arlequin group (clade IV2) with other sequences belonging to this group. Numbers next to branches indicate the ML bootstrap support (200 replicates). Node supports < 70 are not shown. Outgroup species are representative species of other groups belonging to clade IV2 (details in Supporting Information 15). Affiliation of each OTU following the bioinformatics analysis is given in grey text. Described species are given in bold-italic, and sequences from undescribed species in normal text. Hosts are given in brackets. C: Crustacea; I: Insecta. Relative abundances of each OTU across samples are reported with a heatmap.

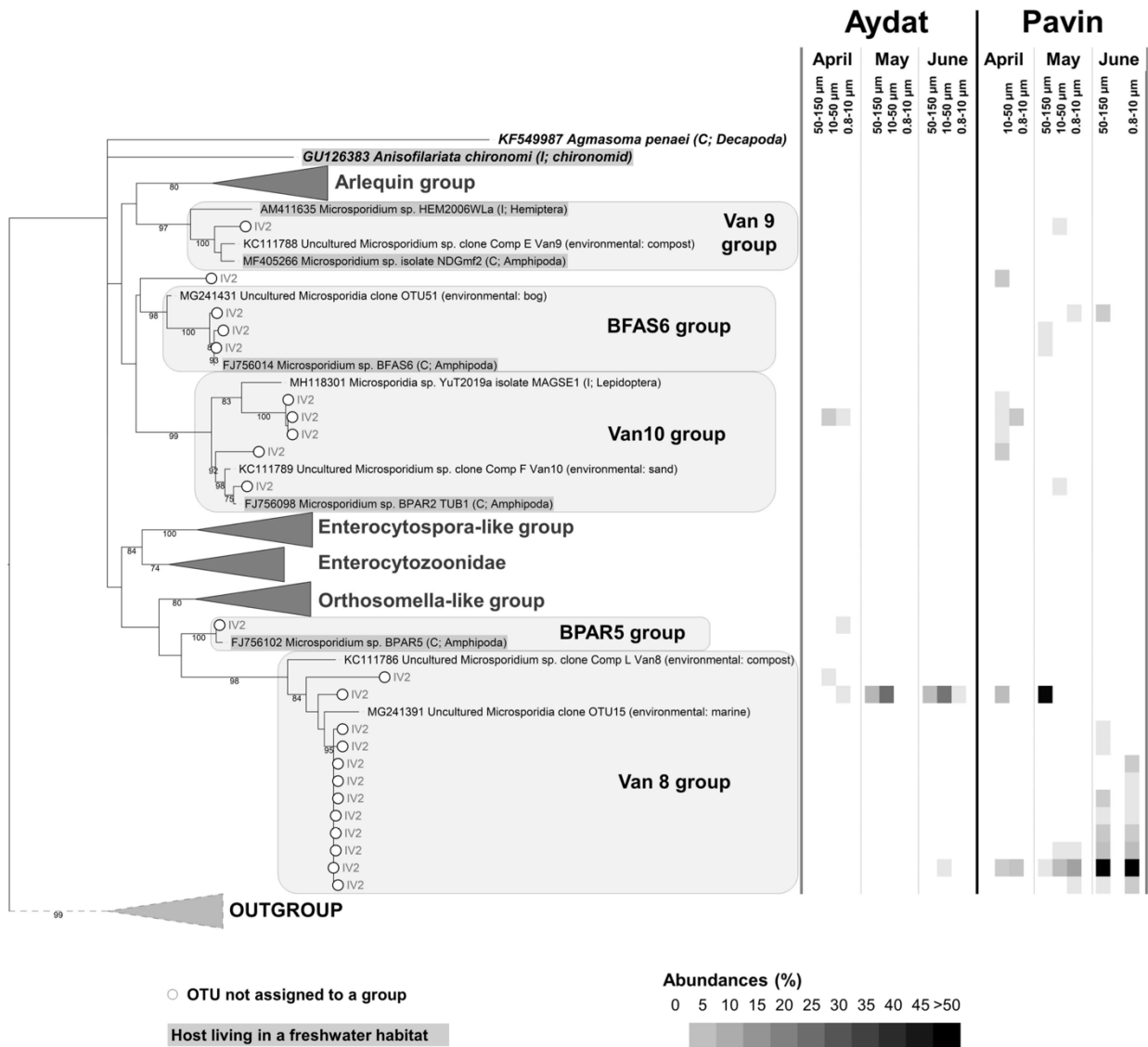


Figure 25: Maximum Likelihood phylogeny of abundant OTUs (> 1% of reads in at least one sample) not assigned to any group, within clade IV2, with other sequences belonging to this clade. Numbers next to branches indicate the ML bootstrap support (200 replicates). Node supports < 70 are not shown. Outgroup species are representative species of clade IV1 (details in Supporting Information 15). Affiliation of each OTU following the bioinformatics analysis is given in grey text. Described species are given in bold-italic, and sequences from undescribed species in normal text. Hosts are given in brackets. C: Crustacea; I: Insecta. Relative abundances of each OTU across samples are reported with a heatmap.

and *Orthosomella*-like groups (clade IV2, 45% and 10% respectively; **Fig. 23**). 47% of OTUs were assigned to a genus, of which *Crispospora*, *Pseudoberwaldia* and *Conglomerata* were the most represented (35%, 5% and 4% respectively). Phylogenetic analyses confirmed these affiliations (**Fig. 24** and Supporting Information 8), which supports the accuracy of the developed methodology. As expected, most of these genera are known to infect hosts having at least one aquatic stage across their full development (crustaceans: daphnids or cyclops, insects: chironomids, **Fig. 23**).

Besides the identified genera, many OTUs were not assigned to a genus (53%) nor sometimes even to a group (23%). OTUs not assigned to any genus within the Arlequin group (**Fig. 24**), Aquatic outgroup (Supporting Information 8) and *Orthosomella*-like group (Supporting Information 9) were often related to undescribed Microsporidia found in freshwater hosts, such as amphipods, cladocerans, copepods (crustacean), caddisflies, mayflies and mosquitoes (insects). OTUs not assigned to any group mostly belonged to clade IV2 (21%), and few to clades IV1 and V (1% each) (**Fig. 23**). Phylogenetic analysis of these OTUs confirmed that they do not belong to any of the groups we formerly identified (clade IV2: **Fig. 25**; clades IV1 and V: Supporting Information 10 and 11). Their closest relatives were often Microsporidia amplified from environmental samples (Ardila-Garcia *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2018) or from amphipods sampled in the lake Baikal (Ironside and Wilkinson, 2018). In clade IV2, they notably form five new groups (Van9, BFAS6, Van10, BPAR5 and Van8 groups, **Fig. 25**), each having less than 85% similarity with groups identified in this clade through phylogenetic analysis of known species (Supporting Information 12). These results suggest that for freshwater habitats, a large proportion of genera and/or families remains to be described. As our analysis focused on small sized fractions (< 150 µm), this novel diversity may correspond at least partly to not yet described microsporidian species infecting small hosts. Some studies report infections of ciliates and rotifers by Microsporidia in freshwater environments (Fokin *et al.*, 2008; Wolska and Mazurkiewicz-Zapalowicz, 2013; Stentiford *et al.*, 2013a; Yakovleva *et al.*, 2020), but only two sequences from ciliates, and none from rotifers are currently available in the databases. Further sampling efforts aiming to identify host-microsporidian interactions in these small size organisms will be necessary in order to confirm this hypothesis.

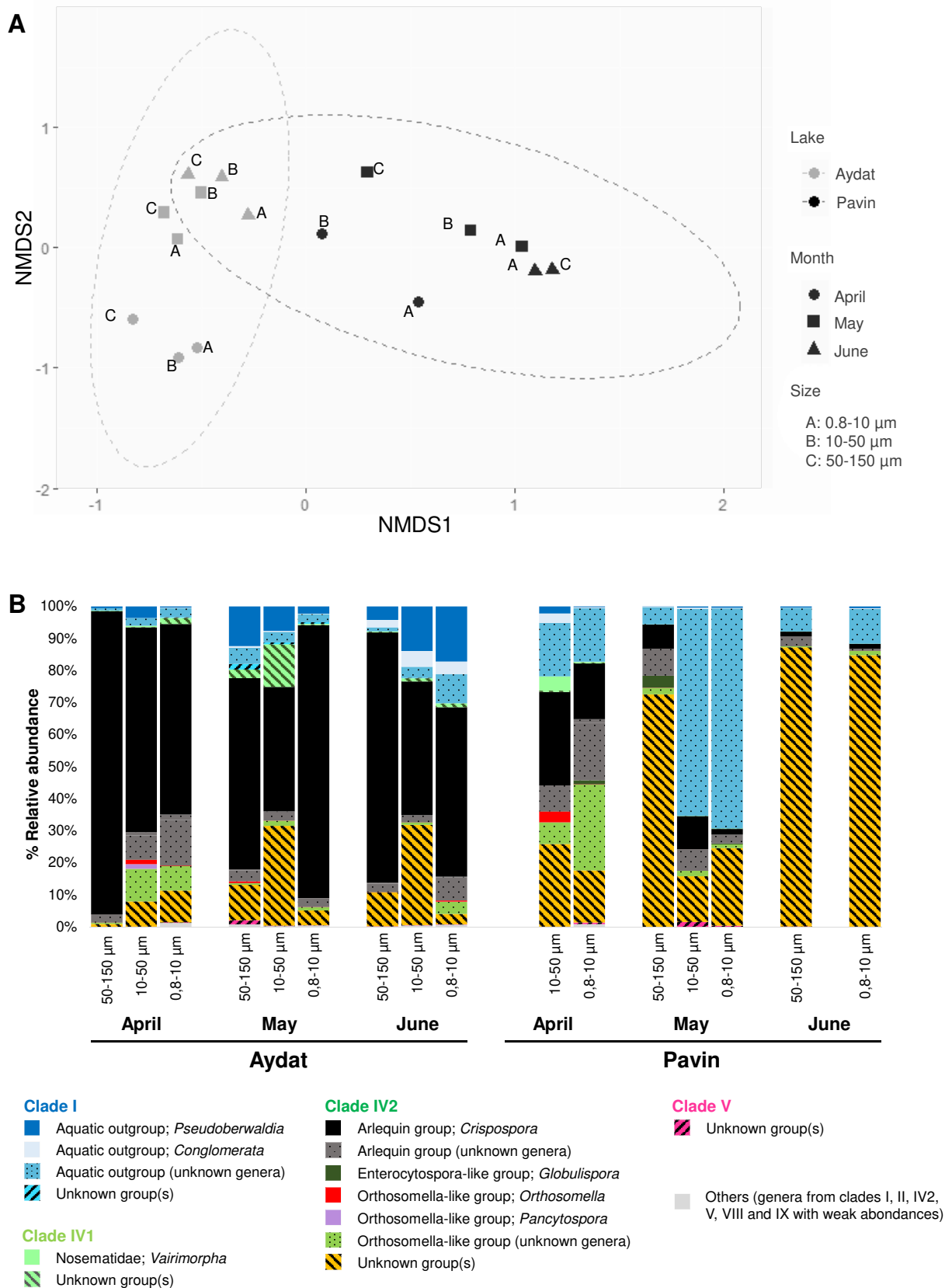


Figure 26: A. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination of the microsporidian OTU relative abundances across samples based on Bray–Curtis distances (stress: 0.09). B. Relative abundance of identified microsporidian taxa across samples.

Ellipses in the plots denote 95% confidence intervals, points that are not overlapped by the two ellipses are considered significantly different.

Spatio-temporal variations

α -Diversity of microsporidian community varied among the different samples (Supporting Information 13). When focusing on community richness (Richness observed, Chao1 index, number of OTUs), the two lakes seem to present an opposite pattern, as richness increased from April to June in lake Aydat while it decreased in Lake Pavin. Similar patterns were observed for Shannon and Simpson indexes (Supporting Information 13B).

While no trend for the different size fractions was detected, variations in the relative abundances of some taxa were observed between sampling sites, and to a lesser extent across time (in lake Aydat notably), as suggested by the non-metric multidimensional scaling (**Fig. 26A**). For example, while OTUs identified as *Crispospora* (IV2-Arlequin group), *Conglomerata* and *Pseudoberwaldia* (I-Aquatic outgroup) sp. are very abundant in lake Aydat (up to 91%, 17% and 5% respectively, shown in black, light-blue and deep blue in **Fig. 26B**), their relative abundances were in comparison low in lake Pavin (maximum 11%, 0.2% and 0.3% respectively, except in one sample where they reached 19%, 2% and 3%). OTUs belonging to clade IV1 from unknown group(s) had similar pattern, reaching up to 13% in Aydat, and being nearly absent in Pavin (< 0.4%) (striped green on **Fig. 26B**). These trends were also observed at the OTU level, some being clearly more abundant in one lake than in the other (**Fig. 24** and Supporting Information 8 and 10). At the opposite, lake Pavin was clearly dominated by Microsporidia belonging to unknown group(s) in the clade IV2 or to unknown genera in the Aquatic outgroup (clade I) (striped orange and dotted blue respectively on **Fig. 26B**). Phylogenetic analysis of these unassigned OTUs within clade IV2 revealed that they belong to 3 de novo groups (Van 9, BFAS6 and Van8) (**Fig. 25**). In particular, a cluster of closely related OTUs in group Van8 was far more abundant in lake Pavin (some OTU reaching up to 54% of the total reads) than in lake Aydat (< 1.3%; **Fig. 25**). Similarly, phylogenetic analysis of abundant OTUs belonging to the Aquatic outgroup revealed that several OTUs clustering with *Octosporea muscadomesticae* and unknown Microsporidia found in freshwater hosts were far more abundant in lake Pavin (up to 21%) than in lake Aydat (< 0.5%; Supporting Information 8).

Relative abundances of some taxa can also significantly vary across the sampling period (**Fig. 26B**). For example, abundances of *Pseudoberwaldia* sp. (Aquatic outgroup, clade I) increased over time in lake Aydat (deep blue in **Fig. 26B**, Supporting Information 8), as did Microsporidia in the Van8 group (clade IV2) in lake Pavin, which clearly dominates in June (> 84% of the

reads) (**Fig. 25**). Besides, Microsporidia belonging to the *Orthosomella* group were much more abundant in April compared to May and June (dotted green in **Fig. 26B**, Supporting Information 9). Although these general trends can be observed at the group or genus level, striking differences can also be observed at the OTU level: in OTUs assigned to the genus *Crispospora* for example, OTU3989 and OTU7498 were more abundant in April (up to 85% and 29%), while OTU19444 was more abundant in May (up to 45%), and OTU24464 in June (up to 21%), suggesting these OTUs might belong to different species (**Fig. 24** and Supporting Information 14A). As genetic distances between these OTUs can be lower than 2% (Supporting Information 14B), such data support the relevance of a clustering threshold fixed at 99%.

These spatio-temporal variations might be related to the abundance of the hosts present in these lakes at the time of sampling, as Microsporidia have generally a narrow host specificity. Indeed, these two lakes differ in their zooplankton species compositions (Lair, 1978; Devaux, 1980; Lair, 1990; Quiblier-Lloberas *et al.*, 1996), which could themselves be influenced by differences in the nutrients content, altitude and mixing type recorded in these two lakes (Lepère *et al.*, 2010). Considerable temporal variations in the abundances of these species have also been recorded, which could in part explain the temporal variations observed in some Microsporidia lineages. For example, increases of the cladoceran population are repeatedly recorded in lake Aydat in spring, which could explain the increase of Agglomeratidae (*Pseudoberwaldia* and *Conglomerata* species) across our sampling period (Lair, 1990). Monitoring the presence and abundances of both the microsporidian and other eukaryotic species across a significant period of time could help, for example through co-occurrence network analyses, to highlight potential new host-microsporidian interactions. This could be of particular interest for the Van8 group, which clearly dominates in lake Pavin, and which hosts are totally unknown. This group, as well as the other dominant lineages (*Crispospora* sp. and Agglomeratidae species) might play a significant role in the regulation of hosts populations, that further work may help to determine.

V. Conclusion

In this work, we propose a methodology which aims at studying the microsporidian diversity through metabarcoding. We notably provide a robust database, based on an extensive phylogenetic and bibliographic analysis, which classify microsporidian species in a coherent framework. Using this database, we explored the microsporidian diversity in lacustrine samples

through a metabarcoding approach, and highlighted a substantial amount of Microsporidia phylogenetically distant from any described microsporidian species, which might represent undescribed genera and families. Further studies, including larger datasets (in terms of geography and/or ecology) will help to reveal the extent of Microsporidia diversity, which is obviously far from being fully uncovered. Besides, further analyses will be necessary to determine which hosts these Microsporidia are able to infect, a necessary step to understand the role of these parasites in the ecosystem functioning.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Laetitia Juillard for her priceless tenacity to devise the right PCR conditions during her Master traineeship, and for her help with sampling and DNA extractions. We also gratefully acknowledge constructive comments by two anonymous referees. Authors acknowledge the financial support from the 'Fédération des Recherches en Environnement' through the CPER 'Environnement' founded by the Region Auvergne, the French government and the FEDER (European Community).

References

- Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M.T.P., and Bohmann, K. (2018) Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods Ecol Evol* 9: 134–147.
- Ardila-Garcia, A., Raghuram, N., Sihota, P., and Fast, N. (2013) Microsporidian diversity in soil, sand and compost of the pacific northwest. *J Eukaryot Microbiol* 60: 601–608.
- Bacela-Spychalska, K., Wroblewski, P., Mamos, T., Grabowski, M., Rigaud, T., Wattier, R., et al. (2018) Europe-wide reassessment of Dictyocoela (Microsporidia) infecting native and invasive amphipods (Crustacea): molecular versus ultrastructural traits. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26879-3>.
- Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V., and Undeen, A.H. (1994) Phylogenetic relationships among Vairimorpha and Nosema species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J Invertebr Pathol* 64: 100–106.
- Bass, D., Stentiford, G.D., Littlewood, D.T.J., and Hartikainen, H. (2015) Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology. *Trends Parasitol* 31: 499–513.
- Bista, I., Carvalho, G.R., Walsh, K., Seymour, M., Hajibabaei, M., Lallias, D., et al. (2017) Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nat Commun* 8: 14087.
- Bray, J.R., and Curtis, J.T. (1957) An ordination of upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 27: 325–349.
- Caron, D.A., Countway, P.D., Savai, P., Gast, R.J., Schnetzer, A., Moorthi, S.D., et al. (2009) Defining DNA-based operational taxonomic units for microbial-eukaryote ecology. *Appl Environ Microbiol* 75: 5797–5808.
- Cleary, A.C., and Durbin, E.G. (2016) Unexpected prevalence of parasite 18S rDNA sequences in winter among Antarctic marine protists. *J Plankton Res* 38: 401–417.
- Corsaro, D., Wylezich, C., Venditti, D., Michel, R., Walochnik, J., and Wegensteiner, R. (2019) Filling gaps in the microsporidian tree: rDNA phylogeny of Chytridiopsis typographi (Microsporidia: Chytridiopsida). *Parasitol Res* 118: 169–180.

- Costello, M.J. (2016) Parasite rates of discovery, global species richness and host specificity. *Integr Comp Biol* 56: 588–599.
- Debroas, D., Domaizon, I., Humbert, J.F., Jardillier, L., Lepere, C., Oudart, A., and Taib, N. (2017) Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data. *FEMS Microbiol Ecol* 93. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix023>
- Debroas, D., Hugoni, M., and Domaizon, I. (2015) Evidence for an active rare biosphere within freshwater protists community. *Mol Ecol* 24: 1236–1247.
- Devaux, J. (1980) Contribution à l'étude limnologique du lac Pavin (France). II. Relations entre paramètres abiotiques – Phyto et zooplancton dans la zone 0-20 mètres. *Hydrobiologia* 68: 17–34.
- Dobson, A., Lafferty, K.D., Kuris, A.M., Hechinger, R.F., and Jetz, W. (2008) Colloquium paper: homage to Linnaeus: how many parasites? How many hosts? *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11482–11489.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200.
- Eren, A.M., Ferris, M.J., and Taylor, C.M. (2011) A framework for analysis of metagenomic sequencing data. *Pac Symp Biocomput*: 131–141. https://doi.org/10.1142/9789814335058_0015
- Federhen, S. (2012) The NCBI taxonomy database. *Nucleic Acids Res* 40: D136–D143.
- Fokin, S.I., Di Giuseppe, G., Erra, F., and Dini, F. (2008) *Euplotespora binucleata* n. gen., n. sp. (Protozoa: Microsporidia), a parasite infecting the hypotrichous ciliate *Euplotes woodruffi*, with observations on microsporidian infections in ciliophora. *J Eukaryot Microbiol* 55: 214–228.
- Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., et al. (2013) The Protist ribosomal reference database (PR²): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Res* 41: D597–D604.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E.M., and Troedsson, C. (2014) Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE* 9: e87624.
- Hugerth, L.W., Muller, E.E.L., Hu, Y.O.O., Lebrun, L.A.M., Roume, H., Lundin, D., et al. (2014) Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS ONE* 9: e95567.
- Ironside, J.E., and Wilkinson, T.J. (2018) Accumulation and exchange of parasites during adaptive radiation in an ancient lake. *Int J Parasitol* 48: 297–307.
- Katoh, K., Kuma, K.-I., Toh, H., and Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33: 511–518.
- Keeling, P.J., and Fast, N. (2002) MICROSPORIDIA: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56: 93–116.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870–1874.
- Lafferty, K.D., Allesina, S., Arim, M., Briggs, C.J., De Leo, G., Dobson, A.P., et al. (2008) Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecol Lett* 11: 533–546.
- Lafferty, K.D., Dobson, A.P., and Kuris, A.M. (2006) Parasites dominate food web links. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11211–11216.
- Lair, N. (1978) Répartition spatio-temporelle, biomasse et production des populations zooplanctoniques du lac d'Aydat en période estivale. *Hydrobiologia* 61: 237–256.
- Lair, N. (1990) Effects of invertebrate predation on the seasonal succession of a zooplankton community: a two year study in Lake Aydat, France. *Hydrobiologia* 198: 1–12.
- Larsen, B.B., Miller, E.C., Rhodes, M.K., and Wiens, J.J. (2017) Inordinate fondness multiplied and redistributed: the number of species on earth and the new pie of life. *Q Rev Biol* 92: 229–265.

Lepère, C., Domaizon, I., and Debroas, D. (2016) Diversity and biogeography of picoeukaryotes: new insights into the rare biosphere. In Lake Pavin, Sime-Ngando, T., Boivin, P., Chapron, E., Jezequel, D., and Meybeck, M. (eds). Cham: Springer.

Lepère, C., Masquelier, S., Mangot, J.F., Debroas, D., and Domaizon, I. (2010) Vertical structure of small eukaryotes in three lakes that differ by their trophic status: a quantitative approach. *ISME J* 4: 1509–1519.

Letunic, I., and Bork, P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 44: W242–W245.

Mahé, F., de Vargas, C., Bass, D., Czech, L., Stamatakis, A., Lara, E., et al. (2017) Parasites dominate hyperdiverse soil protist communities in Neotropical rainforests. *Nat Ecol Evol* 1: 91.

Mahé, S., Duhamel, M., Calvez, T.L., Guillot, L., Sarbu, L., Bretaudeau, A., et al. (2012) PHYMYCO-DB: a curated database for analyses of fungal diversity and evolution. *PLoS ONE* 7: e43117.

Marande, W., Lopez-Garcia, P., and Moreira, D. (2009) Eukaryotic diversity and phylogeny using small- and large-subunit ribosomal RNA genes from environmental samples. *Environ Microbiol* 11: 3179–3188.

McMurdie, P.J., and Holmes, S. (2013) Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8: e61217.

Mikhailov, K.V., Simdyanov, T.G., and Aleoshin, V.V. (2016) Genomic survey of a hyperparasitic microsporidian *Amphiamblys* sp. (Metchnikovellidae). *Genome Biol Evol* 9: 454–467.

Oksanen, F.J., Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., et al. (2017) *Vegan: Community Ecology Package*. R package Version 2.4-3. URL <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

Paliy, O., and Shankar, V. (2016) Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Mol Ecol* 25: 1032–1057.

Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P. (2010) FastTree 2 – approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5: e9490.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35: 7188–7196.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: D590–D596.

Quiblier-Lloberas, C., Bourdier, G., Amblard, C., and Pepin, D. (1996) Impact of grazing on phytoplankton in Lake Pavin (France): contribution of different zooplankton groups. *J Plankton Res* 18: 305–322.

Quiles, A., Bacela-Spychalska, K., Teixeira, M., Lambin, N., Grabowski, M., Rigaud, T., and Wattier, R.A. (2019) Microsporidian infections in the species complex *Gammarus roeselii* (Amphipoda) over its geographical range: evidence for both host-parasite co-diversification and recent host shifts. *Parasit Vectors* 12: 327.

R Development Core Team. (2011) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537–7541.

Smith, J.E. (2009) The ecology and evolution of microsporidian parasites. *Parasitology* 136: 1901–1914.

Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Feist, S.W., Chambers, E., and Stone, D.M. (2013b) Plastic parasites: extreme dimorphism creates a taxonomic conundrum in the phylum microsporidia. *Int J Parasitol* 43: 339–352.

Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A., et al. (2016) Microsporidia – emergent pathogens in the global food chain. *Trends Parasitol* 32: 336–348.

Stentiford, G.D., Feist, S.W., Stone, D.M., Bateman, K.S., and Dunn, A.M. (2013a) Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. *Trends Parasitol* 29: 567–578.

Taib, N., Mangot, J.F., Domaizon, I., Bronner, G., and Debroas, D. (2013) Phylogenetic affiliation of SSU rRNA genes generated by massively parallel sequencing: new insights into the freshwater protist diversity. *PLoS One* 8: e58950.

Tokarev, Y.S., Huang, W.-F., Solter, L.F., Malysh, J.M., Becnel, J.J., and Vossbrinck, C.R. (2020) A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *J Invertebr Pathol* 169: 107279.

Trzebny, A., Slodkiewicz-Kowalska, A., Becnel, J.J., Sanscrainte, N., and Dabert, M. (2020) A new method of metabarcoding microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). *Mol Ecol Resour* 00: 1–19.

Vavra, J., and Lukes, J. (2013) Microsporidia and ‘the art of living together’. *Adv Parasitol* 82: 253–319.

Vossbrinck, C.R., Andreadis, T.G., Vavra, J., and Becnel, J. J. (2004) Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic Microsporidia (Microsporidia: Amblyosporidae). *J Eukaryot Microbiol* 51: 88–95.

Vossbrinck, C.R., and Debrunner-Vossbrinck, B.A. (2005) Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol* 52: 131–142.

Vossbrinck, C.R., Debrunner-Vossbrinck, B.A., and Weiss, L.M. (2014) Phylogeny of the microsporidia. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, 1st ed, Weiss, L.M., and Becnel, J.J. (eds). Oxford: Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118395264>.

Wadi, L., and Reinke, A.W. (2020) Evolution of microsporidia: an extremely successful group of eukaryotic intracellular parasites. *PLoS Pathog* 16: e1008276.

Weigl, S., Korner, H., Petrussek, A., Seda, J., and Wolinska, J. (2012) Natural distribution and co-infection patterns of microsporidia parasites in the *Daphnia longispina* complex. *Parasitology* 139: 870–880.

Weiss, L.M., and Becnel, J.J. (2014) *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*: Oxford: Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118395264>.

Weiss, L.M., Zhu, X., Cali, A., Tanowitz, H.B., and Wittner, M. (1994) Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitol* 41: 81–90.

Wijayawardene, N.N., Pawłowska, J., Letcher, P.M., Kirk, P.M., Humber, R.A., Schüßler, A., et al. (2018) Notes for genera: basal clades of fungi (including Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota and Zoopagomycota). *Fungal Divers* 92: 43–129.

Williams, B.A.P., Hamilton, K.M., Jones, M.D., and Bass, D. (2018) Group-specific environmental sequencing reveals high levels of ecological heterogeneity across the microsporidian radiation. *Environ Microbiol Rep* 10: 328–336.

Wolska, M., and Mazurkiewicz-Zapalowicz, K. (2013) Parasites of zooplankton and periphyton assemblages in the littoral zone of lakes in Drawa National Park, Poland. *Acta Mycol* 48: 51–59.

Yakovleva, Y., Nassonova, E., Lebedeva, N., Lanzoni, O., Petroni, G., Potekhin, A., and Sabaneyeva, E. (2020) The first case of microsporidiosis in *Paramecium*. *Parasitology* 147: 957–971.

Zhang, G., Sachse, M., Prevost, M.-C., Luallen, R.J., Troemel, E.R., and Félix, M.-A. (2016) A large collection of novel nematode-infecting microsporidia and their diverse interactions with *Caenorhabditis elegans* and other related nematodes. *Plos Pathogens*, 13: e1006204. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006204>.

Supplementary Information

Supplementary Information 1: List of Microsporidia species included in the Microsporidia phylogeny (Excel sheet, accessible online).

Column A: Accession numbers

Column B to E: Phylogenetic assignments given, following the phylogenetic analysis (clade, group, genera, species name). *Nomen dubium* species (*i.e.* those the genera name should be changed, as they are not related phylogenetically to other species of the genera) are indicated with a star.

Column F: synonyms.

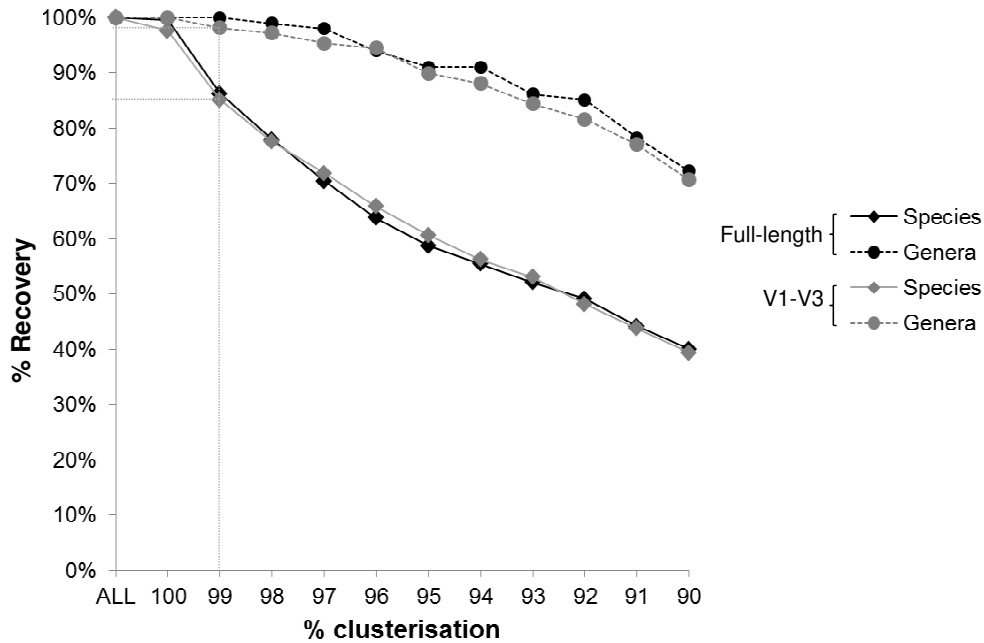
Columns G to I: Current taxonomy within Microsporidia. Families and order names for each genus, reviewed in Wijayawardene *et al.*, 2019 are reported for each species.

Columns J to L: Taxonomy found in NCBI for each sequence (consultation: 29/5/2020).

Columns M and N: Taxonomy found in SILVA for each sequence (consultation: 29/5/2020).

Columns O and P: Taxonomy found in PR2 (consultation 10/10/2019).

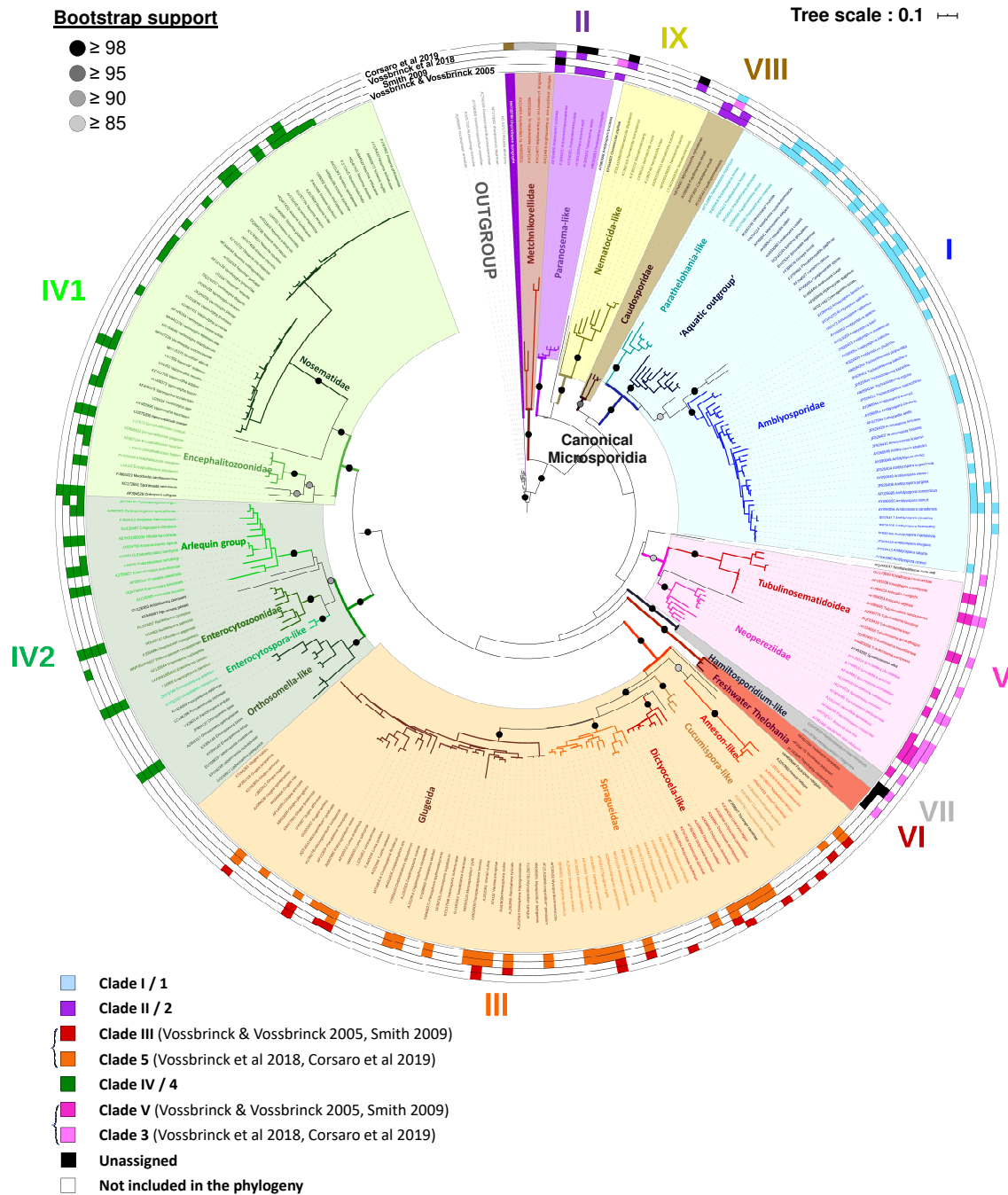
Columns Q to T: Assignment of species to different clades in previous studies (Vossbrinck & Vossbrinck 2005; Smith *et al.*, 2009; Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck and Weiss 2018; Corsaro *et al.*, 2018). Accession numbers used in these respective studies are not always those used in the present study. Note that two clades numbering are found in the literature. They are roughly similar, except for clades III and V which are inverted. To distinguish them, Arabic and Latin numbers are used. Clade III correspond to clade 5, and clade V to clade 3. Latin numbers are used in the current study.



Supplementary Information 2: Proportion of species (solid lines) and genera (dashed lines) recovered when applying different clustering thresholds on full length SSU sequences (black lines) or V1-V3 sequences (grey lines).

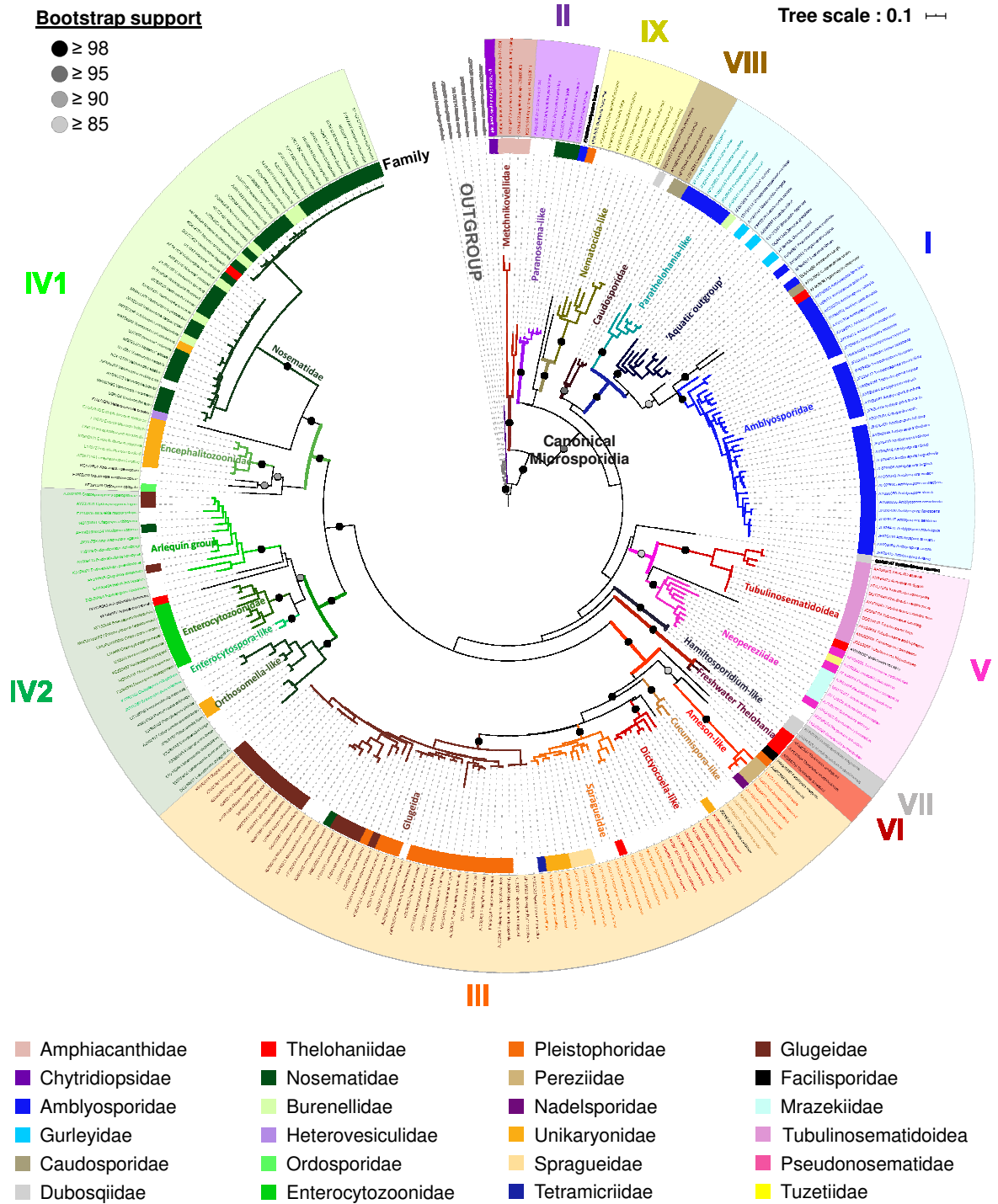
255 sequences were analysed (species *nomen dubium* were not included, listed in Supplementary Information 1), each corresponding to a distinct species (104 genera). Some sequences are identical since 0.4% (full-length) and 2.7% (V1-V3) of species clustered with other species with a 100% clustering threshold (unique sequences). Using a 99% clustering threshold, 85% (V1-V3) to 87% (full-length) of species and 100% (V1- V3 and full-length) of genera could be distinguished. At 97% and 95% respectively less than 71% and 60% of species could be distinguished from the others.

Supplementary Information 3: Alignment of reference SSU sequences (separate .txt file, accessible online).



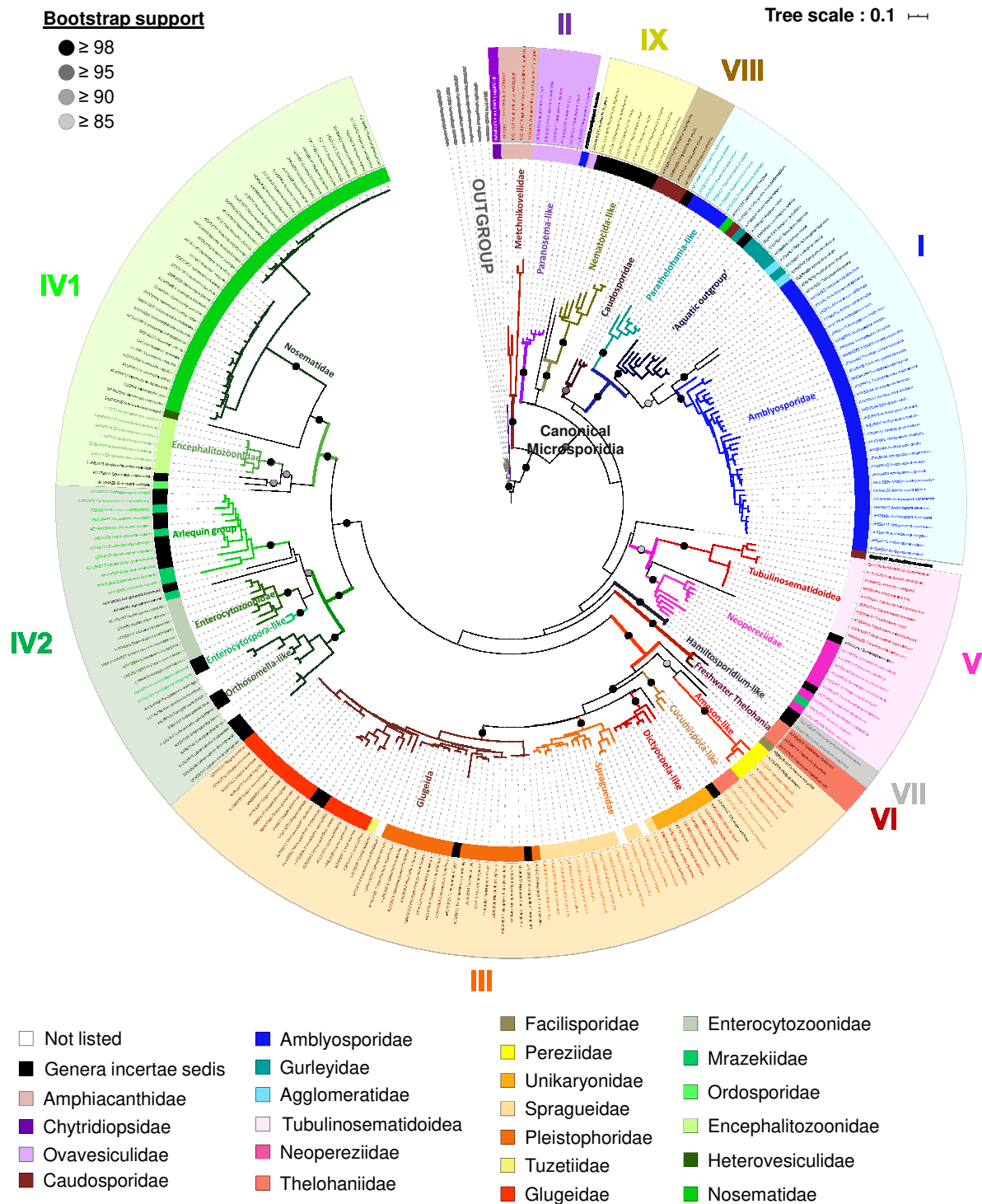
Supplementary Information 4: Comparison between the phylogenetic classification proposed in the current study, and phylogenetic classifications obtained in other studies, all focusing on full-length SSU sequences (Vossbrinck & Vossbrinck *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2009; Corsaro *et al.*, 2019; Vossbrinck *et al.*, 2018).

Rings, from the outer to the inner: clade numbering used in this study; clade numbering in Corsaro *et al.*, 2019, Vossbrinck *et al.*, 2018, Smith 2009 and Vossbrinck & Vossbrinck *et al.*, 2005; accession number and species name; group names given in the current study. Circles on branches indicate the ML bootstrap support. Bootstraps below the group level are not shown to lighten the figure. Tree annotated using the interactive Tree of Life (iTOL) server (Letunic & Bork, 2016). Five clades were identified in the previous studies, but numbers given to these clades differ according to the study. Clade III in Vossbrinck & Vossbrinck 2005 and Smith 2009 corresponds to clade 5 in Corsaro *et al.*, 2019 and Vossbrinck *et al.*, 2018; and vice-versa. Nomenclature used in the current study, given in the outer circle, follows the one proposed by Vossbrinck & Vossbrinck *et al.*, 2005. The phylogenetic tree we obtained using 265 species is mostly consistent with these phylogenetic trees. In addition to the five clades previously identified, we identified 4 minor clades (VI, VII, VIII and IX) which include species which were either not included in past studies, or inconsistently assigned to one of the other clades.



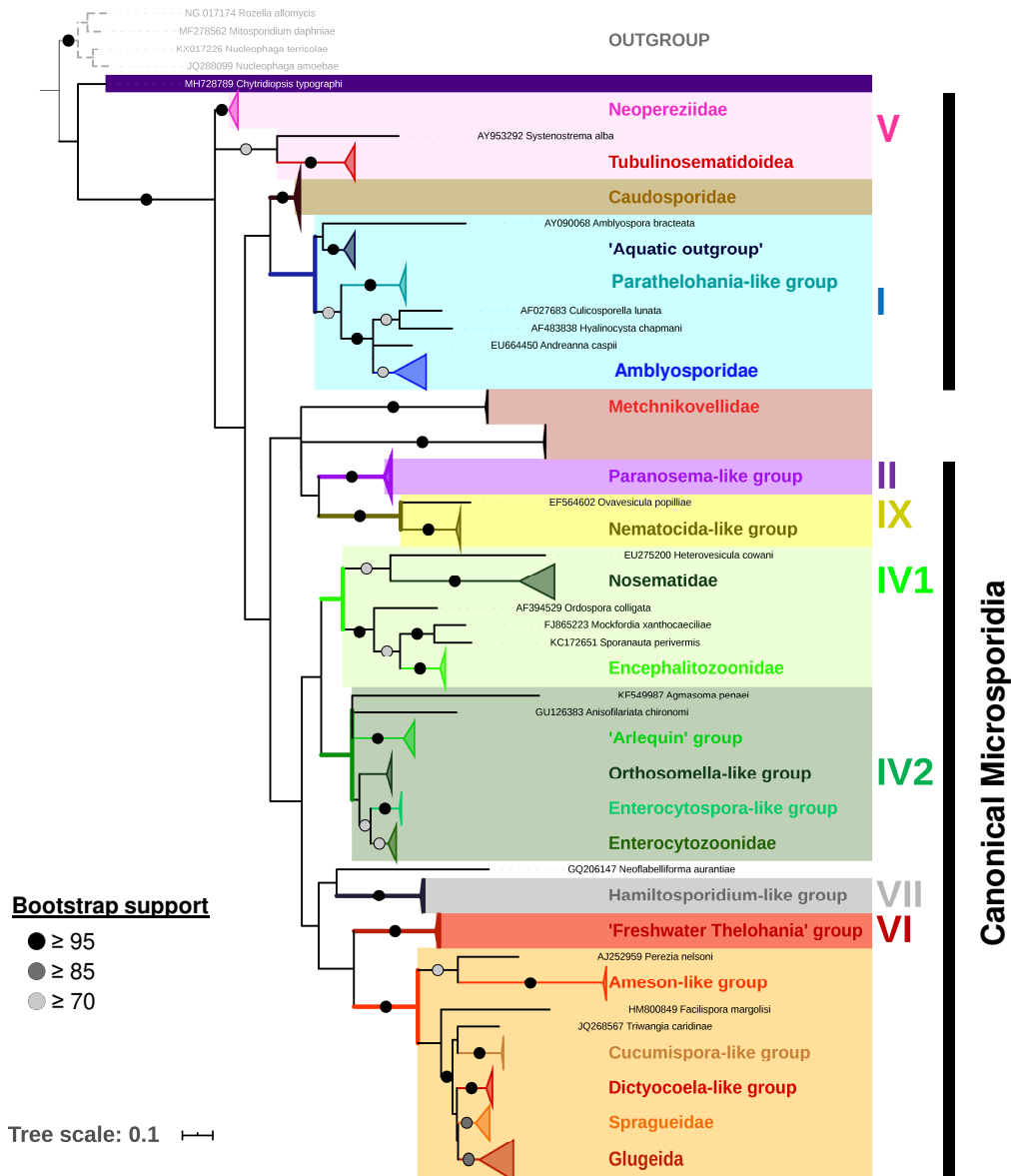
Supplementary Information 5: Taxonomy of species found in GenBank (Federhen, 2012), reported on a Maximum Likelihood phylogenetic tree including full length SSU rDNA sequences of 265 microsporidian species and six outgroup taxa.

Circles on branches indicate the ML bootstrap support. Bootstraps below the group level are not shown to lighten the figure. Rings, from the outer to the inner: clade numbering used in this study; accession number and species name; family provided in GenBank; group names given in the current study. Circles on branches indicate the ML bootstrap support. Bootstraps below the group level are not shown to lighten the figure. Many of the taxonomic data found in GenBank are disagreement with the phylogenetic tree obtained in this study.



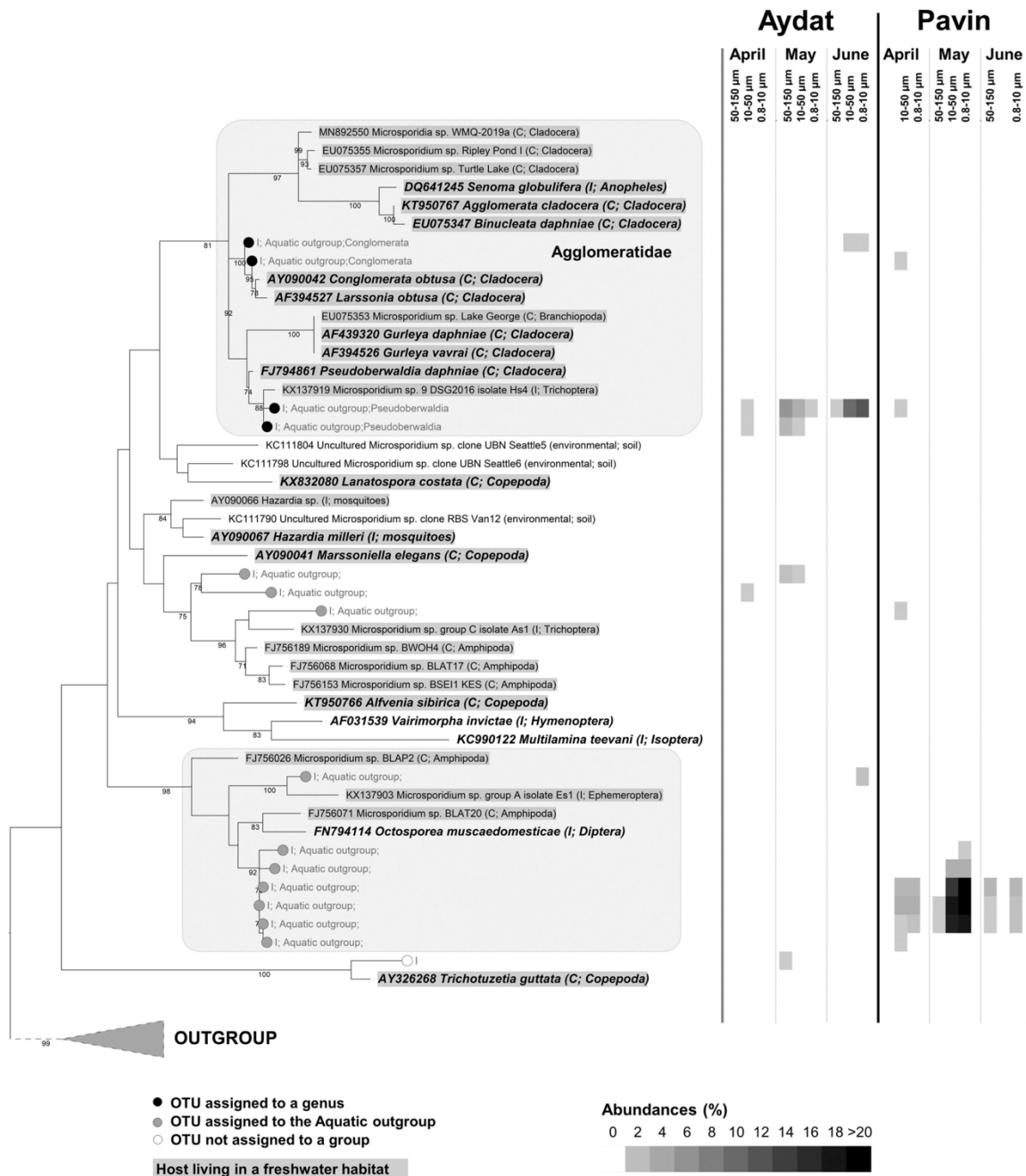
Supplementary Information 6: Comparison between the phylogenetic classification proposed in the current study, and taxonomic data provided by Wijayawardene *et al.*, 2018.

Family names, given for each genera in Wijayawardene *et al.*, 2018 are reported on a Maximum Likelihood phylogenetic tree obtained with full-length SSU rDNA sequences of 265 microsporidian species and six outgroup taxa. Circles on branches indicate the ML bootstrap support. Bootstraps below the group level are not shown to lighten the figure. Rings, from the outer to the inner: clade numbering used in this study; accession number and species name; family provided by Wijayawardene *et al.*, 2018; group names given in the current study. Circles on branches indicate the ML bootstrap support. Bootstraps below the group level are not shown to lighten the figure. Most of the phylogenetic ‘groups’ we identified correspond to families. Some families are however clearly polyphyletic, as the Thelohaniidae, splitted into the ‘Freshwater Thelohania group’ and the ‘*Cucumispora* group’. Besides, we identified groups containing genera not assigned to a family, as the *Nematocida*-like, *Orthosomella*-like and *Hamiltosporidium*-like groups.



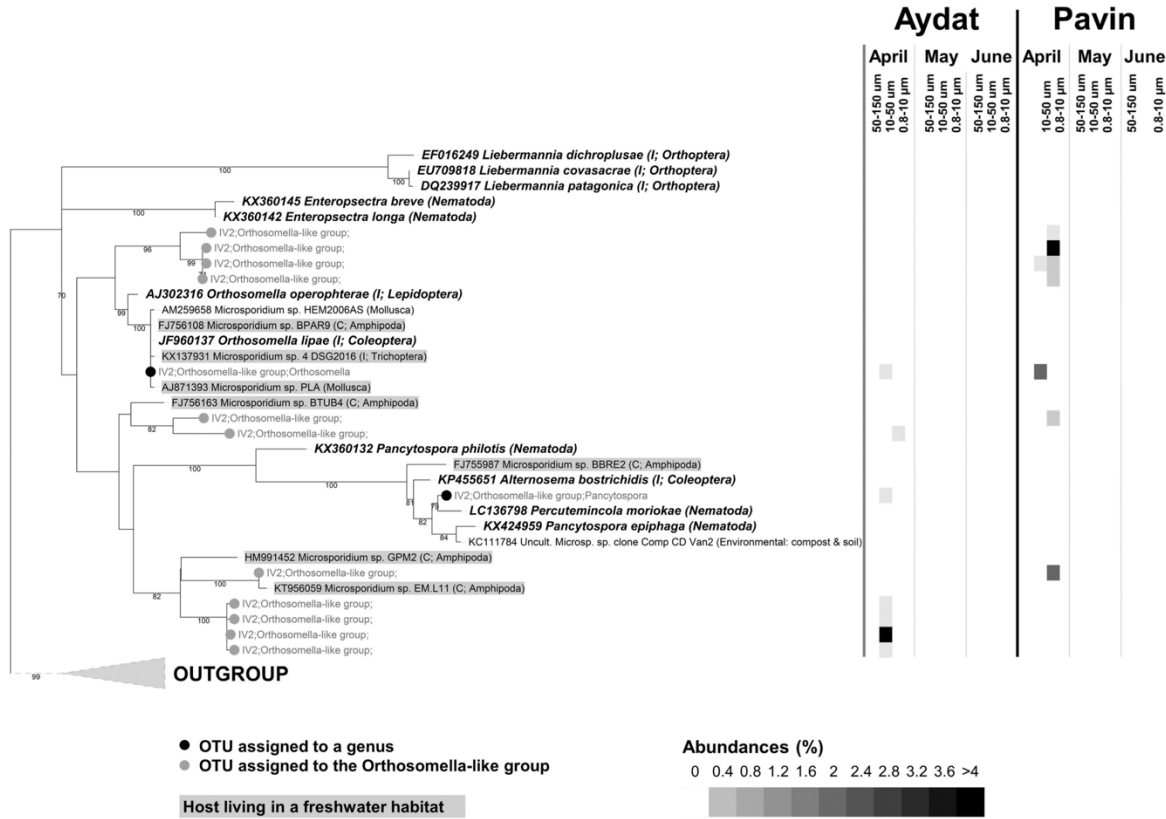
Supplementary Information 7: Microsporidian phylogenetic tree based on the V1-V3 region of SSU rDNA of 235 microsporidian species and four outgroup taxa produced by Maximum Likelihood (366 positions in the final dataset).

Circles on branches indicate the ML bootstrap support. Bootstrap supports < 70 as well as those related to nodes below the group level are not shown. With few exceptions, groups and clades defined with the phylogeny based on full SSU length are recovered when the V1V3 region is used, with bootstrap supports > 70 for all groups (exceptions: *Metchnikovellidae*: polyphyletic; clade V: polyphyletic; *Orthosomella*-like group: bootstrap value =64); *Amblyospora bracteata*: falls here within clade I while not assigned in a clade with full SSU rDNA). Tree annotated using the interactive Tree of Life (iTOL) server (Letunic & Bork, 2016).



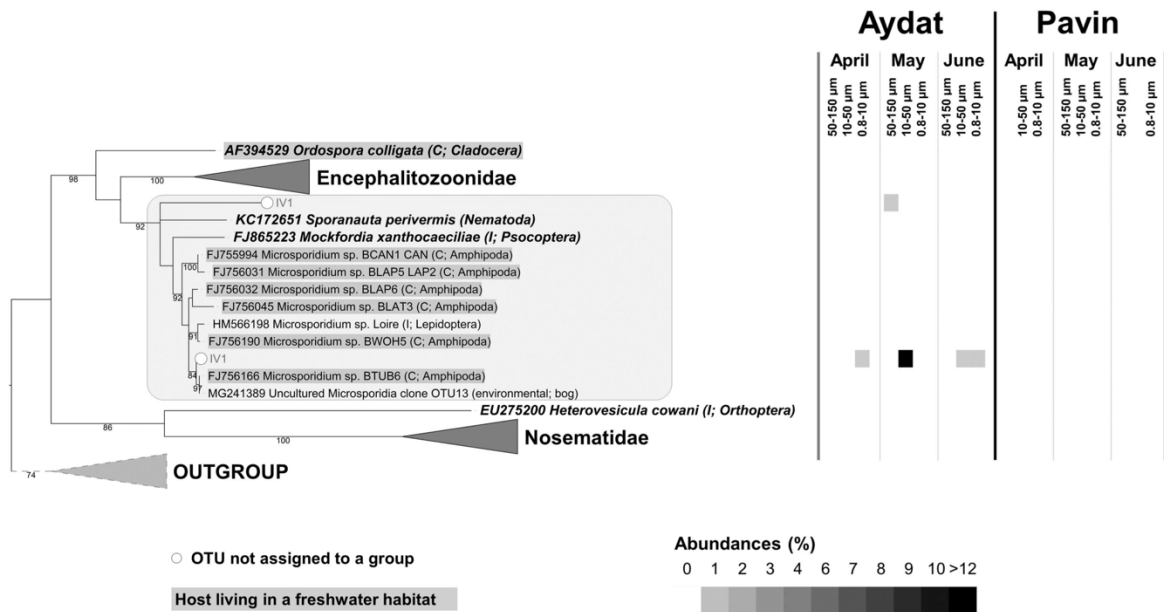
Supplementary Information 8: Maximum Likelihood phylogeny of abundant OTUs (> 1% of reads in at least one sample) affiliated to the Aquatic outgroup (clade I) with other sequences belonging to this group.

Numbers next to branches indicate the ML bootstrap support (200 replicates). Node supports <70 are not shown. Outgroup species are representative species of other groups belonging to clade I (details in Supporting Information 15). Affiliation of each OTU following the bioinformatics analysis is given in grey text. Described species are shown in bold-italic, and sequences from undescribed species in normal text. Hosts are given in brackets. C: Crustacea; I: Insecta. Relative abundances of each OTU across samples are reported with a heatmap. Note that the OTU related to *Trichotuzetia guttata* on the tree was initially not assigned to the Aquatic outgroup. This is due to the fact that *T. guttata* is not in the database we used for assignment, as its SSU sequence is only partial (covering the V1-V3 region, but not the full length). The current phylogeny places *T. guttata*, as this OTU, in the Aquatic outgroup.



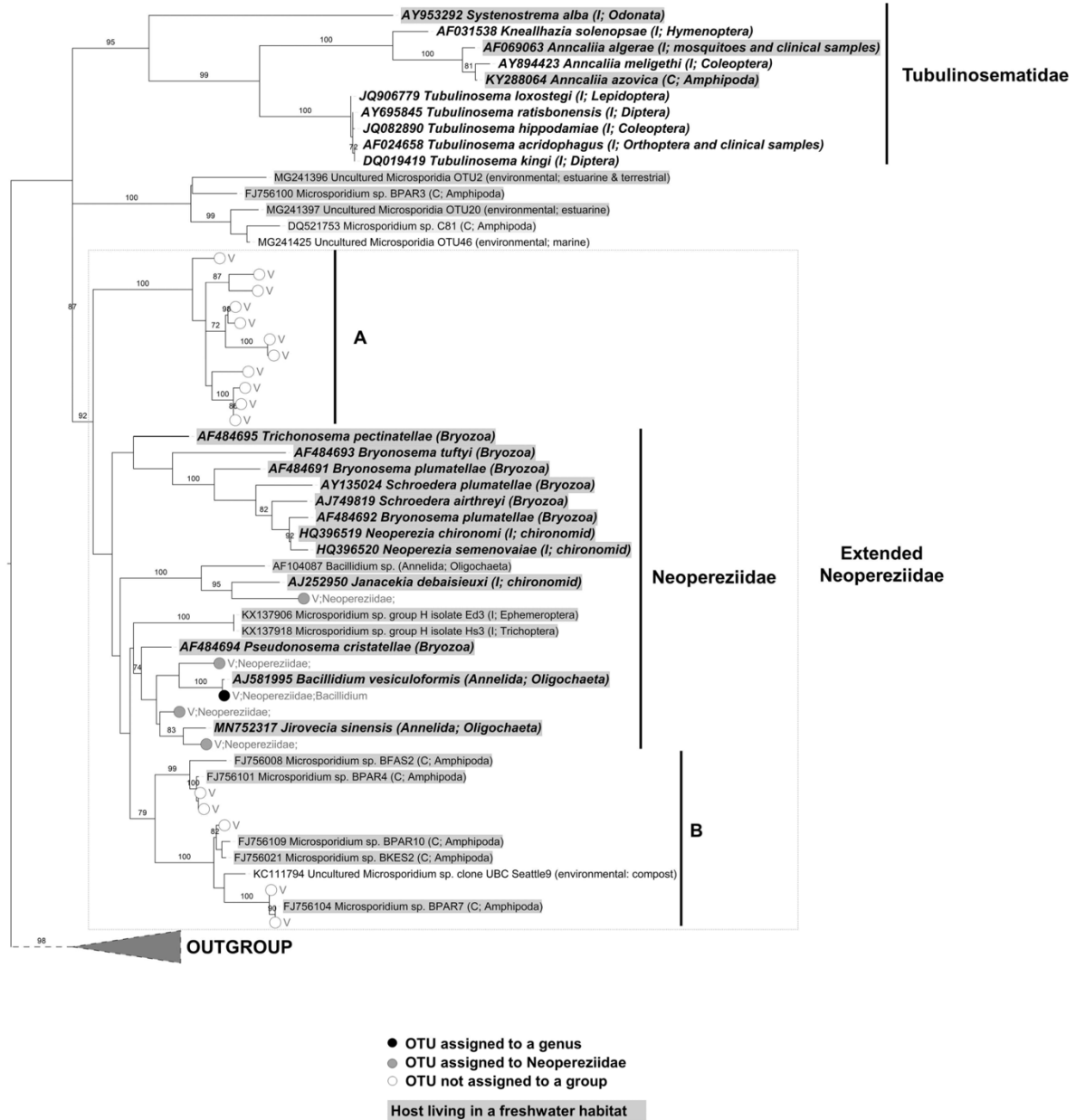
Supplementary Information 9: Maximum Likelihood phylogeny of abundant OTUs (> 1% of reads in at least one sample) affiliated to the Orthosomella-like group (clade IV2) with other sequences belonging to this group.

Numbers next to branches indicate the ML bootstrap support (200 replicates). Node supports <70 are not shown. Outgroup species are representative species of other groups belonging to clade IV2 (details in Supporting Information 15). Affiliation of each OTU following the bioinformatics analysis is given in grey text. Described species are shown in bold-italic, and sequences from undescribed species in normal text. Hosts are given in brackets. C: Crustacea; I: Insecta. Relative abundances of each OTU across samples are reported with a heatmap.



Supplementary Information 10: Maximum Likelihood phylogeny of abundant OTUs (> 1% of reads in at least one sample) affiliated to the clade IV1, but not affiliated to any group, with other sequences belonging to this clade.

Numbers next to branches indicate the ML bootstrap support (200 replicates). Node supports <70 are not shown. Outgroup species are representative species of other groups belonging to clade IV2 (details in Supporting Information 15). Affiliation of each OTU following the bioinformatics analysis is given in grey text. Described species are shown in bold-italic, and sequences from undescribed species in normal text. Hosts are given in brackets. C: Crustacea; I: Insecta. Relative abundances of each OTU across samples are reported with a heatmap.



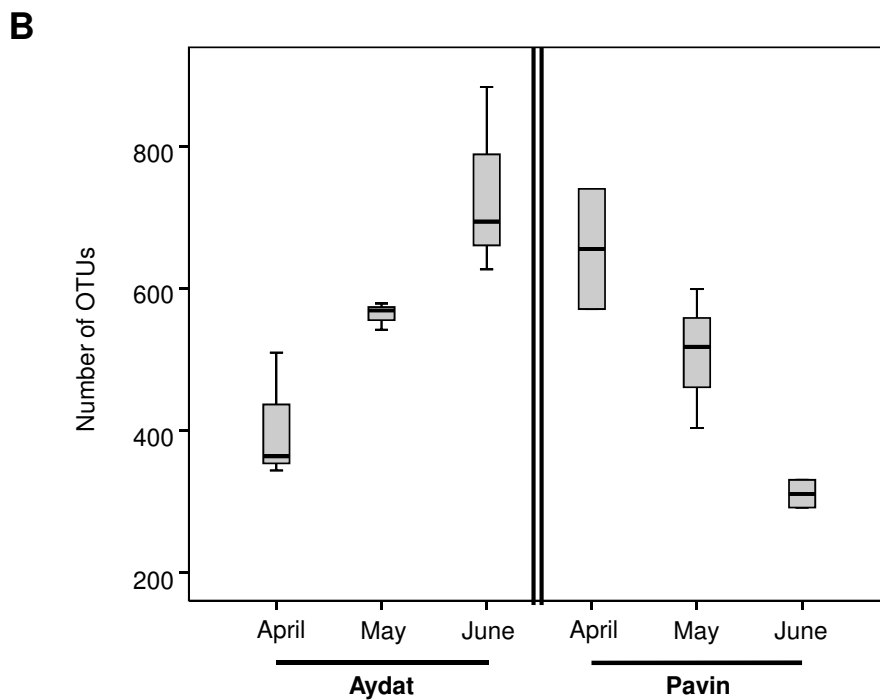
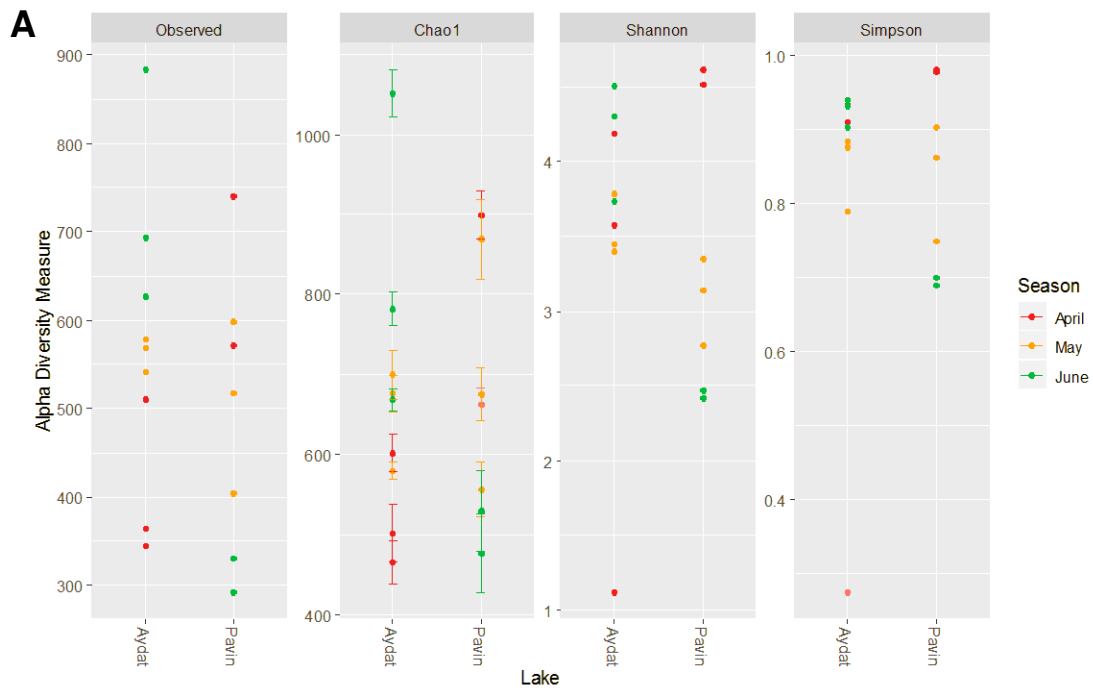
Supplementary Information 11: Maximum Likelihood phylogeny of OTUs affiliated to Clade V with other sequences belonging to this clade.

As none of these OTUs represent >1% of reads in any sample, all OTUs obtained in our analysis are used. Numbers next to branches indicate the ML bootstrap support (200 replicates). Node supports <70 are not shown. Outgroup species are representative species of clades I, III, IV1 and IV2 (details in Supporting Information 15). Affiliation of each OTU following the bioinformatics analysis is given in grey text. Described species are shown in bold-italic, and sequences from undescribed species in normal text. Hosts are given in brackets. C: Crustacea; I: Insecta. Many OTUs within clade V were not assigned to a group (white dots). They form either two sister groups to Neoperezziidae (A and B), or form, more likely, a bigger group including the Neoperezziidae (‘Extended Neoperezziidae’).

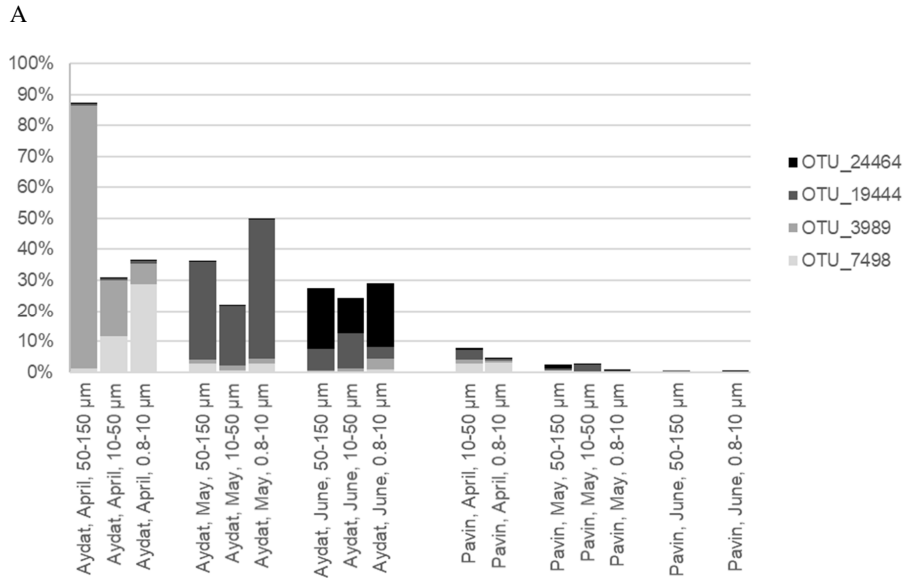
	Arlequin group	Enterocytopora-like group	Enterocytozoonidae	Orthosomella-like group	Van10 group	BPAR5 group	Van8 group	BFAS6 group	Van9 group
Arlequin group		80,1%	74,7%	68,0%	76,1%	76,5%	71,4%	79,7%	78,7%
Enterocytopora-like group	0,1993		84,8%	74,5%	80,1%	84,1%	78,2%	81,3%	81,4%
Enterocytozoonidae	0,2527	0,1522		73,0%	77,7%	83,2%	74,7%	79,7%	79,2%
Orthosomella-like group	0,3200	0,2549	0,2695		70,8%	78,6%	72,7%	76,4%	71,5%
Van10 group	0,2392	0,1989	0,2231	0,2916		82,3%	71,5%	83,8%	79,3%
BPAR5 group	0,2352	0,1589	0,1684	0,2137	0,1773		83,0%	86,1%	81,4%
Van8 group	0,2856	0,2181	0,2533	0,2734	0,2847	0,1702		74,4%	72,6%
BFAS6 group	0,2033	0,1867	0,2035	0,2361	0,1623	0,1390	0,2558		81,1%
Van9 group	0,2126	0,1862	0,2075	0,2851	0,2070	0,1859	0,2740	0,1893	

Supplementary Information 12: Estimates of evolutionary divergence over sequence pairs between groups belonging to clade IV2.

Net between groups distances were calculated by Kimura-2-Parameter analysis, based on 353 informative positions and 73 sequences. Lower diagonal: distance matrix; upper diagonal, % similarity = $[(1 - \text{distance value}) \times 100]$ %. New groups, containing only sequences from undescribed microsporidian species, are indicated in grey.



Supplementary Information 13: A. α -diversity indices (Richness observed, Chao1, Shannon and Simpson) of Microsporidia community in lake Aydat and lake Pavin. Color of the data points indicate the month. B. Number of OTUs identified in the different samples.



B

	OTU_7498	OTU_19444	OTU_3989	OTU_24464
OTU_7498		98,4%	97,1%	96,5%
OTU_19444	0,0158		96,5%	96,2%
OTU_3989	0,0293	0,0350		98,1%
OTU_24464	0,0349	0,0378	0,0185	

Supplementary Information 14: A. Relative abundances of the four most abundant OTUs assigned to the *Crispospora* genus across the different samples. B. Pairwise evolutionary distances among the four most abundant OTUs assigned to the *Crispospora* genus.

Analyses were conducted using the Kimura-2-parameter model, based on 386 informative positions. Lower diagonal, distance matrix (number of base substitutions per site); upper diagonal, % similarity = $[(1 - \text{distance value}) \times 100]$ %. Pairs showing < 98% similarity are shown in bold.

Figure concerned	Accession number	Species	Clade	Group
Figure 3 (OTUs affiliated to the Arlequin group, clade IV2)	JX915760	<i>Enterocytozpora artemiae</i>	IV2	Enterocytozpora-like group
	KT762153	<i>Globulispora mitoportans</i>	IV2	Enterocytozpora-like group
	FJ594990	<i>Desmozoon lepeophtherii</i>	IV2	Enterocytozoonidae
	L16868	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	IV2	Enterocytozoonidae
	KF135644	<i>Enterospira nucleophila</i>	IV2	Enterocytozoonidae
	AJ302317	<i>Orthosomella operophtherae</i>	IV2	Orthosomella-like group
Figure 4 (OTUs affiliated to clade IV2, unknown group(s))	EU709818	<i>Liebermannia covasacrae</i>	IV2	Orthosomella-like group
	AF394529	<i>Ordospora colligata</i>	IV1	
	L17072	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	IV1	
	FJ865223	<i>Mockfordia xanthocaeciliae</i>	IV1	
Supplementary Information 6 (OTUs affiliated to the Aquatic outgroup, clade I)	KC172651	<i>Sporanauta perivermis</i>	IV1	
	U68473	<i>Amblyospora californica</i>	I	Amblyosporidae
	AF027684	<i>Edhazardia aedis</i>	I	Amblyosporidae
	HM594266	<i>Trichoctosporea rugosa</i>	I	Amblyosporidae
	KF110990	<i>Takaospora nipponicus</i>	I	Parathelohania-like group
	AF027682	<i>Parathelohania anophelis</i>	I	Parathelohania-like group
Supplementary Information 7 (OTUs affiliated to the <i>Orthosomella</i> -like group, clade IV2)	AY090065	<i>Parathelohania obesa</i>	I	Parathelohania-like group
	GU130407	<i>Crispospora chironomi</i>	IV2	Arlequin group
	AY009115	<i>Endoreticulatus bombycis</i>	IV2	Arlequin group
	JX915760	<i>Enterocytozpora artemiae</i>	IV2	Enterocytozpora-like group
	KT762153	<i>Globulispora mitoportans</i>	IV2	Enterocytozpora-like group
	LWDP01000010	<i>Enterospira canceri</i>	IV2	Enterocytozoonidae
Supplementary Figure 8 (OTUs affiliated to clade IV1, unknown group(s))	KF135644	<i>Enterospira nucleophila</i>	IV2	Enterocytozoonidae
	KF549987	<i>Agmasoma penaei</i>	IV2	
	GU130407	<i>Crispospora chironomi</i>	IV2	Arlequin group
	GU126383	<i>Anisofilariata chironomi</i>	IV2	
	AJ302317	<i>Orthosomella operophtherae</i>	IV2	Orthosomella-like group
	KT762153	<i>Globulispora mitoportans</i>	IV2	Enterocytozpora-like group
Supplementary Figure 9 (OTUs affiliated to clade V, known and unknown groups)	L16868	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	IV2	Enterocytozoonidae
	KX364285	<i>Unikaryon legeri</i>	III	Dictyocoela-like group
	U15987	<i>Glugea atherinae</i>	III	Glugeida group
	AF394529	<i>Ordospora colligata</i>	IV1	
	FJ865223	<i>Mockfordia xanthocaeciliae</i>	IV1	
	GU130407	<i>Crispospora chironomi</i>	IV2	Arlequin group
	AJ302317	<i>Orthosomella operophtherae</i>	IV2	Orthosomella-like group
	AF394526	<i>Gurleya vavrai</i>	I	Aquatic outgroup
AF027682	<i>Parathelohania anophelis</i>	I	Parathelohania-like group	

Supplementary Information 15: Outgroup species and their affiliation used for each of the phylogenetic analyses presented in this study.

References (Supplementary Information)

Andreadis TG, Simakova AV, Vossbrinck CR, Shepard JJ, Yurchenko YA. Ultrastructural characterization and comparative phylogenetic analysis of new microsporidia from Siberian mosquitoes: Evidence for coevolution and host switching. *J Invertebr Pathol.* 2012;109(1):59-75.

Andreadis TG, Takaoka H, Otsuka Y, Vossbrinck CR. Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite, *Takaokaspora nipponicus* n. gen., n. sp. from the invasive rock pool mosquito, *Ochlerotatus japonicus japonicus*. *J Invertebr Pathol.* 2013;114(2):161-72.

Bacela-Spychalska K, Wróblewski P, Mamos T, Grabowski M, Rigaud T, Wattier R, et al. Europe-wide reassessment of *Dictyocoela* (Microsporidia) infecting native and invasive amphipods (Crustacea): molecular versus ultrastructural traits. *Scientific Reports.* 2018;8(1):8945.

Baker MD, Vossbrinck CR, Maddox JV, Undeen AH. Phylogenetic Relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* Species (Microspora) Based on Ribosomal RNA Sequence Data. *J Invertebr Pathol.* 1994;64(2):100-6.

Bojko J, Behringer DC, Moler P, Stratton CEL, Reisinger L. A new lineage of crayfish-infecting Microsporidia: The *Cambaraspora floridanus* n. gen. n. sp. (Glugeida: Glugeidae) complex from Floridian freshwaters (USA). *J Invertebr Pathol.* 2020;171:107345.

Brown AM, Adamson ML. Phylogenetic distance of *Thelohania butleri* Johnston, Vernick, and Sprague, 1978 (Microsporidia; Thelohaniidae), a parasite of the smooth pink shrimp *Pandalus jordani*, from its congeners suggests need for major revision of the genus *Thelohania* Henneguy, 1892. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53(6):445-55.

Canning EU, Curry A, Cheney SA, Lafranchi-Tristem NJ, Ebert D, Rifardt D, et al. *Flabelliforma montana* (Phylum Microsporidia) from *Phlebotomus ariasi* (Diptera, Psychodidae): ultrastructural observations and phylogenetic relationships. *Acta Protozool.* 2001; 37, 207–221.

Corsaro D, Wylezich C, Venditti D, Michel R, Walochnik J, Wegensteiner R. Filling gaps in the microsporidian tree: rDNA phylogeny of *Chytridiopsis typographi* (Microsporidia: Chytridiopsida). *Parasitol Res.* 2019;118(1):169-80.

Diamant A, Rothman SB, Goren M, Galil BS, Yokes MB, Szitenberg A, et al. Biology of a new xenoma-forming gonadotropic microsporidium in the invasive blotchfin dragonet *Callionymus filamentosus*. *Dis Aquat Organ.* 2014;109(1):35-54.

Federhen S. The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Research.* 2012;40(D1):D136-D43.

Freeman MA, Kasper JM, Kristmundsson Á. *Nucleospora cyclopteri* n. sp., an intranuclear microsporidian infecting wild lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L., in Icelandic waters. *Parasites & Vectors.* 2013;6(1):49.

Haag KL, Larsson JI, Refardt D, Ebert D. Cytological and molecular description of *Hamiltosporidium tvaerminnensis* gen. et sp. nov., a microsporidian parasite of *Daphnia magna*, and establishment of *Hamiltosporidium magnivora* comb. nov. *Parasitology.* 2010;138(4):447-62.

Hajek AE, Solter LF, Maddox JV, Huang W-F, Estep AS, Krawczyk G, et al. *Nosema maddoxi* sp. nov. (Microsporidia, Nosematidae), a Widespread Pathogen of the Green Stink Bug *Chinavia hilaris* (Say) and the Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys* (Stål). *J Eukaryot Microbiol.* 2018;65(3):315-30.

Issi IV, Tokarev YS, Seliverstova EV, Voronin VN. Taxonomy of *Neoperezia chironomi* and *Neoperezia semenovaiiae* comb. nov. (Microsporidia, Aquasporidia): Lessons from ultrastructure and ribosomal DNA sequence data. *Eur J Protistol.* 2012;48(1):17-29.

Kyei-Poku G, Sokolova YY. The microsporidium *Nosema disstriae* (Thomson 1959): Fine structure and phylogenetic position within the *N. bombycis* clade. *J Invertebr Pathol.* 2017;143:90-103.

Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W242-5.

Liu XH, Stentiford GD, Voronin VN, Sato H, Li AH, Zhang JY. *Pseudokabatana alburnus* n. gen. n. sp., (Microsporidia) from the liver of topmouth culter *Culter alburnus* (Actinopterygii, Cyprinidae) from China. *Parasitol Res.* 2019;118(6):1689-99.

Lom J, Nilsen F. Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *Int J Parasitol.* 2003;33(2):107-27.

Lord JC, Vossbrinck CR, Wilson JD. Occurrence of *Nosema oryzaephili* in *Cryptolestes ferrugineus* and transfer to the genus *Paranosema*. *J Invertebr Pathol.* 2010;105(1):112-5.

Nishikori K, Setiamarga DHE, Tanji T, Kuroda E, Shiraishi H, Ohashi-Kobayashi A. A new microsporidium *Percutemincola moriokae* gen. nov., sp. nov. from *Oscheius tipulae*: A novel model of microsporidia–nematode associations. *Parasitology.* 2018;145(14):1853-64.

Omrani S-M, Moosavi S-F, Farrokhi E. *Parathelohania iranica* sp. nov. (Microsporidia: Amblyosporidae) infecting malaria mosquito *Anopheles superpictus* (Diptera: Culicidae): Ultrastructure and molecular characterization. *J Invertebr Pathol.* 2017;146:1-6.

Palenzuela O, Redondo MJ, Cali A, Takvorian PM, Alonso-Naveiro M, Alvarez-Pellitero P, et al. 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.* 2014;44(3-4):189-203.

Pilarska DK, Radek R, Huang WF, Takov DI, Linde A, Solter LF. Review of the genus *Endoreticulatus* (Microsporidia, Encephalitozoonidae) with description of a new species isolated from the grasshopper *Poecilimon thoracicus* (Orthoptera: Tettigoniidae) and transfer of *Microsporidium itiiti* Malone to the genus. *J Invertebr Pathol.* 2014;124:23-30.

Plowes RM, Becnel JJ, LeBrun EG, Oi DH, Valles SM, Jones NT, et al. *Myrmecomorba nylanderiae* gen. et sp. nov., a microsporidian parasite of the tawny crazy ant *Nylanderia fulva*. *J Invertebr Pathol.* 2015;129:45-56.

Pretto T, Montesi F, Ghia D, Berton V, Abbadi M, Gastaldelli M, et al. Ultrastructural and molecular characterization of *Vairimorpha austropotamobii* sp. nov. (Microsporidia: Burenellidae) and *Thelohania contejeani* (Microsporidia: Thelohaniidae), two parasites of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* complex (Decapoda: Astacidae). *J Invertebr Pathol.* 2018;151:59-75.

Quiles A, Bacela-Spychalska K, Teixeira M, Lambin N, Grabowski M, Rigaud T, et al. Microsporidian infections in the species complex *Gammarus roeselii* (Amphipoda) over its geographical range: evidence for both host-parasite co-diversification and recent host shifts. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):327.

Refardt D, Decaestecker E, Johnson PT, Vavra J. Morphology, molecular phylogeny, and ecology of *Binucleata daphniae* n. g., n. sp. (Fungi: Microsporidia), a parasite of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Branchiopoda). *J Eukaryot Microbiol.* 2008;55(5):393-408.

Rode NO, Landes J, Lievens EJ, Flaven E, Segard A, Jabbour-Zahab R, et al. Cytological, molecular and life cycle characterization of *Anostracospora rigaudi* n. g., n. sp. and *Enterocytozpora artemiae* n. g., n. sp., two new microsporidian parasites infecting gut tissues of the brine shrimp *Artemia*. *Parasitology.* 2013;140(9):1168-85.

Simakova AV, Vossbrinck CR, Andreadis TG. Molecular and ultrastructural characterization of *Andreanna caspii* n. gen., n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae), a parasite of *Ochlerotatus caspius* (Diptera: Culicidae). *J Invertebr Pathol.* 2008;99(3):302-11.

Simakova AV, Tokarev YS, Issi IV. A new microsporidium *Fibrillaspora daphniae* g. n. sp. n. infecting *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) in Siberia and its taxonomic placing within a new family Fibrillasporidae and new superfamily Tubulinosematoidea (Opisthosporidia: Microsporidia). *Parasitol Res.* 2018;117(3):759-66.

Small HJ, Meyer GR, Stentiford GD, Dunham JS, Bateman K, Shields JD. *Ameson metacarcini* sp. nov. (Microsporidia) infecting the muscles of Dungeness crabs *Metacarcinus magister* from British Columbia, Canada. Dis Aquat Organ. 2014;110(3):213-25.

Smith JE. The ecology and evolution of microsporidian parasites. Parasitology. 2009;136(14):1901-14.

Sokolova YY, Overstreet RM. A new microsporidium, *Apotaspora heleios* n. g., n. sp., from the Riverine grass shrimp *Palaemonetes paludosus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae). J Invertebr Pathol. 2018;157:125-35.

Sokolova YY, Senderskiy IV, Tokarev YS. Microsporidia *Alfvenia sibirica* sp. n. and *Agglomerata cladocera* (Pfeiffer) 1895, from Siberian microcrustaceans and phylogenetic relationships within the "Aquatic outgroup" lineage of fresh water microsporidia. J Invertebr Pathol. 2016a;136:81-91.

Sokolova YY, Sakaguchi K, Paulsen DB. Establishing a New Species *Encephalitozoon pogonae* for the Microsporidian Parasite of Inland Bearded Dragon *Pogona vitticeps* Ahl 1927 (Reptilia, Squamata, Agamidae). J Eukaryot Microbiol. 2016b;63(4):524-35.

Sokolova YY, Sokolov IM, Carlton CE. New microsporidia parasitizing bark lice (Insecta: Psocoptera). J Invertebr Pathol. 2010;104(3):186-94.

Stentiford GD, Ramilo A, Abollo E, Kerr R, Bateman KS, Feist SW, et al. *Hyperspora aquatica* n.g.n., n.sp. (Microsporidia), hyperparasitic in *Marteilia cochillia* (Paramyxida), is closely related to crustacean-infecting microsporidian taxa. Parasitology. 2017;144(2):186-99.

Tokarev YS, Huang W-F, Solter LF, Malysch JM, Becnel JJ, Vossbrinck CR. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. J Invertebr Pathol. 2020;169:107279.

Terry RS, Smith JE, Sharpe RG, Rigaud T, Littlewood DT, Ironside JE, et al. Widespread vertical transmission and associated host sex-ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;271(1550):1783-9.

Vavra J, Hylis M, Fiala I, Nebesarova J. *Globulispora mitoportans* n. g., n. sp., (Opisthosporidia: Microsporidia) a microsporidian parasite of daphnids with unusual spore organization and prominent mitosome-like vesicles. J Invertebr Pathol. 2016;135:43-52.

Vávra J, Hylis M, Fiala I, Refardt D, Larsson JIR. Microsporidia in a Woodland Pool I. *Lanatospora costata* sp. n. (Opisthosporidia, Microsporidia), Parasite of *Megacyclops viridis* (Crustacea, Copepoda): Fine Structure and Molecular Phylogeny. Acta Protozool. 2016;55: 269–280.

Videira M, Casal G, Rocha S, Goncalves E, Azevedo C, Velasco M, et al. *Potaspora aequidens* n. sp. (Microsporidia, Tetramicridae), a parasite infecting the freshwater fish *Aequidens plagiazonatus* (Teleostei, Cichlidae) from Brazil. Parasitol Res. 2015;114(7):2435-42.

Vossbrinck CR, Andreadis TG, Vavra J, Becnel JJ. Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic Microsporidia (Microsporidia: Amblyosporidae). J Eukaryot Microbiol. 2004;51(1):88-95.

Vossbrinck CR, Debrunner-Vossbrinck BA. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. Folia Parasitol. 2005;52:131-42.

Vossbrinck CR, Debrunner-Vossbrinck BA, Weiss LM. Phylogeny of the Microsporidia. In: Weiss LM, Becnel JJ, editors. Microsporidia: Pathogens of Opportunity, First Edition; 2014.

Wang Y, Li X-C, Fu G, Zhao S, Chen Y, Wang H, et al. Morphology and phylogeny of *Ameson portunus* n. sp. (Microsporidia) infecting the swimming crab *Portunus trituberculatus* from China. European Journal of Protistology. 2017;61:122-36.

Wijayawardene NN, Pawłowska J, Letcher PM, Kirk PM, Humber RA, Schüßler A, et al. Notes for genera: basal clades of Fungi (including Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota,

Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota and Zoopagomycota). *Fungal Divers.* 2018;92(1):43-129.

Yakovleva Y, Nassonova E, Lebedeva N, Lanzoni O, Petroni G, Potekhin A, et al. The first case of microsporidiosis in *Paramecium*. *Parasitology.* 2020;147(9):957-71.

Zhang G, Sachse M, Prevost MC, Luallen RJ, Troemel ER, Felix MA. A Large Collection of Novel Nematode-Infecting Microsporidia and Their Diverse Interactions with *Caenorhabditis elegans* and Other Related Nematodes. *PLoS Pathog.* 2016;12(12):e1006093.

CHAPITRE IV

VARIATIONS TEMPORELLES DE LA DIVERSITÉ DES MICROSPORIDIES ET DÉCOUVERTE DE NOUVELLES INTERACTIONS HÔTE- MICROSPORIDIE DANS UN ÉCOSYSTÈME LACUSTRE

Contexte de l'étude

L'article précédent montre la pertinence de l'approche développée, en étudiant la diversité des microsporidies dans deux lacs. Cette étude, bien que menée à une échelle temporelle très courte, montre qu'environ 50% des microsporidies identifiées n'ont pas pu être affiliées à un genre. Ces résultats couplés à ceux de Ardila-Garcia *et al.* (2013) et Williams *et al.* (2018) suggèrent qu'une grande partie de la diversité des microsporidies reste à décrire. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que cette diversité inconnue pourrait correspondre à des microsporidies capables d'infecter des hôtes sous-échantillonnés, notamment situés à la base du fonctionnement du réseau trophique. En effet, bien que les microsporidies aient un spectre d'hôtes très large, elles n'ont que très rarement été décrites comme parasites de protistes ou de microplancton, ces quelques descriptions étant souvent seulement morphologiques (*e.g.* Fokin *et al.*, 2008 ; Wolska et Mazurkiewicz-Zapalowicz, 2013).

C'est pourquoi dans l'étude présentée dans ce chapitre nous avons mis en place un échantillonnage de plus grande envergure (une année) dans le lac d'Aydat pour prendre en compte la dynamique temporelle des communautés de microsporidies mais aussi de leur hôtes potentiels (eucaryotes <150 µm). Les objectifs étaient de (i) révéler l'étendue de la diversité des microsporidies dans un écosystème lacustre grâce au métabarcoding et d'évaluer comment celle-ci varie au cours du temps, (ii) identifier de nouvelles associations hôte-microsporidie par une analyse de réseaux de cooccurrence ainsi que par une approche d'hybridation *in situ* (avec une sonde spécifique des microsporidies développée au laboratoire).

Temporal variations of Microsporidia diversity and discovery of new host–parasite interactions in a lake ecosystem

Marina Chauvet¹, Didier Debroas, Anne Moné, Aurore Dubuffet* and Cécile Lepère*

* These authors contributed equally to this work

¹ Corresponding author: chauvet.marina.pro@gmail.com

CNRS, Laboratoire Microorganismes : Génome Et Environnement, Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

Publié dans *Environmental Microbiology* – Mars 2022

doi: 10.1111/1462-2920.15950

I. Abstract

Microsporidia are a large group of obligate intracellular eukaryotic parasites related to Fungi. Recent studies suggest that their diversity has been greatly underestimated and little is known about their hosts other than metazoans, and thus about their impact on the communities at the base of the food web. In this work, we therefore studied the diversity of Microsporidia over one year and identified potential new hosts in small-sized fractions (<150 µm) in a lake ecosystem using a metabarcoding approach coupled with co-occurrence networks and tyramide signal amplification-fluorescent *in situ* hybridization. Our analysis shows a great Microsporidia diversity (1 472 OTUs), with an important part of this diversity being unknown. Temporal variations of this diversity have been observed, which might follow temporal variations of their potential hosts such as protists and microzooplankton. New hosts among them were identified as well as associations with phytoplankton. Indeed, repeated infections were observed in *Kellicottia* (rotifers) with a prevalence of 38% (infected individuals). Microsporidia inside a *Stentor* (ciliate) were also observed. Finally, potential infections of the diatom *Asterionella* were identified (prevalence <0.1%). The microsporidian host spectrum could be therefore even more important than previously described, and their role in the functioning of lake ecosystems is undoubtedly largely unknown.

II. Introduction

Microsporidia are a diverse phylum of unicellular eukaryotes related to Fungi (Karpov *et al.*, 2014). They are obligate intracellular parasites known to date to parasitize a broad range of hosts among the animal kingdom and some protists (Murareanu *et al.*, 2021). Many species parasitizing metazoan hosts have been described, with 16 metazoan phyla described as microsporidian hosts (Murareanu *et al.*, 2021). Microsporidia include the canonical Microsporidia, which share common features [including the presence of a polar tube, highly reduced mitochondria (mitosomes) and a compact genome], and Microsporidia-like organisms (Bass *et al.*, 2018; Wadi and Reinke, 2020; Park and Poulin, 2021). These parasites infect hosts in all environments, but 50% of the known genera infect aquatic hosts (Stentiford *et al.*, 2013). The environmental diversity of Microsporidia is nevertheless clearly underestimated since these species have been described mostly after the search of infectious agents in organisms of interest [edible fish and crustaceans, auxiliary insects, domestic insects (silkworms, bees)], pests (crop pests, disease-carrying insects), bioindicators (daphnids, amphipods), and humans. Moreover, Microsporidia are generally absent from studies focusing on the diversity of protists carried out by high-throughput sequencing, due to the use of primers not adapted to the microsporidian phylum (Hadziavdic *et al.*, 2014; Hugerth *et al.*, 2014). In aquatic ecosystems, high-throughput sequencing studies yet suggest the presence of numerous parasites with many sequences affiliated especially to alveolates and Fungi (*e.g.* Debroas *et al.*, 2017). Recent studies using microsporidian-specific primers suggest that a large amount of the environmental microsporidian diversity remains to be described (Ardila-Garcia *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2018; Dubuffet *et al.*, 2021). Moreover, although Microsporidia have a very wide host spectrum, they have rarely been described as parasites of protists and microzooplankton. In marine ecosystems, they are notably described as hyperparasites of gregarines (*e.g.* Mikhailov *et al.*, 2016). In freshwater ecosystems, infections by Microsporidia have been registered in ciliates (Lutz and Splendore, 1908; Krüger, 1956; Görtz, 1987; Fokin *et al.*, 2008; Yakovleva *et al.*, 2020), gregarines (Codreanu-Balcescu and Codreanu, 1976; Rühl and Korn, 1979), unicellular cnidarians (Morris and Freeman, 2010) and rotifers (Gorbunov and Kosova, 2001; Wolska and Mazurkiewicz-Zapalowicz, 2013). Most of these observations are based on light microscopy and/or transmission electron microscopy therefore allowing only morphological descriptions. By now, only two microsporidian species parasitizing protists in brackish and river ecosystems are characterized by morphological and molecular approaches (*i.e.* 18S rDNA sequences): *Euplotespora binucleata* and *Globosporidium paramecii* parasitizing the ciliates

Euplotes woodruffi and *Paramecium aurelia*, respectively (Fokin *et al.*, 2008; Yakovleva *et al.*, 2020). Thus, the global diversity of Microsporidia in aquatic ecosystems is largely unknown, especially in small sized hosts (*i.e.* <150 µm).

A first metabarcoding analysis revealed an important diversity of Microsporidia, of which about 50% could not be affiliated to a genus and about 25% not to a family (Dubuffet *et al.*, 2021). We hypothesized that some of these Microsporidia may infect understudied hosts, such as protists or microzooplankton. To test this hypothesis, we studied in parallel the diversity of Microsporidia and other eukaryotes, as well as their variations over a year in a lake ecosystem, using a targeted metabarcoding approach, focusing on fractions containing small sized hosts. Potential new host–microsporidian interactions were searched through co-occurrence network analysis based on metabarcoding data, as well as through a tyramide signal amplification-fluorescent *in situ* hybridization (TSA-FISH) approach.

III. Experimental procedures

1. Study site and sampling procedure

The study was conducted in lake Aydat (Massif Central, France, 45° 39' 50'' N, 2° 59' 04'' E). It is a dimictic and eutrophic lake with a maximum depth of 15 m, situated at an altitude of 825 m and a recreative lake in summer. From 19/11/18 to 07/01/20 water samples were collected in the euphotic zone of the lake at a permanent station located at the deepest zone of the water column using an integrated sampler IWS III (HYDRO-BIOS, Altenholz, Germany) (see Supplementary Information 1 for a global view of the experimental design). Sampling was performed monthly, except from 27 May to 20 June 2019 when it was done twice a week. Temperature and dissolved oxygen were measured along the water column using an oxycal-SL 197 multiparameter probe (WWT, Limonest, France). Phytoplankton biomass was estimated using a submersible fluorescence photometer (Fluoroprobe; BBE-Moldaenke, Kiel, Germany) (see Supplementary Information 2 for temperature, oxygen and phytoplankton biomass data). The 14 l of water sampled were filtered successively through 150 µm and 10 µm pore-size filters in order to concentrate Microsporidia spores (<10 µm fraction, microsporidian spores being mainly <10 µm in length; Murareanu *et al.*, 2021) and planktonic species susceptible to host Microsporidia (10–150 µm fraction). Part of the microbial biomass of each size-fraction was collected on 0.8-µm-pore-size polycarbonate filters (Millipore, Burlington, MA) at a very

low vacuum to prevent cell damage (<15 kPa) and stored at -80°C until nucleic acids extraction (dry-stored filters for DNA extraction, in RLT buffer (RNeasy Mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) with 1% 2-mercaptoethanol for RNA extraction). Two filters were produced and subsequently processed for each sample (Supplementary Information 1). The other part of the microbial biomass obtained was fixed with paraformaldehyde (final concentration, 2%) and incubated at 4°C for 24 h. Fixed cells were then collected on 0.8-µm-pore-size polycarbonate filters (Millipore; pressure < 15 kPa). Filters were preserved by dehydration in an ethanol series (50%, 80%, and 100% ethanol for 3 min each) and stored at -20°C until TSA-FISH staining.

2. Nucleic acids extraction, amplification and sequencing

Filters prepared for DNA extraction were processed as described in the study by Dubuffet *et al.* (2021), while filters prepared for RNA extraction were processed with the RNeasy Mini kit with some modifications. Samples underwent a first grinding of three cycles, 30 Hz 30 s (Bead Beater Retsch, Haan, Germany), the supernatant was kept. Then 400 µl of RLT buffer with 1% 2-mercaptoéthanol and 0.1 g of 0.1 mm glass beads (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) were added and a second grinding was carried out under the same conditions, the supernatant was pooled with the first one. Protocol was then carried out according to the manufacturer's recommendations, with a triple treatment with DNase I. RNA was finally eluted in 30 µl of RNase free water. Quality and quantity of RNA were analysed with the RNA screen Tape kit and the 2200 Tape station (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and absence of DNA was checked by PCR. cDNA was obtained by reverse transcription with SuperScript III and randoms primers (Invitrogen, Waltham, MA) according to the manufacturer's recommendations.

Amplification of the V1–V3 region of the microsporidian gene coding for the 18S rRNA was performed using the universal microsporidian V1F (CACCAGGTTGATTCT GCCTGAC) and 530R (CCGCGGCTGCTGGCAC) primers set (Baker *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1994). Each PCR was performed in a total volume of 30 µl containing 6 µl of 5X Green GoTaq Flexi buffer, 2.4 µl of 25 mM MgCl₂, 0.18 µl of GoTaqG2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, 5 Uµl⁻¹), 0.6 µl of 10mM each dNTP, 0.3 µl of 50 mg mL⁻¹ BSA and 0.6 µl of each 10 µM primer. The amplification conditions consisted of initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 35 cycles for 1 min at 95°C, 1 min 30 s at 62°C and 1 min 30 s at 72°C, and a final elongation of 7 min at 72°C.

Amplification of the V4 region of total eukaryotes (excluding Microsporidia) was performed using the universal primer 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTA) (Caporaso *et al.*, 2011) and the eukaryotic primer 951R (TTGGYRAATGCTTTCGC) (Mangot *et al.*, 2013). Each PCR was performed in the mix described above. The amplification conditions consisted of initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 33 cycles for 1 min at 95°C, 1 min at 55°C and 1 min 30 s at 72°C, and a final elongation of 10 min at 72°C.

The amplicons were purified and concentrated using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). Samples were then sequenced on a MiSeq Illumina instrument (2 x 250 bp) (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France).

3. Amplicon analysis and taxonomic affiliation

The PANAM2 (Phylogenetic Analysis of Next-generation AMplicons v2 – <https://github.com/meb-team/PANAM2>) pipeline (Taib *et al.*, 2013) was used to process the sequencing data. The clean-up procedures consisted of eliminating sequences with ambiguous ‘N’ bases, those below 200 bp and chimeras. The sequences were then assembled and clustered into operational taxonomic units (OTUs) with a similarity threshold of 99% for Microsporidia (Dubuffet *et al.*, 2021) and 95% for other eukaryotes (Mangot *et al.*, 2013; Debroas *et al.*, 2017). Finally, representative sequences of each OTU were affiliated by similarity and phylogeny using a custom curated reference database (Freshwater-database: <https://github.com/panammeb/Freshwater-database>). This database contains eukaryote references sequences extracted from the SSU Ref SILVA database (Pruesse *et al.*, 2007), typical freshwater lineages identified in previous studies (*e.g.* Debroas *et al.*, 2015) and 528 sequences of 265 microsporidian species phylogenetically classified into clades, groups and genera (Dubuffet *et al.*, 2021).

For Microsporidia, affiliations to groups and genera were considered as valid when the identity scores were above 85% and 94.5%, respectively (Dubuffet *et al.*, 2021). As clustering threshold used (especially for Microsporidia, *i.e.* 99%) may generate OTUs resulting from sequencing errors, we only kept for the final analysis OTUs representing more than 0.005% (Bokulich *et al.*, 2013) of the total reads and OTUs present in at least two samples. Data were normalized using the SRS (scaling with ranked subsampling) method (Beule and Karlovsky, 2020).

4. Phylogenetic analysis of OTUs non-affiliated beyond the clade

All microsporidian OTUs obtained in this analysis were assigned at least to a clade, 78% to a group and 61% to a genus. We therefore performed phylogenetic analyses on OTUs non-affiliated beyond the clade (including those with identity scores below 85%) or beyond the group (including those with identity scores below 94.5%) in order to determine whether new groups (which roughly correspond to families) or new subgroups (similar to genera) could be highlighted. We focused our analyses on abundant OTUs (>500 reads, 619 OTUs), which represent 91% of the total reads. We included in these analyses several sequences from undescribed microsporidian species (found through BLAST search and/or bibliographic review), in addition to species from the database previously used. After an alignment using the MAFFT algorithm (Kato *et al.*, 2005), ML trees were obtained using a general time-reversible (GTR) model of evolution with gamma-distributed rate heterogeneity (G) and a proportion of invariable sites (I) (GTR + G + I), with 200 bootstrap replications and partial deletion (85%), using MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

5. Diversity analyses

The rRNA:rDNA ratio was calculated for each OTU by dividing the number of RNA reads by the number of DNA reads. Diversity analyses were performed using R (R Development Core Team, 2012). Community richness and diversity indices (Richness observed, Chao1, Shannon and Simpson) were used to infer the taxa richness of Microsporidia. These estimators were computed with the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013) as well as the non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination based on a Bray–Curtis dissimilarity matrix (Bray and Curtis, 1957; Paliy and Shankar, 2016). To investigate the potential relationships between the microsporidian community composition and biotic and abiotic factors, canonical correspondence analysis (CCA) was used (ter Braak, 1986) with the vegan package (Oksanen *et al.*, 2020).

6. Co-occurrence network

Using statistical tools, co-occurrence networks are used to detect *in situ* associations between micro-organisms (Chaffron *et al.*, 2010, Lima-Mendez *et al.*, 2015). We therefore used this approach to depict potential host-parasite associations between Microsporidia and other eukaryotes. We focused the analysis on the large size fraction (10–150 μm , 40 samples) which might contain Microsporidia associated with potential new hosts among zooplankton and protists. DNA and RNA samples were used in order to have a sufficient number of samples. OTUs with a total abundance higher than 0.05% (206 microsporidian and 148 eukaryotic OTUs) were grouped and analysed to build a co-occurrence network with SPIEC-EASI (SParse Inverse Covariance Estimation for Ecological Association Inference; Kurtz *et al.*, 2015). Raw data were used (before normalization), as the SpiecEasi function includes a standardization step (centered log-ratio transformation) to alleviate compositionality bias (Aitchison, 1981). The co-occurrence network was inferred using the neighbourhood selection (Meinshausen and Bühlmann, 2006). We used the SPIEC-EASI parameters determined as those generating the sparser graphs by Benoiston (2019). Thus, the scaling factor (λ .min.ratio) was set at 0.001, the number of tested λ (nlambda) was set as 20 and the number of StARS subsamples (rep.num) was set to 20. In this network, OTUs are represented by nodes and a positive association between OTUs are represented by edges between them (only positive associations were kept in the output graph). Positive edges identified were extracted to visualize only associations between microsporidian genera/subgroups and eukaryotic phyla with a Sankey diagram using the networkD3 package on R (R Development Core Team, 2012; Allaire *et al.*, 2017).

7. Tyramide signal amplification-fluorescent *in situ* hybridization

To visualize potential microsporidian–hosts associations, TSA-FISH was performed, using a probe designed to target all the microsporidian OTUs identified in this metabarcoding analysis (USP01 probe, 5' GTCAGGCAGAATCAACCTGG 3'). Hybridization conditions were determined beforehand on two microsporidian species cultured in the laboratory: *Anncaliia algerae* and *Encephalitozoon cuniculi*. The former was considered as a non-target species, as it had one mismatch with the USP01 probe, while the later was a target species (no mismatches).

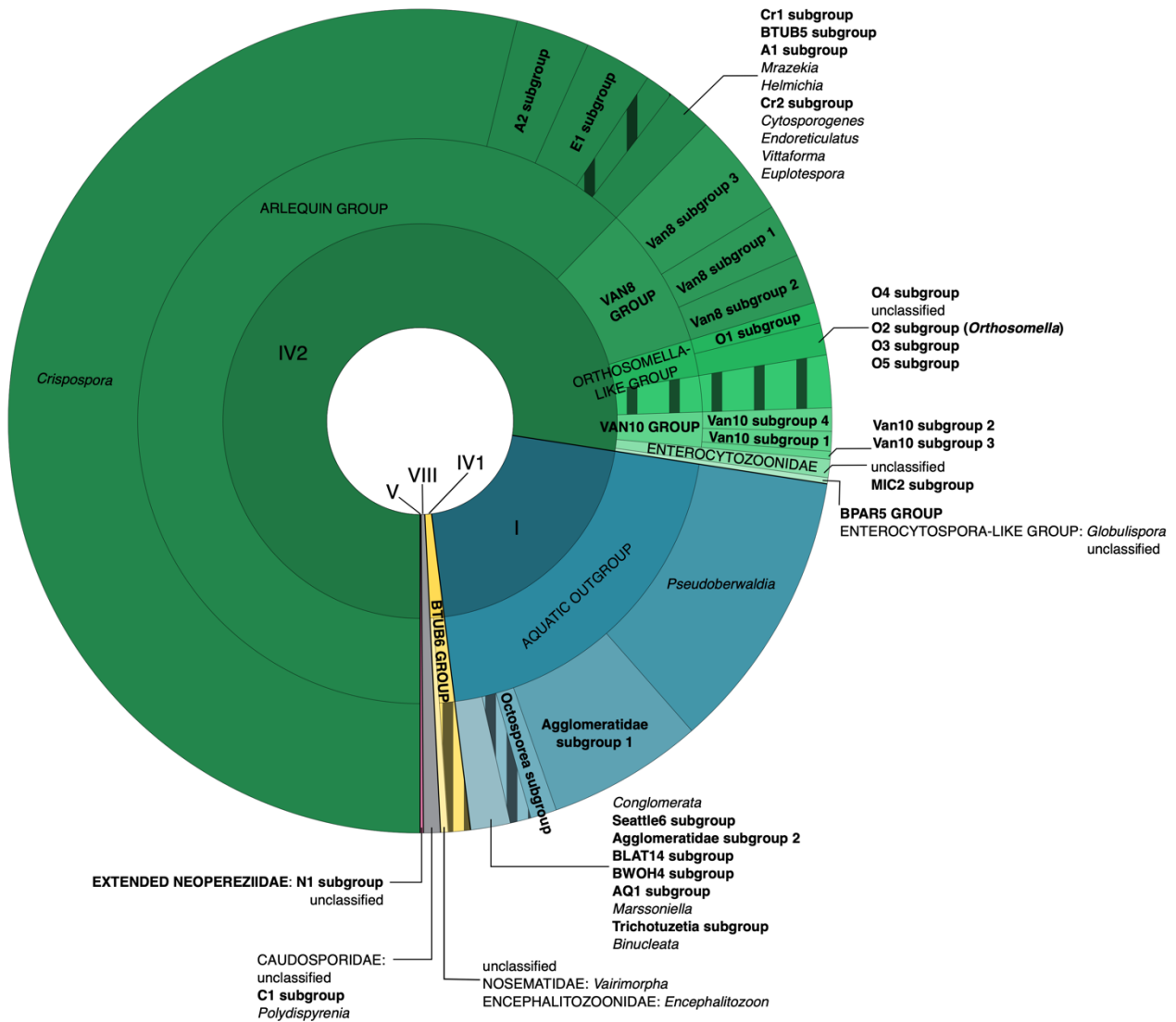


Figure 27: Taxonomic affiliation of the microsporidian OTUs (DNA and RNA samples).

Inner circle represents clades (IV2, I, IV1, VIII and V). Deeper taxonomic ranks (groups and genera/subgroups) are presented in outer circles. Group names are given in capital letters and genera names in italic. Groups and subgroups defined during phylogenetic analyses are given in bold. Hatched patterns represent OTUs unaffiliated beyond the group or clade. Genera/subgroups listed are ranked from most to least abundant. See Supplementary Information 5 for the taxonomic affiliation of the microsporidian OTUs following the analysis on PANAM2 (before the phylogenetic analyses).

At 45°C and 10% deionized formamide, *in situ* hybridization signals were obtained on the target species and not on the non-target species (not shown), and these hybridization conditions were thus retained.

TSA-FISH was performed on each sample (22 sampling dates) of the large size fraction, in duplicate, as described in the study by Lepère *et al.* (2016) with the following modifications: hybridization buffer (10% deionized formamide), hybridization at 45°C overnight, washing steps at 47°C with washing buffer (450 mM NaCl, 0.01% sodium dodecyl sulfate, 20 mM Tris–HCl [pH 7.5]). The filters were mounted in a mixture containing antifading reagent AF1 (Citifluor; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), Vectashield fluorescent mounting medium (Vector laboratories, Burlingame, CA) and 40,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Hybridized cells were visualized under two fluorescence microscopes: Leica DM IRB (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and Zeiss Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

IV. Results

1. Microsporidian diversity

A total of 1 472 OTUs were obtained from 2 874 995 18S rRNA gene sequencing reads (1 080 350 reads after normalization). Three samples were removed because of their low reads number (<12 400) and poor representation of the diversity: 20/02/19-0.8/10-RNA, 06/05/19-10/150-RNA and 29/07/19-10/150-DNA, resulting in a dataset of 85 samples.

On average, 33 823 reads were obtained per sample and the rarefaction curves showed that a plateau was reached for most of the samples (Supplementary Information 3). Microsporidia α -diversity varied among samples, the highest diversity being recorded in the 0.8–10 μ m size fraction (Supplementary Information 4). Despite a high number of OTUs, the microsporidian community was clearly dominated by a low number of dominant OTUs, since 14 OTUs represented more than 50% of the total reads.

OTUs obtained in this study belonged to the canonical Microsporidia and were affiliated at least to a clade (which roughly correspond to the class rank, Vossbrinck *et al.*, 2014) after the first taxonomic affiliation (*i.e.* implemented in PANAM2 pipeline). Among the 10 clades defined in the study by Dubuffet *et al.* (2021) for canonical Microsporidia (from clade I to clade IX, clade IV considered as a ‘super-clade’ and being divided in two clades), our OTUs were distributed

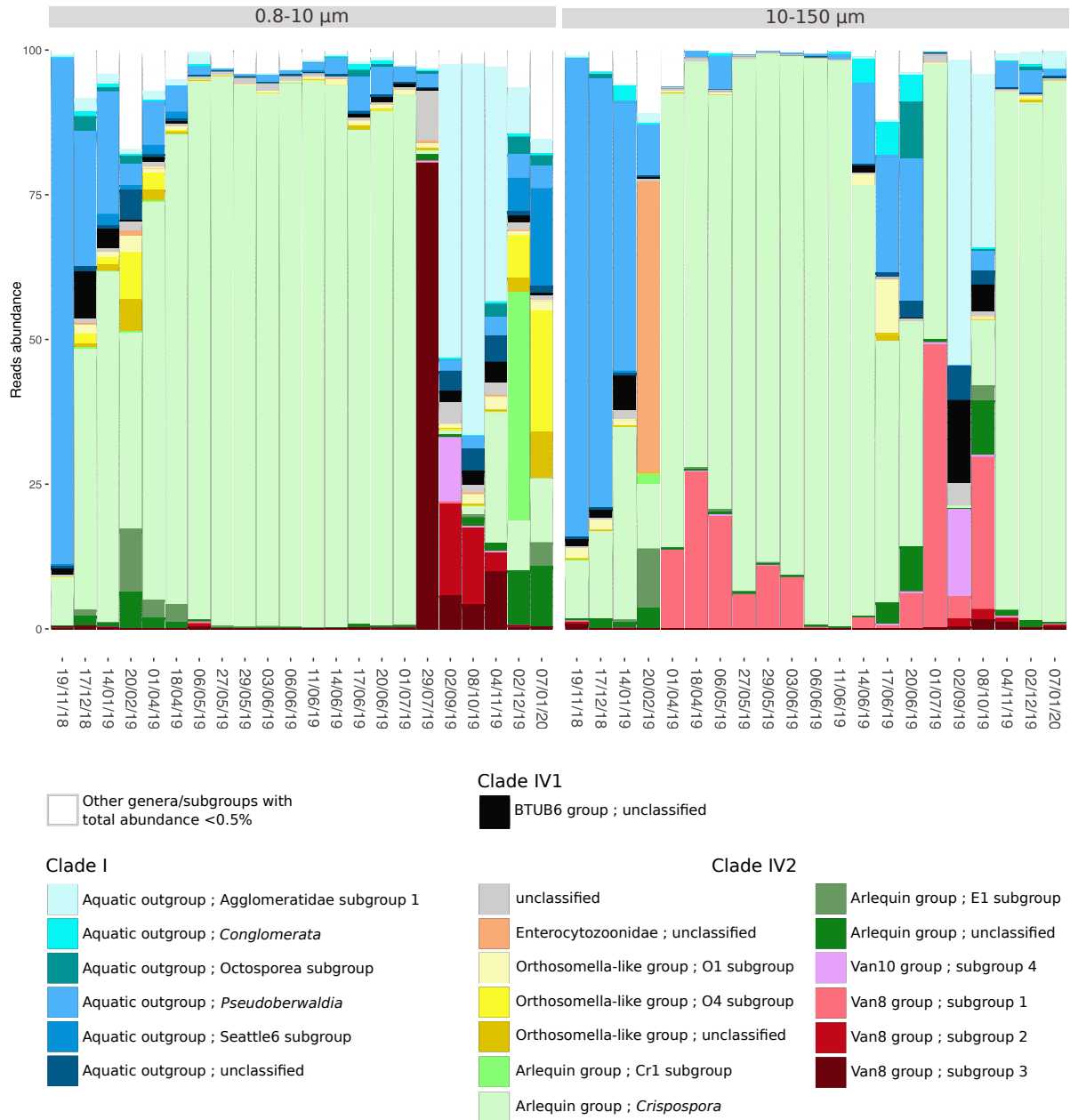


Figure 28: Relative abundances of the most abundant (>0.5% of the total reads) microsporidian genera/subgroups across DNA samples.

The white zone on the top of each bar represents the cumulative proportion of other genera/subgroups with low abundances. Label = sampling date (DD/MM/YY), from 19/11/18 (left) to 07/01/20 (right) with a monthly sampling and additional sampling every 3–5 days in May and June 2019. See Supplementary Information 13 for relative abundances of the less abundant (<0.5% of the total reads) microsporidian genera/subgroups across samples.

in five clades: I, IV1, IV2, V, and VIII. The microsporidian community was clearly dominated by clades IV2 and I, which represented, respectively, 80.6% (77.4% reads) and 16.6% (20.6% reads) of the OTUs. The remaining OTUs were classified into clades IV1: 2% (1.2% reads), V: 0.4% (0.1% reads) and VIII: 0.3% (0.7% reads) (**Fig. 27**, Supplementary Information 5).

Within the five clades, eight groups (which mostly correspond to families, Dubuffet *et al.*, 2021) were identified following the analysis on PANAM2. Two of them accounted for 74% of the OTUs (83% of the reads): Aquatic outgroup (clade I, 16.6% OTUs, 20.6% reads) and Arlequin group (clade IV2, 57.3% OTUs, 62.2% reads) (**Fig. 27**, Supplementary Information 5). Among OTUs assigned to a genus, *Crispospora* (50.0% OTUs, 53.8% reads) and *Pseudoberwaldia* (7.5% OTUs, 11.1% reads) were the most represented (**Fig. 27**, Supplementary Information 5). However, 39% of the OTUs were not assigned to a genus and 22% not even to a group following the analysis on PANAM2 (Supplementary Information 5). We therefore performed phylogenetic analyses on these OTUs, focusing on the most abundant (>500 reads) (Supplementary Information 6). These analyses placed these OTUs into five new groups previously identified in the study by Dubuffet *et al.* (2021). Three of these new groups (Van8, Van10 and BPAR5) (**Fig. 27**) represent a significant portion of the observed diversity. The Van8 group, for example, represented 9.5% of the reads, and up to 90% of the reads in one sample (29/07/19-0.8/10-RNA). We furthermore identified several subgroups (proxies for genera) within both the known and new groups (Supplementary Information 6).

2. Variations of the microsporidian diversity

No significant differences were observed in the composition of the DNA and RNA samples (Supplementary Information 7); 95% of OTUs were shared by both types of samples. Only 48 and 32 OTUs were specific to DNA and RNA samples, respectively (these OTUs representing at most 0.08% of total reads). The mean rRNA:rDNA ratio computed for each OTU was 7.3, which suggests that much of the diversity discovered was active (*i.e.* rRNA:rDNA ratio > 1). Variations in the relative abundances of some taxa were however recorded between size fractions and across time (**Fig. 28**). For the size fractions, no major differences in the community composition were recorded at the group level. However, for the same sampling dates, some genera/subgroups showed considerable differences between the two size fractions (**Fig. 28**). Within the Van8 group, for example, the subgroup1 was almost exclusively found in the large size fraction, sometimes with high abundance (*e.g.* 50% of the reads in the sample

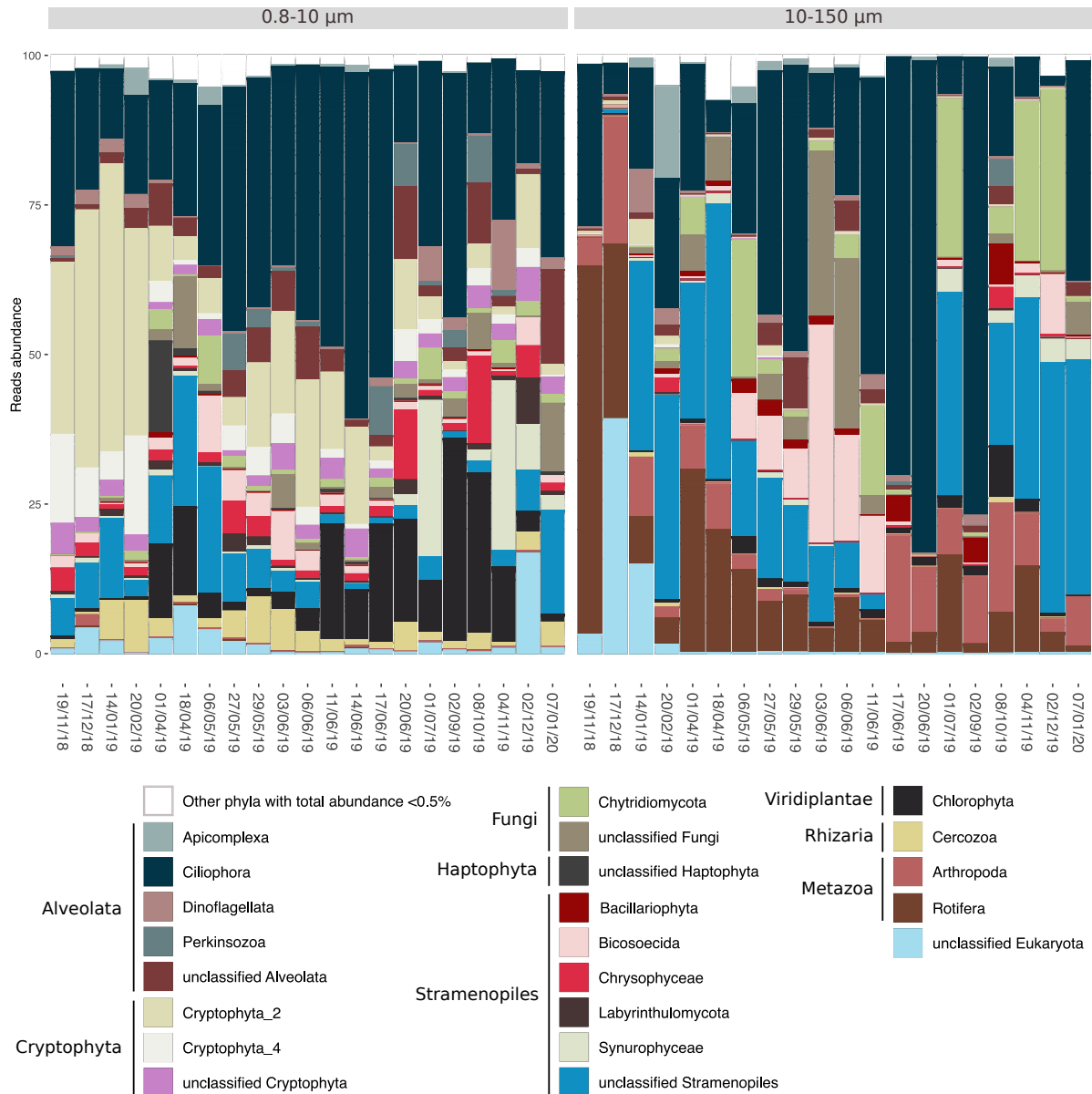


Figure 29: Relative abundances of the most abundant (>0.5% of the total reads) eukaryotic phyla across DNA samples.

The white zone on the top of each bar represents the cumulative proportion of other phyla with low abundances. Label = sampling date (DD/MM/YY), from 19/11/18 (left) to 07/01/20 (right) with a monthly sampling and additional sampling every 3–5 days in May and June 2019. See Supplementary Information 14 for relative abundances of the less abundant (<0.5% of the total reads) eukaryotic phyla across samples.

01/07/19). Subgroups 2 and 3, on the other hand, were mostly found in the small size fraction (**Fig. 28**).

Regarding variations across time, the composition of microsporidian communities greatly changed between two close sampling dates, from the clade to the genus/ subgroup level. In the small size fraction, for example, the sample 01/07/19 was greatly dominated by the genus *Crispospora*, while the sample 29/07/19 was composed at 80% of the ‘Van8 group; subgroup 3’ (**Fig. 28**). Some genera/subgroups seemed abundant for a particular period (e.g. ‘Van8 group; subgroup 3’ between late July and November) or even at a single sampling date (‘Arlequin group; Cr1 subgroup’: 02/12/19), while others showed a saw-toothed abundance over the year (e.g. ‘Van8 group; subgroup 1’) (**Fig. 28**). At the OTUs level, considerable variations across time could also be observed. Indeed, more than 50% of the reads were represented by two or three OTUs in several samples, with temporal variations in these dominant OTUs (Supplementary Information 8).

3. Eukaryotic diversity

In the eukaryotic dataset, four samples were removed because of their low reads number (<12 400) and poor representation of the diversity: 18/04/19-10/150-RNA, 14/06/19-10/150-DNA, 29/07/19-0.8/10-DNA and 29/07/19-10/150-DNA, resulting in a dataset of 84 samples. A total of 631 OTUs were obtained from 3 158 730 18S rRNA gene sequencing reads (1 044 624 reads after normalization).

In terms of OTUs number, the main taxonomic groups were the Stramenopiles (238 OTUs), Alveolata (141) and Viridiplantae (59). If we consider the read abundance, the dominant groups were the Alveolata (33.3% of the reads), Stramenopiles (31%) and Metazoa (10.5%). The eukaryotic community was clearly dominated by the ciliates (Alveolata), which represented almost 30% of the reads (**Fig. 29**). The Cryptophyta (Cryptophyceae), Rotifera (Metazoa) and Chlorophyta (Viridiplantae) were also abundant with 9.7%, 6.3% and 5.4% of the reads, respectively. Considerable differences in the eukaryotic community were identified between the two different size fractions. For example, rotifers and arthropods were almost exclusively found in the large size fraction. Diatoms and chytrids were also more abundant in the 10–150 µm fraction. On the opposite, some phyla were mostly found in the small size fraction as Cryptophyta, Chlorophyta, Cercozoa and Chrysophyceae (**Fig. 29**). Variations in the eukaryotic communities were also identified across time. Ciliates, for example, occur in all samples but

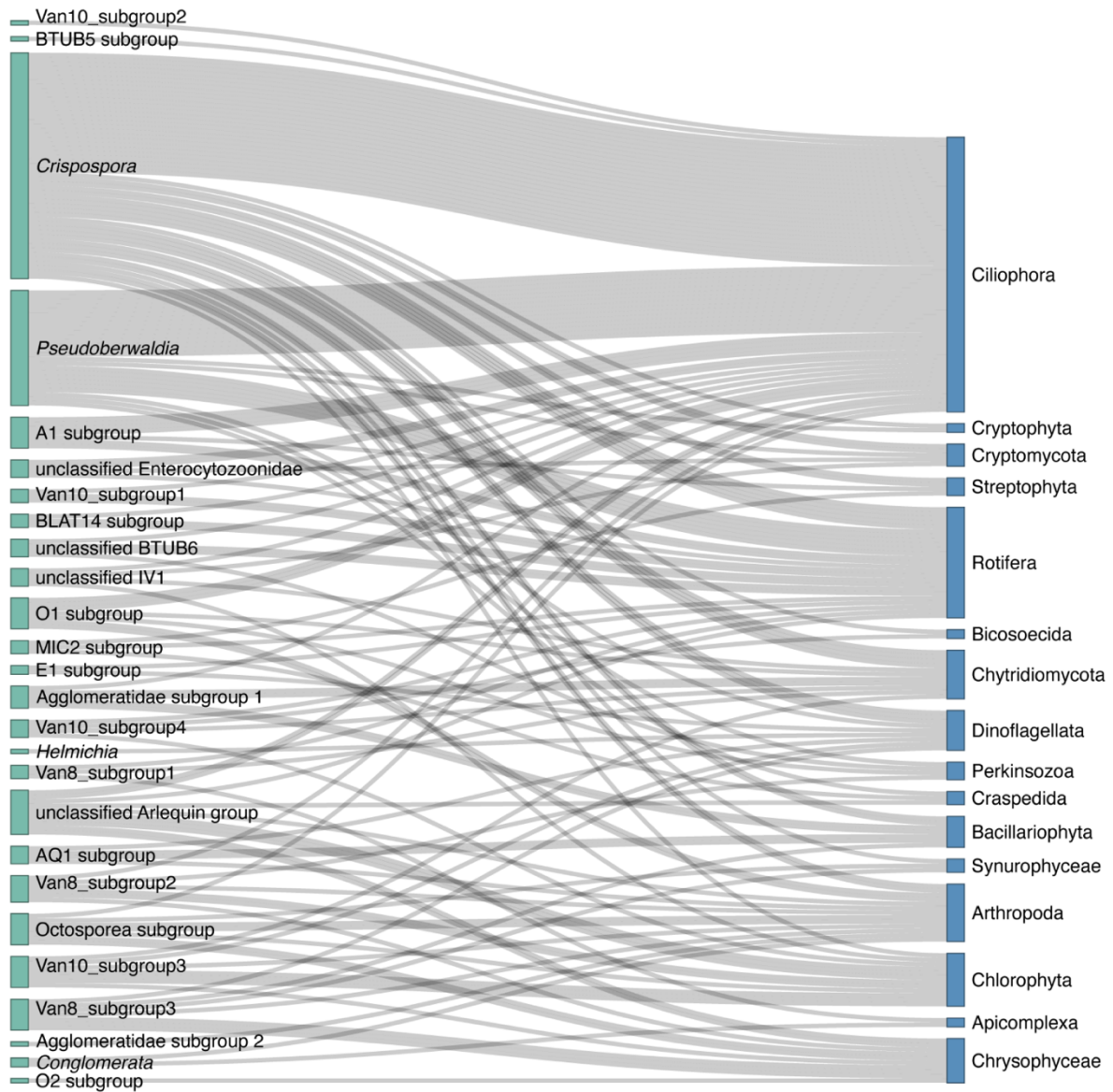


Figure 30: Sankey diagram showing the edges between microsporidian OTUs (left) and eukaryotic OTUs (right) in the co-occurrence network.

Microsporidian OTUs are grouped by genus/subgroup, eukaryotic OTUs are grouped by phylum or class. 88 microsporidian OTUs and 98 eukaryotic OTUs were involved in the network with 213 positive associations (edges). One line represents one edge from the co-occurrence graph. Co-occurrences involving eukaryotic OTUs not affiliated to a phylum are not shown.

were particularly abundant during spring and summer, whereas the Cryptophyta were mostly found during winter and spring. Other phyla were identified with variations throughout the sampling period but without any pattern, such as the Chrysophyceae, the arthropods and the rotifers. The latter were, however, sometimes really abundant as in the sample 19/11/18 (large size fraction) representing 61.5% of the reads (**Fig. 29**).

4. Co-occurrence networks

In order to suggest potential host–parasite relationships, eukaryotic and microsporidian OTUs with a total abundance higher than 0.05% were used to build a co-occurrence network. A total of 1 640 associations were identified of which 1 324 (80.7%) were positive, in a simple connected network (only one component). We focused our analysis on positive edges only, as Microsporidia are obligate intracellular parasites, this requiring the simultaneous presence of both partners (Supplementary Information 9). Therefore, only positive edges between Microsporidia and eukaryotes were further considered, resulting in 88 microsporidian and 98 eukaryotic OTUs with 206 positive associations represented in the Sankey diagram (**Fig. 30**). Microsporidia co-occurred mainly with Ciliophora, Rotifera and Arthropoda, these three phyla being included in almost 50% of the associations. The two most abundant genera of Microsporidia, *Crispospora* and *Pseudoberwaldia*, were notably found to co-occur mainly with Ciliophora (46% and 42% of the associations, respectively). To a lesser extent, associations were also found with other eukaryotes including Chytridiomycota, Dinoflagellata, Bacillariophyta (diatoms), Chlorophyta and Chrysophyceae (**Fig. 30**). Among the new groups defined in the study by Dubuffet *et al.* (2021), the Van8 group (clade IV2) showed 16 associations with 11 eukaryotic taxa (about one third of these associations being with Chrysophyceae) and the Van10 group (clade IV2) showed 15 associations with 8 eukaryotic taxa (mostly with Chlorophyta and Rotifera) (**Fig. 30**) (see Supplementary Information 10 for a detailed table of the number of associations).

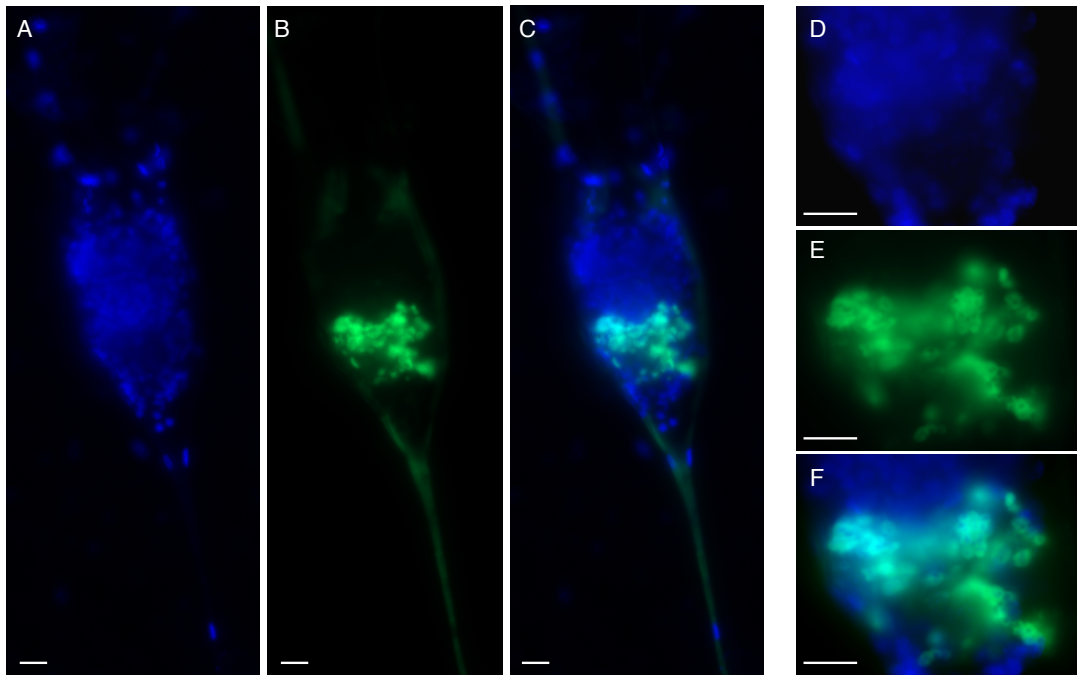


Figure 31: Microsporidia (targeted by TSA-FISH with the USP01 probe) infecting a rotifer (genus *Kellicottia*).

Under UV showing nucleus after DAPI staining (A), under blue light showing Microsporidia in green fluorescence (B), overlay (C). Magnification on microsporidian cells inside the rotifer [UV (D), blue light (E), overlay (F)]. Scale bars, 10 µm.

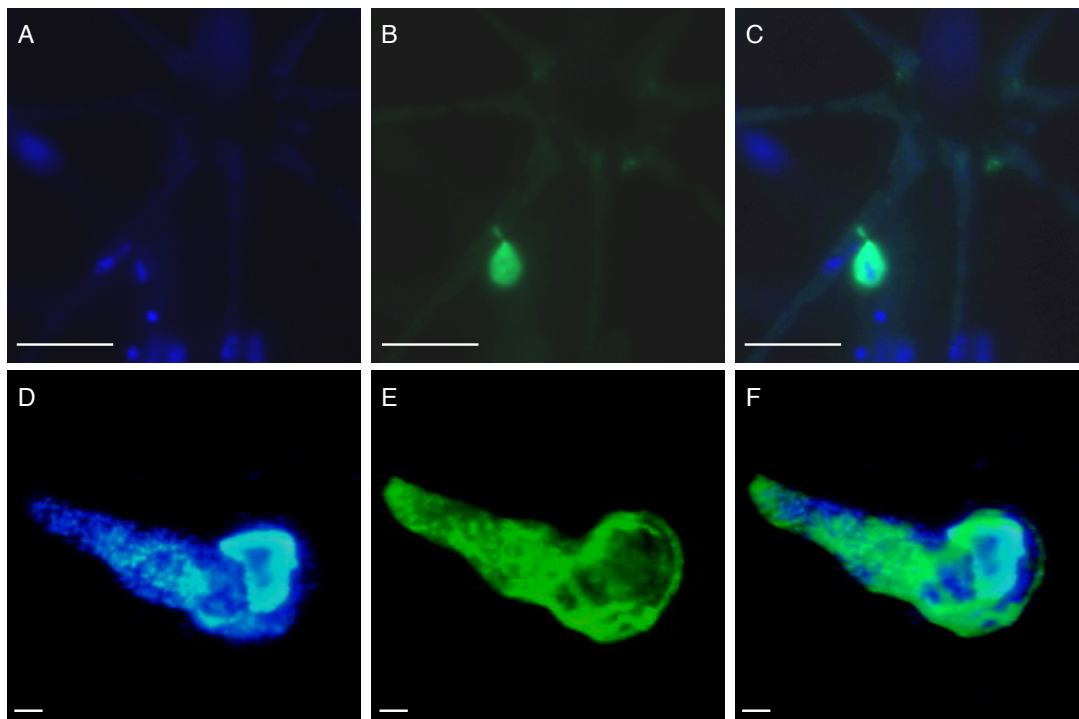


Figure 32: Microsporidia (targeted by TSA-FISH with the USP01 probe) attached to a diatom (genus *Asterionella*) (A–C) and infecting a ciliate (genus *Stentor*) (D–F).

Under UV showing nucleus after DAPI staining (A,D), under blue light showing Microsporidia in green fluorescence (B,E), overlay (C,F). Scale bars, 10 µm.

5. TSA-FISH

TSA-FISH was used to confirm potential host–parasite associations between Microsporidia and planktonic eukaryotes (<150 µm) highlighted by the co-occurrence network. All samples (10–150µm size fraction) were screened with the USP01 probe, targeting all the Microsporidia recovered in the current analysis. Positive signals were observed inside rotifers identified as belonging to the genus *Kellicottia* by morphological observations (**Fig. 31**). This association was observed at four different dates (27/05/19, 06/06/19, 14/06/19 and 17/06/19) and the prevalence of potentially parasitized *Kellicottia* reached 50% (27/05/19) with a mean value of 38%.

TSA-FISH also allowed the observation of positive signals on cells attached to diatoms (genus *Asterionella*) (**Fig. 32A–C**) at five different dates (18/04/19, 08/10/19, 04/11/19, 02/12/19, 07/01/20). However due to a high abundance of *Asterionella* at these dates, the prevalence was always <0.1%.

Moreover, a single observation (17/06/19 in the large size fraction) shows positive signals inside a ciliate identified as belonging to the genus *Stentor* by morphological observations (**Fig. 32D–F**).

Finally, other positive signals were observed, but the potentially infected hosts could not be identified (Supplementary Information 11).

V. Discussion

So far, few studies have investigated the diversity of Microsporidia in environmental samples. A cloning-sequencing study (Ardila-Garcia *et al.*, 2013) and a metabarcoding study (Williams *et al.*, 2018) presented a first description of this diversity, mostly in terrestrial and marine environments. However, due to a low number of reads, a limited comparison of Microsporidia communities between different sites was made, and variation of the microsporidian diversity through time was not evaluated. In a more recent metabarcoding analysis, an important microsporidian diversity was revealed in lacustrine environments, with more than 1 500 OTUs distributed across seven of the ten clades defined for canonical Microsporidia (Dubuffet *et al.*, 2021) and several new groups (and probable new families and/or genera) were discovered. The diversity of Microsporidia in lake Aydat studied here, over one year, was of the same order of

magnitude with 1 472 microsporidian OTUs identified. Besides, except two clades weakly represented in the study by Dubuffet *et al.* (2021), the same clades (I, IV1, IV2, V, VIII) were recovered. Similarly to the previous study, most of the OTUs were affiliated to clade IV2 and clade I, and most of the groups identified were also found in the study by Dubuffet *et al.* (2021) with the exception of OTUs belonging to the Enterocytozoonidae, which appear almost only in February in our study. Among OTUs assigned to a genus, *Crispospora* and *Pseudoberwaldia* were the most represented. These two genera are described as parasites of aquatic hosts (daphnia for *Pseudoberwaldia*; Vavra *et al.*, 2019) or hosts having at least one aquatic development stage (chironomids for *Crispospora*; Tokarev *et al.*, 2010). Chironomids eggs and larvae are highly abundant in lake environments, especially when they are eutrophic and anthropized (Langdon *et al.*, 2006) such as lake Aydat, which could explain the abundance of Microsporidia assigned to *Crispospora*.

The new groups previously identified in the study by Dubuffet *et al.* (2021) and also found in this study represented a non-negligible part of the microsporidian diversity as they correspond to 10% of the OTUs included in our phylogenetic analyses, suggesting that a significant proportion of microsporidian groups/families and subgroups/genera remain to be studied. This unknown part of the Microsporidia diversity could correspond to parasites of small hosts (protists, microzooplankton), which currently represent only a small proportion of the microsporidian hosts described.

Between the two size fractions (0.8–10 and 10–150 μm) studied, moderate differences were observed at the finest taxonomic levels (genus/subgroup). Indeed, ‘Van8 group; subgroup 2’, ‘Van8 group; subgroup 3’ and ‘*Orthosomella*-like group; O4 subgroup’ were found almost exclusively in the small size fraction and ‘Van8 group; subgroup 1’ in the large size fraction. Such differences might be explained by the spore sizes, or the type of host parasitized. Indeed, the former could be $<10 \mu\text{m}$ in size and/or infect only small hosts (assuming that Microsporidia could parasitize host $<10 \mu\text{m}$), and the latter could be large (some spores having a size $>10 \mu\text{m}$, Vavra and Larsson, 2014) and/or infect hosts larger than $10 \mu\text{m}$. But as no species has been morphologically described in these subgroups, we know nothing about the size of their spores. However, we know the size of some of the Microsporidia found in this study. *Crispospora chironomi*, for example, has spores of $2.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ size, which can be released in 20–30 μm thick wall capsules (Tokarev *et al.*, 2010). This is thus not surprising to find this genus in the two size fractions. *Pseudoberwaldia* are released as free spores from infected daphnia (spore size $4.4 \times 2.6 \mu\text{m}$; Vavra *et al.*, 2019). The presence of this genus in 10–150 μm fraction thus

raises the hypothesis that these Microsporidia were associated with other eukaryotes (such as protists or microzooplankton), either being passively ingested or infecting them. This could also support the hypothesis of a secondary host as suspected for *Pseudoberwaldia* species (Vavra *et al.*, 2019).

More striking differences were observed across time (**Fig. 28**). These variations in diversity identified over time were, for some, similar to those identified by Dubuffet *et al.* (2021). For example, abundances of *Conglomerata* and *Pseudoberwaldia* increased in June in our study, as observed in the same lake between April and June 2016.

Such variations might be directly linked to environmental variables which could influence infection cycles or transmission efficiency of the parasite, as already shown for various parasites found in aquatic ecosystems (Cable *et al.*, 2017). These environmental variables could also affect indirectly the parasite by influencing their host populations density and distribution, as Microsporidia have generally a narrow host specificity (Murareanu *et al.*, 2021). The relationship between the different environmental variables [temperature, oxygen and photosynthetic pigment concentration (green algae, Cyanobacteria, diatoms, Cryptophyta)] and the distribution of the different microsporidian subgroups/genera was tested, and only oxygen and diatoms abundance were found to be significant (Supplementary Information 12 and 2). *In vitro* analyses showed that various parameters, including local changes in pH, salt concentration, UV radiation and temperature, could promote or inhibit the devagination of the polar tube and spore discharge, and therefore impact infection rates (Weiss *et al.*, 2014). However, it is not known whether such variables may influence directly Microsporidia in their environment, thus influencing their distribution. Regarding the potential hosts, such as zooplankton or protists, some can show considerable temporal variations in lake ecosystems (Lair, 1990; Lepère *et al.*, 2006) which could more likely explain the microsporidian variations observed here. In this study, we also identified important temporal variations among eukaryotic phyla such as the ciliates, rotifers and various phytoplanktonic phyla (**Fig. 29**).

Identifying the hosts of these Microsporidia then seems to be an essential step in the understanding of the microsporidian community variations over time. One approach to unravel these host–Microsporidia potential interactions is to use co-occurrence network analyses, which arguably provides the most exhaustive method for attempting to holistically assess community interactions (Fath *et al.*, 2007). Using statistical tools, co-occurrence networks allow the highlighting of potential associations between microorganisms (Chaffron *et al.*, 2010; Lima-

Mendez *et al.*, 2015), although this type of analyses do not ensure discovery of biotic interactions (Blanchet *et al.*, 2020). Furthermore, potential associations predicted bioinformatically are informative and useful to reduce the number of hypotheses that might be tested but will always require an experimental validation of the interaction (Carr *et al.*, 2019). SPIEC-EASI method builds microbial networks avoiding spurious associations resulting from the application of correlation measures and has been used to predict previously unknown microbial associations (Kurtz *et al.*, 2015).

Using this method, diverse and various potential associations between Microsporidia and eukaryotes have been revealed (**Fig. 30**, Supplementary Information 9). Half of these potential associations involved eukaryotic phyla already identified as Microsporidia hosts: Ciliophora, Apicomplexa, Arthropoda and Rotifera (Murareanu *et al.*, 2021). Among these, several co-occurrences identified genera already described as hosts for Microsporidia: 10 co-occurrences with the ciliate genera *Vorticella*, *Frontonia* and *Stentor* (Görtz, 1987; Fokin *et al.*, 2008), four associations with the rotifer genus *Brachionus* (Gorbunov and Kosova, 2001; Wolska and Mazurkiewicz-Zapalowicz, 2013) and 10 co-occurrences with arthropods belonging to the order Cyclopoida (Stentiford *et al.*, 2013). Co-occurrences were also observed with other phyla which have so far never been described as hosts of Microsporidia: Chlorophyta, Chytridiomycota, Chrysophyceae, Dinoflagellata, Bacillariophyta, Cryptomycota, Perkinsea, Streptophyta, Craspedida, Synurophyceae, Bicosoecida and Cryptophyta. Surprisingly, some of these co-occurrences involve phytoplankton organisms, whereas, to date infection by Microsporidia in phytoplankton has never been recorded. However, all these potential associations identified through the co-occurrence network do not reflect a temporal information. Unfortunately, the sample size is indeed too small here to consider subnetworks for each sampling point.

Although the method we used attempts to minimize spurious associations, we must bear in mind that the associations identified may not be pure parasitism. Indeed, an association could be identified, for example, between a microsporidian species and the host of its parasitic host (hyperparasitism) or be due to a common host (Microsporidia being sometimes opportunistic of another infection; Didier, 2005). An association could also reflect a simple feeding relationship (ingestion of a Microsporidia spore by another eukaryote). Also, actual interactions may not have been identified because of the weakness of the signal in the data (Blanchet *et al.*, 2020).

Actual associations can be observed with the use of fluorescence microscopy. Indeed, TSA-FISH has shown its effectiveness in the detection of host–parasite associations in the environment (Mangot *et al.*, 2009; Chambouvet *et al.*, 2019). But to date, this method has never been applied to detect new Microsporidia–host associations. Using a newly designed specific probe for Microsporidia, positive signals were repeatedly obtained in rotifers (genus *Kellicottia*), especially in May and June samples (**Fig. 31**). These signals may rather correspond to developing stages of Microsporidia rather than ingested spores, as spores are usually not stained by FISH methods due to their impermeability (Panek *et al.*, 2018). Microsporidia–rotifers associations highlighted by the co-occurrence network were thus confirmed by these observations. Indeed, seven of the 25 co-occurrences with rotifers were with the Brachionidae, a rotifer family which includes the genus *Kellicottia*. *Kellicottia* rotifers are abundant in freshwater ecosystems, including lake Aydat where they can reach more than 600 individuals per litre in summer (Lair and Oulad Ali, 1990). Rotifers account for a large proportion of freshwater zooplankton and act as intermediaries between primary producers (algae, cyanobacteria) and higher trophic levels (zooplankton, shellfish, fish) (Rico-Martínez *et al.*, 2016). This newly identified host–parasite association is thus of great importance considering the high prevalence rate observed (38% on average).

Although observed only once, the association between Microsporidia and the *Stentor* ciliate (**Fig. 32D–F**) also confirms the four co-occurrences identified with this genus. A case of microsporidian parasitism has already been described in *Stentor roeseli* and *S. polymorphus* (Görtz, 1987).

For the first time to our knowledge, Microsporidia have also been observed in association with phytoplankton (*i.e.* the diatom *Asterionella*) even if these observations remained observed at a low prevalence rate (**Fig. 32A–C**). This association was also highlighted by the co-occurrence network with seven associations between Microsporidia and Fragilariaceae, the family to which the genus *Asterionella* belong. These surprising observations, if confirmed through electron microscopy (to determine whether these Microsporidia perform a complete life cycle in these hosts), could further expand the already diverse host range of Microsporidia. Such observations of physical associations with diatoms have already been described by Jones *et al.* (2011) with parasites formerly called Cryptomycota, which could actually be Microsporidia (Bass *et al.*, 2018; Adl *et al.*, 2019).

This type of associations leads to many hypotheses on the role of Microsporidia in lacustrine environments. Indeed, the structure and the succession of the different planktonic populations

are regulated by the nutritive resources as well as by different biotic factors including parasitism. In order to better understand the functioning of food webs, it appears important to appreciate the diversity of parasites (including Microsporidia) and to quantify their impact on the dynamics and diversity of microzooplankton and phytoplankton, which play a major role at the basis of aquatic food webs. Microsporidia, which now seem to be very abundant and diverse in lacustrine ecosystems, could thus play an important role in the regulation of planktonic populations. It will therefore be essential to confirm, identify and characterize these host–parasite associations more precisely. The use of electron microscopy would allow a more detailed observation of the associations. Also, the isolation and sequencing of a host–parasite pair could lead to the precise identification of both organisms.

VI. Conclusion

In conclusion, our metabarcoding approach with microsporidian universal primers coupled with a network co-occurrence analyse and fluorescence microscopy unveiled a huge microsporidian diversity in a lake ecosystem associated with important variations across a year, and provided a hint on new microsporidian hosts. We notably identified repeated infections in *Kellicottia* (rotifer), and potential infections of phytoplankton. It now seems very important to study the diversity of Microsporidia on a larger scale, screening more environments and over a longer period of time. Also, it will be essential to investigate more precisely the hosts of these Microsporidia in order to understand their role in the ecosystems functioning.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Jonathan Colombet and Hermine Billard for their help with sampling. The authors also thank Agnès Vellet for her contribution to the molecular approaches used in this study as well as Gisèle Bronner who helped with bioinformatics analyses. The work of M.C. was supported by a PhD fellowship funded by the ‘Ministère de l’Enseignement Supérieur de la Recherche et de l’Innovation’.

References

- Adl, S.M., Bass, D., Lane, C.E., Lukes, J., Schoch, C.L., Smirnov, A., et al. (2019) Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 66: 4–119.
- Aitchison, J. (1981) A new approach to null correlations of proportions. *J Int Assoc Math Geol* 13: 175–189.

Allaire, J.J., Ellis, P., Gandrud, C., Kuo, K., Lewis, B.W., Owen, J., et al. (2017) networkD3: D3 JavaScript network graphs from R.

Ardila-Garcia, A.M., Raghuram, N., Sihota, P., and Fast, N. M. (2013) Microsporidian diversity in soil, sand, and compost of the Pacific northwest. *J Eukaryot Microbiol* 60: 601–608.

Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V., and Undeen, A.H. (1994) Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J Invertebr Pathol* 64: 100–106.

Bass, D., Czech, L., Williams, B.A.P., Berney, C., Dunthorn, M., Mahé, F., et al. (2018) Clarifying the relationships between microsporidia and Cryptomycota. *J Eukaryot Microbiol* 65: 773–782.

Benoiston, A.S. (2019) Méta-omique et méta-données environnementales : vers une nouvelle compréhension de la pompe à carbone biologique. PhD thesis: Paris, FR: Sorbonne University.

Beule, L., and Karlovsky, P. (2020) Improved normalization of species count data in ecology by scaling with ranked subsampling (SRS): application to microbial communities. *PeerJ* 8: e9593.

Blanchet, F.G., Cazelles, K., and Gravel, D. (2020) Co-occurrence is not evidence of ecological interactions. *Ecol Lett* 23: 1050–1063.

Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., et al. (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 10: 57–59.

Bray, J.R., and Curtis, J.T. (1957) An ordination of the upland Forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 27: 325–349.

Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A.R., Morgan, E.R., Murray, K., et al. (2017) Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philos Trans R Soc B* 372: 20160088.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci* 108: 4516–4522.

Carr, A., Diener, C., Baliga, N.S., and Gibbons, S.M. (2019) Use and abuse of correlation analyses in microbial ecology. *ISME J* 13: 2647–2655.

Chaffron, S., Rehrauer, H., Perenthaler, J., and von Mering, C. (2010) A global network of coexisting microbes from environmental and whole-genome sequence data. *Genome Res* 20: 947–959.

Chambouvet, A., Monier, A., Maguire, F., Itôiz, S., del Campo, J., Elies, P., et al. (2019) Intracellular infection of diverse diatoms by an evolutionary distinct relative of the fungi. *Curr Biol* 29: 4093–4101.

Codreanu-Balcescu, D., and Codreanu, R. (1976) L'ultrastructure d'une Microsporidie hyperparasite d'une grégarine d'Ephémère. *J Protozool* 23: 8A.

Debroas, D., Domaizon, I., Humbert, J.-F., Jardillier, L., Lepère, C., Oudart, A., and Taïb, N. (2017) Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data. *FEMS Microbiol Ecol* 93: fix023.

Debroas, D., Hugoni, M., and Domaizon, I. (2015) Evidence for an active rare biosphere within freshwater protists community. *Mol Ecol* 24: 1236–1247.

Didier, E.S. (2005) Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94: 61–76.

Dubuffet, A., Chauvet, M., Moné, A., Debroas, D., and Lepère, C. (2021) A phylogenetic framework to investigate the microsporidian communities through metabarcoding and its application to lake ecosystems. *Environ Microbiol* 23: 4344–4359.

Fath, B.D., Scharler, U.M., Ulanowicz, R.E., and Hannon, B. (2007) Ecological network analysis: network construction. *Ecol Model* 208: 49–55.

Fokin, S.I., Di Giuseppe, G., Erra, F., and Dini, F. (2008) *Euplotespora binucleata* n. gen., n. sp. (protozoa: microsporidia), a parasite infecting the hypotrichous ciliate *Euplotes woodruffi*, with observations on microsporidian infections in ciliophora. *J Eukaryot Microbiol* 55: 214–228.

Gorbunov, A.K., and Kosova, A.A. (2001) Parasites in rotifers from the Volga delta. *Hydrobiologia* 446: 51–55.

Görtz, H.D. (1987) Infections of *Stentor roeseli* and *S. polymorphus* (Ciliophora, Heterotrichida) by microsporidia. *Parasitol Res* 74: 34–35.

Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E.M., and Troedsson, C. (2014) Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS One* 9: e87624.

Hugerth, L.W., Muller, E.E.L., Hu, Y.O.O., Lebrun, L.A.M., Roume, H., Lundin, D., et al. (2014) Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS One* 9: e95567.

Jones, M.D.M., Forn, I., Gadelha, C., Egan, M.J., Bass, D., Massana, R., and Richards, T.A. (2011) Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature* 474: 200–203.

Karpov, S.A., Mamkaeva, M.A., Aleoshin, V.V., Nassonova, E., Lilje, O., and Gleason, F.H. (2014) Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. *Front Microbiol* 5: 112.

Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33: 511–518.

Krüger, F. (1956) Über die Microsporidien-Infektion von *Campanella umbellaria* (Ciliata Peritricha). *Zool Anz* 156: 125–129.

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870–1874.

Kurtz, Z.D., Müller, C.L., Miraldi, E.R., Littman, D.R., Blaser, M.J., and Bonneau, R.A. (2015) Sparse and compositionally robust inference of microbial ecological networks. *PLoS Comput Biol* 11: e1004226.

Lair, N. (1990) Effects of invertebrate predation on the seasonal succession of a zooplankton community: a two year study in Lake Aydat, France. *Hydrobiologia* 198: 1–12.

Lair, N., and Oulad Ali, H. (1990) Grazing and assimilation rates of natural populations of planktonic rotifers *Keratella cochlearis*, *Keratella quadrata* and *Kellicottia longispina* in a eutrophic lake (Aydat, France). *Hydrobiologia* 194: 119–131.

Langdon, P.G., Ruiz, Z., Brodersen, K.P., and Foster, I.D.L. (2006) Assessing lake eutrophication using chironomids: understanding the nature of community response in different lake types. *Freshw Biol* 51: 562–577.

Lepère, C., Boucher, D., Jardillier, L., Domaizon, I., and Debroas, D. (2006) Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake Pavin). *Appl Environ Microbiol* 72: 2971–2981.

Lepère, C., Domaizon, I., Hugoni, M., Vellet, A., and Debroas, D. (2016) Diversity and dynamics of active small microbial eukaryotes in the anoxic zone of a freshwater meromictic Lake (Pavin, France). *Front Microbiol* 7: 130.

Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., et al. (2015) Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science* 348: 1262073.

Lutz, A., and Splendore, A. (1908) Über Pebrine und verwandte Mikrosporidien. *Zweite Mitteilung. Centralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1, Orig* 46: 311–315.

Mangot, J.-F., Domaizon, I., Taib, N., Marouni, N., Duffaud, E., Bronner, G., and Debroas, D. (2013) Shortterm dynamics of diversity patterns: evidence of continual reassembly within lacustrine small eukaryotes. *Environ Microbiol* 15: 1745–1758.

- Mangot, J.-F., Lepère, C., Bouvier, C., Debroas, D., and Domaizon, I. (2009) Community structure and dynamics of small eukaryotes targeted by new oligonucleotide probes: new insight into the lacustrine microbial food web. *Appl Environ Microbiol* 75: 6373–6381.
- McMurdie, P.J., and Holmes, S. (2013) Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8: e61217.
- Meinshausen, N., and Bühlmann, P. (2006) High-dimensional graphs and variable selection with the lasso. *Ann Stat* 34: 1436–1462.
- Mikhailov, K.V., Simdyanov, T.G., and Aleoshin, V.V. (2016) Genomic survey of a Hyperparasitic microsporidian *Amphiamblys* sp. (Metchnikovellidae). *Genome Biol Evol* 9: 454–467.
- Morris, D.J., and Freeman, M.A. (2010) Hyperparasitism has wide-ranging implications for studies on the invertebrate phase of myxosporean (Myxozoa) life cycles. *Int J Parasitol* 40: 357–369.
- Murareanu, B.M., Sukhdeo, R., Qu, R., Jiang, J., and Reinke, A.W. (2021) Generation of a microsporidia species attribute database and analysis of the extensive ecological and phenotypic diversity of microsporidia. *mBio* 12: e01490–e01421.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., et al. (2020) *Vegan: community ecology package*.
- Paliy, O., and Shankar, V. (2016) Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Mol Ecol* 25: 1032–1057.
- Panek, J., Paris, L., Roriz, D., Mone, A., Dubuffet, A., Delbac, F., et al. (2018) Impact of the microsporidian *Nosema ceranae* on the gut epithelium renewal of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 159: 121–128.
- Park, E., and Poulin, R. (2021) Revisiting the phylogeny of microsporidia. *Int J Parasitol* 51: 855–864.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35: 7188–7196.
- R Development Core Team. (2012) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Austria, Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rico-Martínez, R., Arzate-Cardenas, M.A., Robles, D., Pérez-Legaspi, I., Alvarado-Flores, J., and Santos Medrano, G.E. (2016) Rotifers as models in toxicity screening of chemicals and environmental samples. In *Invertebrates – Experimental Models in Toxicity Screening*: London, UK: InTech, pp. 57–99.
- Rühl, H., and Korn, H. (1979) Ein Mikrosporidier, *Geusia gamocysti* n. gen., n. sp. als Hyperparasit bei *Gamocystis ephemerae*. *Arch Protistenkd* 121: 349–355.
- Stentiford, G.D., Feist, S.W., Stone, D.M., Bateman, K.S., and Dunn, A.M. (2013) Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. *Trends Parasitol* 29: 567–578.
- Taib, N., Mangot, J.-F., Domaizon, I., Bronner, G., and Debroas, D. (2013) Phylogenetic affiliation of SSU rRNA genes generated by massively parallel sequencing: new insights into the freshwater Protist diversity. *PLoS One* 8: e58950.
- ter Braak, C. (1986) Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* 67: 1167–1179.
- Tokarev, Y.S., Voronin, V.N., Seliverstova, E.V., Pavlova, O. A., and Issi, I.V. (2010) Life cycle, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Crispospora chironomi* g.n. sp.n. (microsporidia: Terresporidia), a parasite of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *Parasitol Res* 107: 1381–1389.

Vavra, J., Fiala, I., Krylova, P., Petrusek, A., and Hyliš, M. (2019) Establishment of a new microsporidian genus and species, *Pseudoberwaldia daphniae* (microsporidia, Opisthosporidia), a common parasite of the *Daphnia longispina* complex in Europe. *J Invertebr Pathol* 162: 43–54.

Vavra, J., and Larsson, J.I.R. (2014) Structure of microsporidia. In *Microsporidia*: Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, pp. 1–70.

Vossbrinck, C.R., Debrunner-Vossbrinck, B.A., and Weiss, L. M. (2014) Phylogeny of the microsporidia. In *Microsporidia*: Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, pp. 203–220.

Wadi, L., and Reinke, A.W. (2020) Evolution of microsporidia: an extremely successful group of eukaryotic intracellular parasites. *PLoS Pathog* 16: e1008276.

Weiss, L.M., Delbac, F., Russell Hayman, J., Pan, G., Dang, X., and Zhou, Z. (2014) The microsporidian polar tube and spore wall. In *Microsporidia*: Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, pp. 261–306.

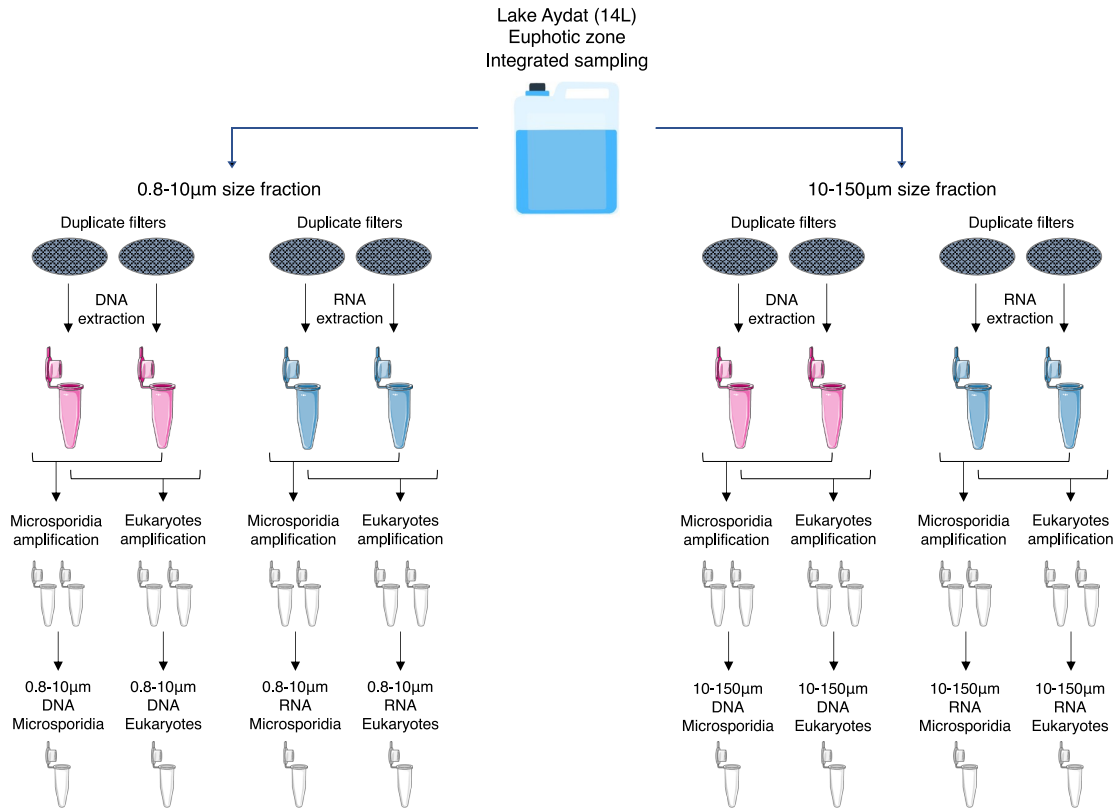
Weiss, L.M., Zhu, X., Cali, A., Tanowitz, H.B., and Wittner, M. (1994) Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitol (Praha)* 41: 81–90.

Williams, B.A.P., Hamilton, K.M., Jones, M.D., and Bass, D. (2018) Group-specific environmental sequencing reveals high levels of ecological heterogeneity across the microsporidian radiation. *Environ Microbiol Rep* 10: 328–336.

Wolska, M., and Mazurkiewicz-Zapalowicz, K. (2013) Parasites of zooplankton and periphyton assemblages in the littoral zone of lakes in Drawa National Park, Poland. *Acta Mycologica* 48: 51–59.

Yakovleva, Y., Nasonova, E., Lebedeva, N., Lanzoni, O., Petroni, G., Potekhin, A., and Sabaneyeva, E. (2020) The first case of microsporidiosis in paramecium. *Parasitology* 147: 957–971.

Supplementary Information



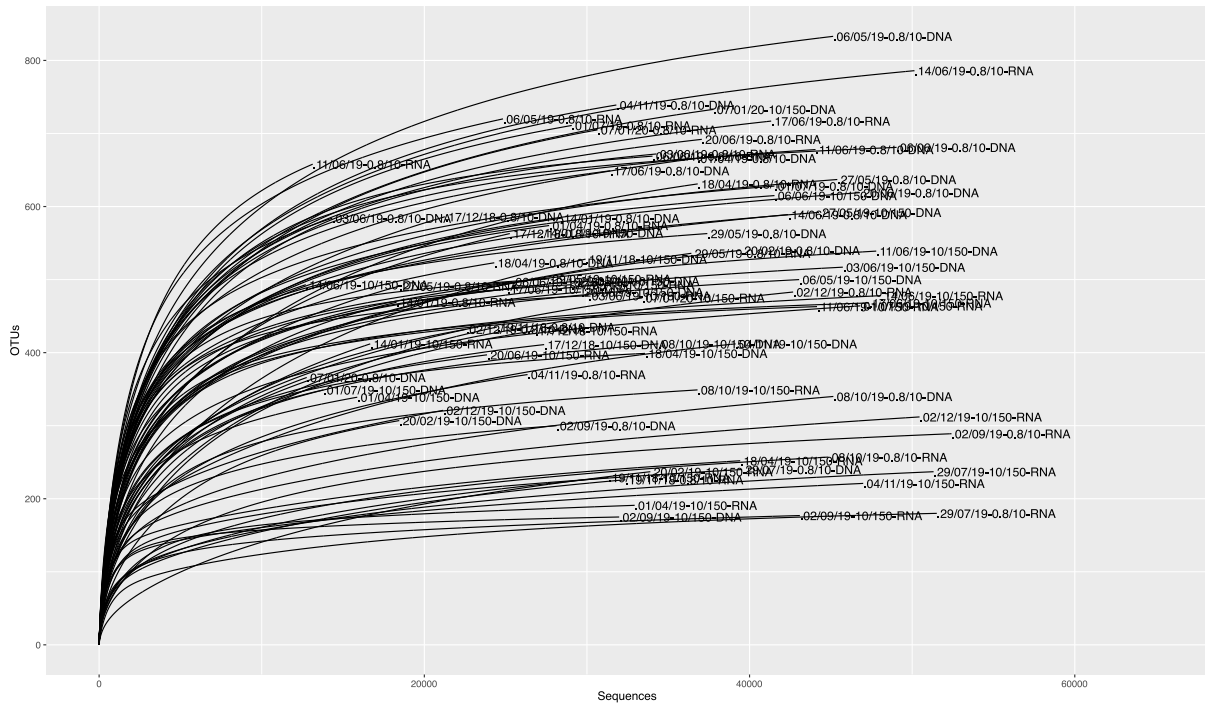
Supplementary Information 1: Experimental procedure for the metabarcoding samples.

At each sampling point, water was filtered to obtain two size fractions, DNA and RNA extractions were performed in duplicate, followed by the amplification of Microsporidia and eukaryotes. PCR products were then pooled. For each of the 22 sampling points, we had two size fractions, two matrix types (DNA and RNA) and two types of primers (Microsporidia and eukaryotes) for a total of 176 samples (8 at each sampling point, as shown in this example).

Sampling date	Temperature (°C)	Dissolved oxygen (mg.L-1)	Green algae (µg.L-1)	Bluegreen algae (µg.L-1)	Diatoms (µg.L-1)	Cryptophyta (µg.L-1)	Total pigments (µg.L-1)
19/11/18	8.4	4.4	0.38	1.14	0.85	0.74	3.11
17/12/18	5.8	9.5	1.31	1.07	0.49	0.93	3.81
14/01/19	3.3	11.2	NA	NA	NA	NA	NA
20/02/19	4.2	13	NA	NA	NA	NA	NA
01/04/19	8.9	10.7	4.24	0.09	9.05	0.18	13.56
18/04/19	10.4	11.2	NA	NA	NA	NA	NA
06/05/19	10.5	11.2	NA	NA	NA	NA	NA
27/05/19	14.2	11.1	2.09	0.16	11.31	0.33	13.89
29/05/19	14	10.5	2.06	0.2	9.52	0.59	12.37
03/06/19	15.8	10.7	3.11	0.08	11.86	0.73	15.78
06/06/19	17.5	10.9	2.39	0.26	6.88	1.92	11.44
11/06/19	16.1	9.7	0.67	0.57	1.85	1.55	4.65
14/06/19	13.5	6.3	0.73	0.56	0.56	0.86	2.7
17/06/19	13.2	6.4	0.42	0.7	0.22	1.35	2.68
20/06/19	15	5.6	0.39	0.72	0.4	0.95	2.45
01/07/19	17.2	6	0.96	0.67	0.39	0.97	2.99
29/07/19	NA	NA	0.96	2.6	3.48	0.38	7.43
02/09/19	20.7	7.8	2.64	1.95	3.41	0.52	8.51
08/10/19	14.7	7.2	NA	NA	NA	NA	NA
04/11/19	11.9	6.5	NA	NA	NA	NA	NA
02/12/19	NA	NA	4.51	2.04	10.29	0.48	17.32
07/01/20	4.5	11.5	NA	NA	NA	NA	NA

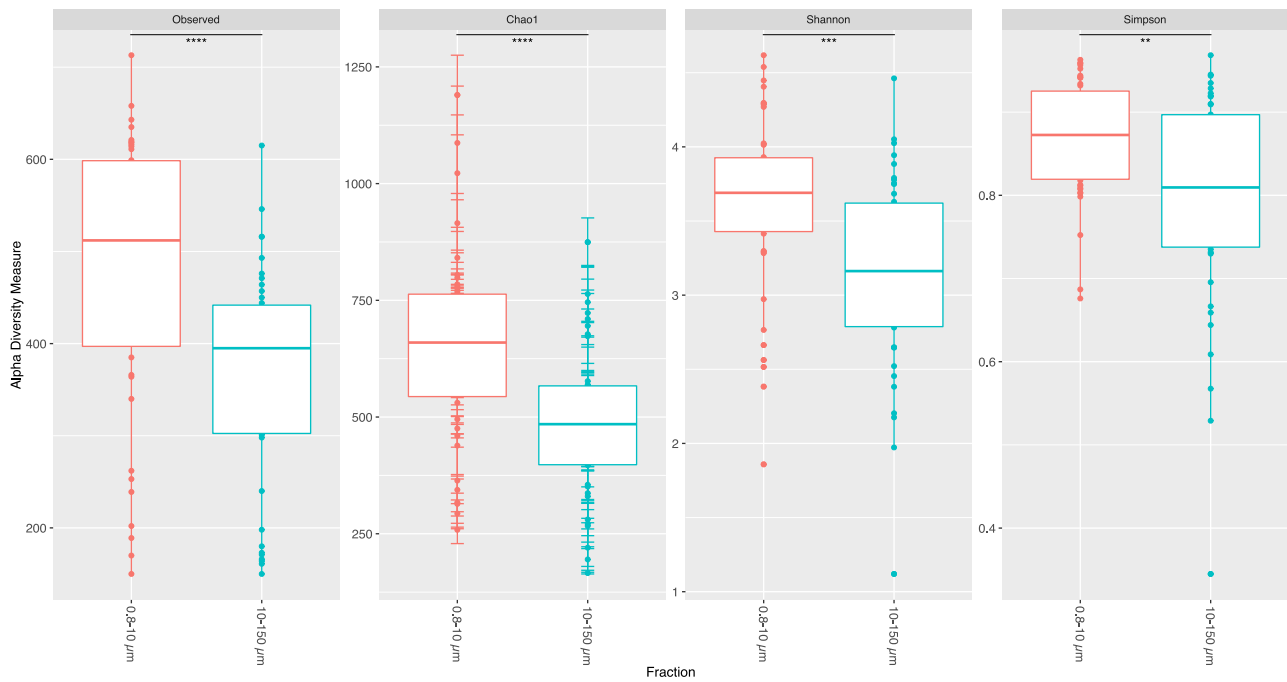
Supplementary Information 2: Metadata recorded during sampling (temperature (°C), dissolved oxygen concentration (mg.L⁻¹) and different photosynthetic pigments (µg.L⁻¹)).

All values are averages of data collected along the euphotic zone. NA = Not Available



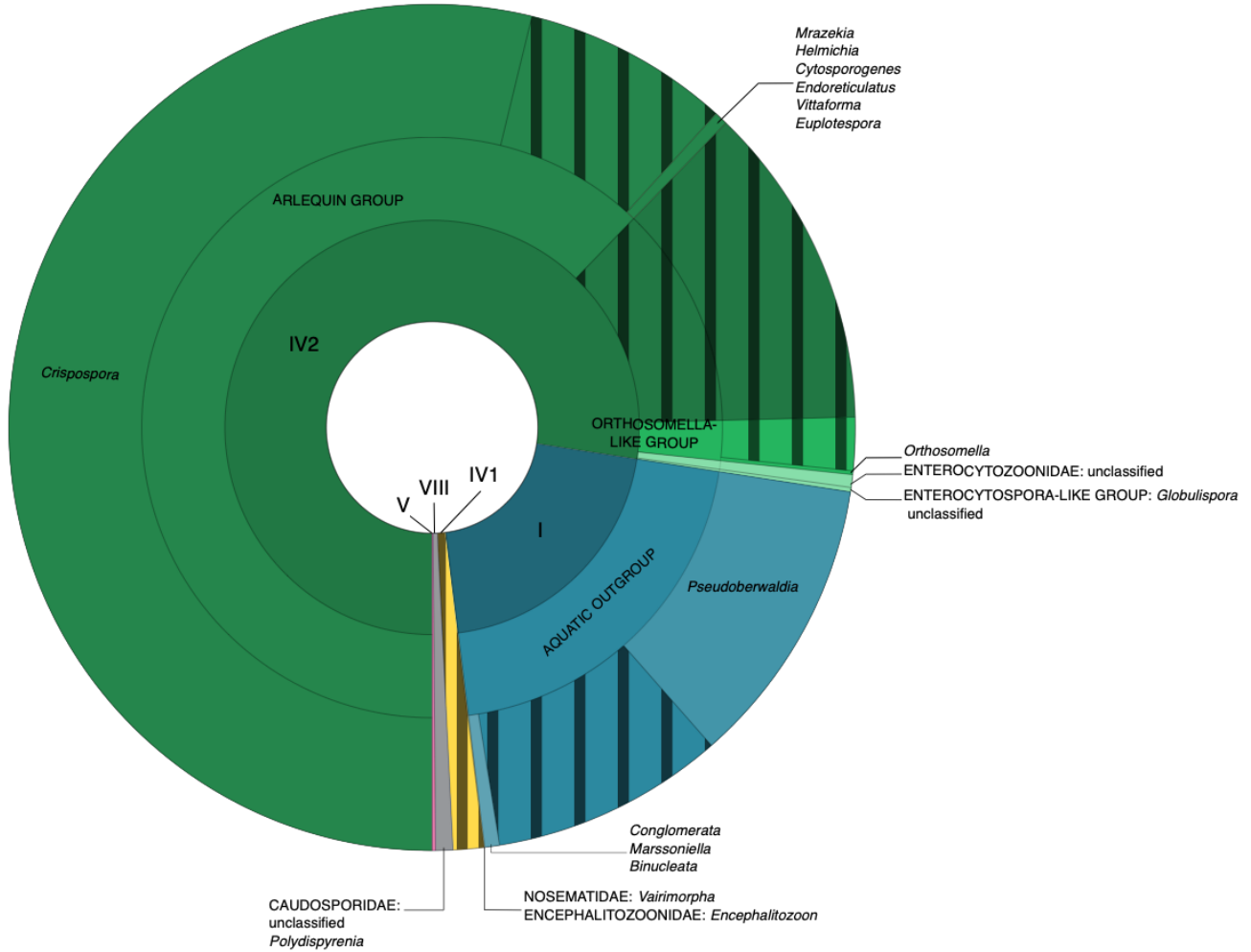
Supplementary Information 3: Rarefaction curves for the microsporidian samples.

Label = sampling date (DD/MM/YY)-fraction-DNA/RNA



Supplementary Information 4: Boxplot showing α -diversity indices (Richness observed, Chao1, Shannon and Simpson) of Microsporidia community grouped according to the size fraction.

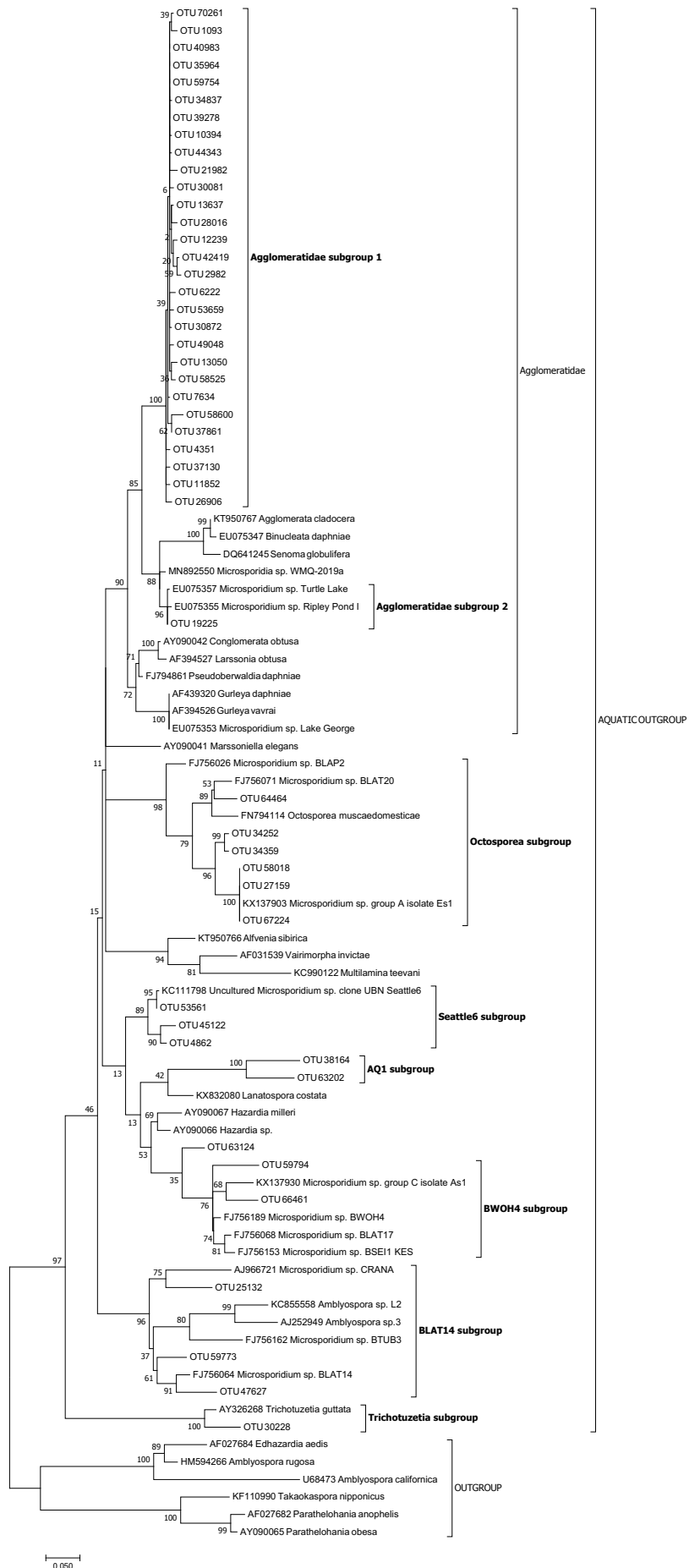
(Wilcoxon test: **, p-value < 0.01 ; ***, p-value < 0.001 ; ****, p-value < 0.0001)



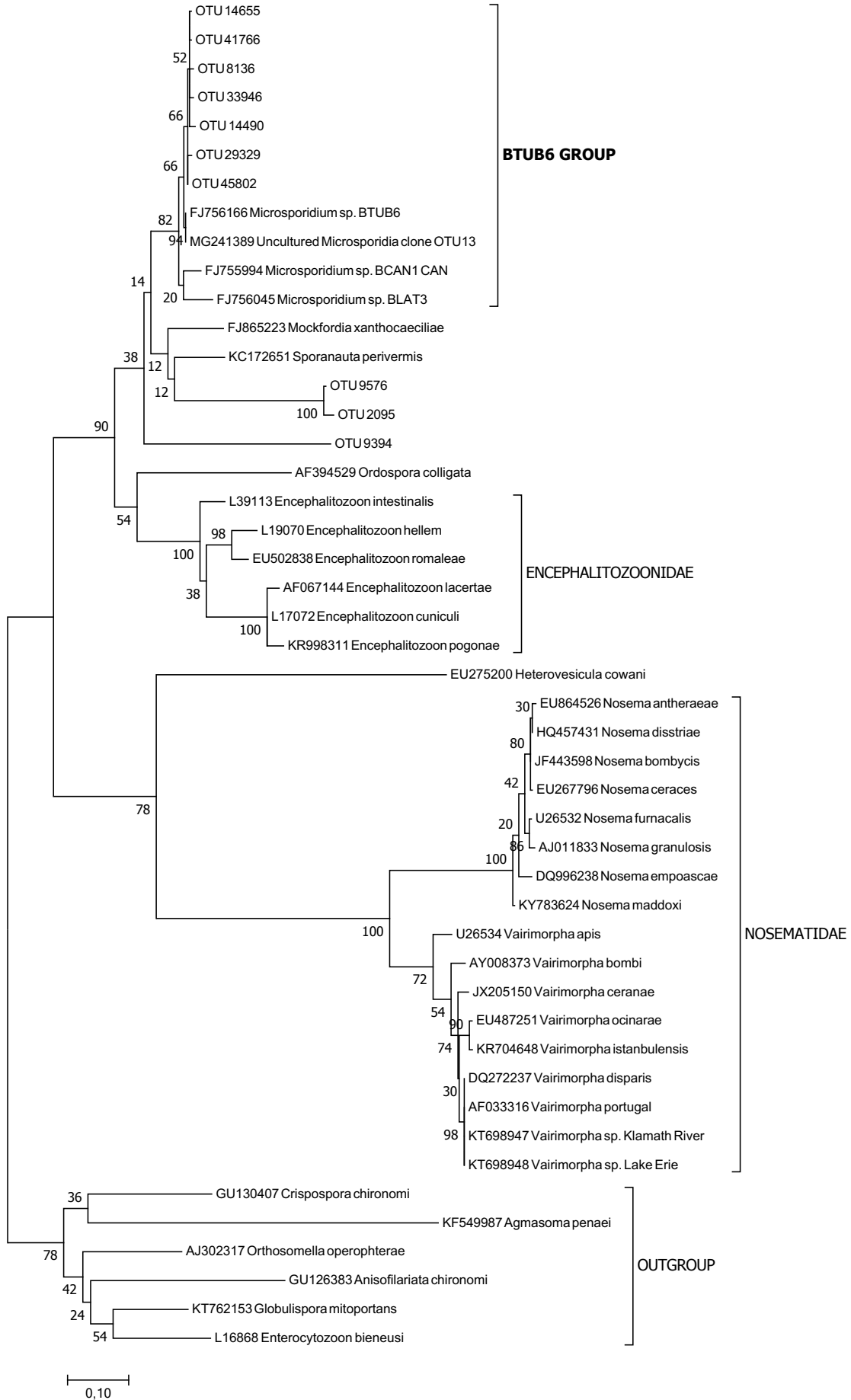
Supplementary Information 5: Taxonomic affiliation of the microsporidian OTUs following the analysis on PANAM2 (DNA and RNA samples).

Five clades and eight groups were identified. 39% of the OTUs were not assigned to a genus and 22% not even to a group. Inner circle represents clades. Deeper taxonomic ranks (groups and genera) are presented in outer circles. Group names are given in capital letters and genera names in italic. Hatched patterns represent OTUs unaffiliated beyond the group/clade. Genera/subgroups listed are ranked from most to least abundant.

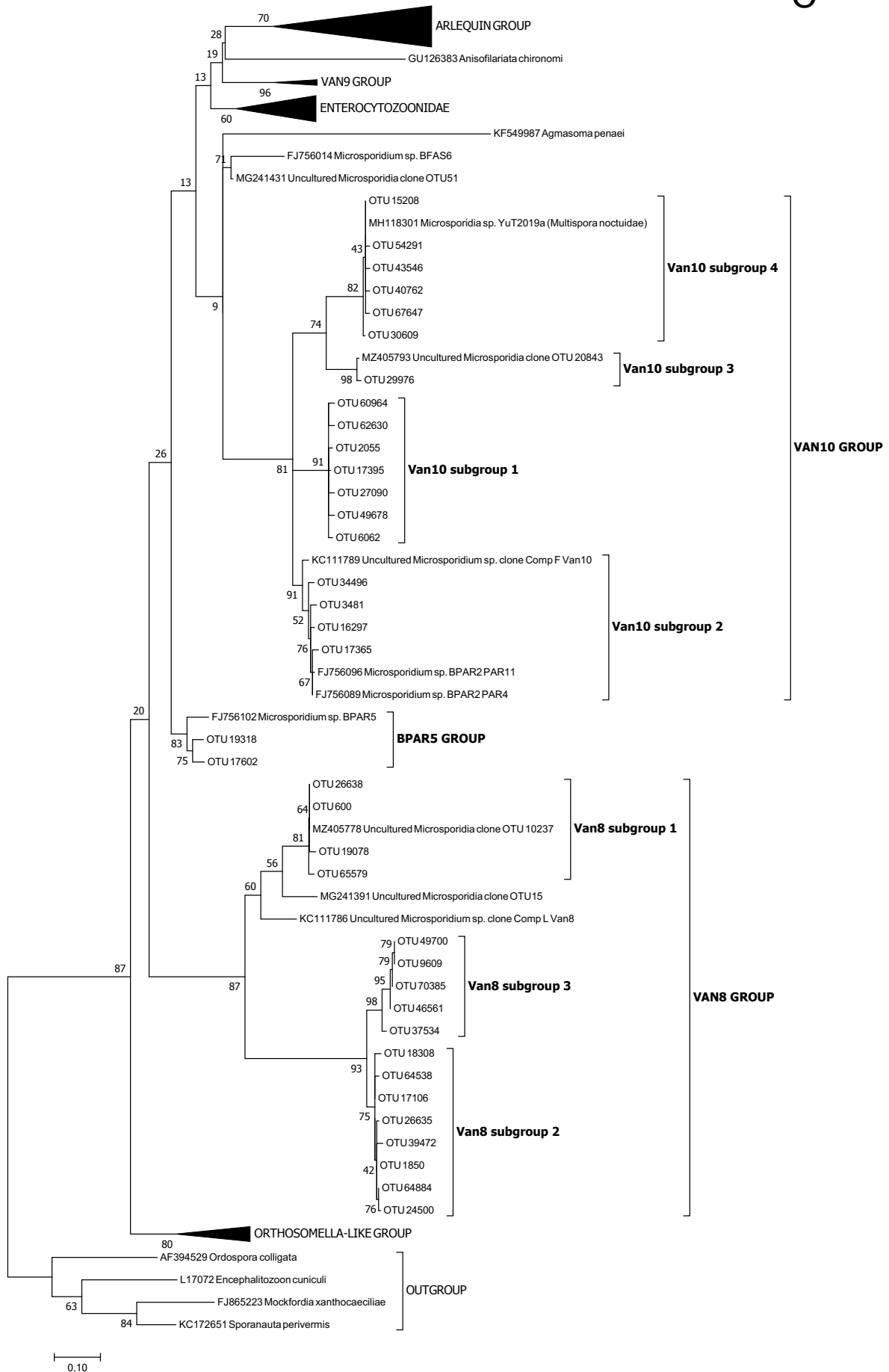
A



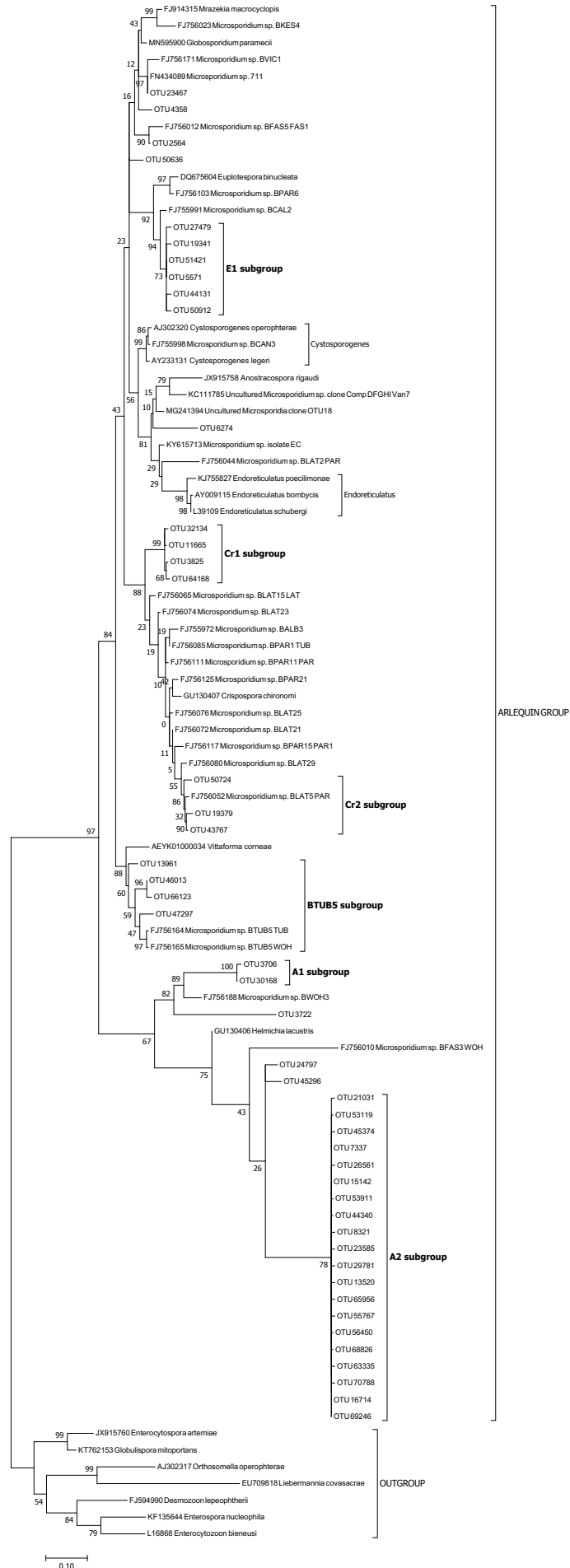
B



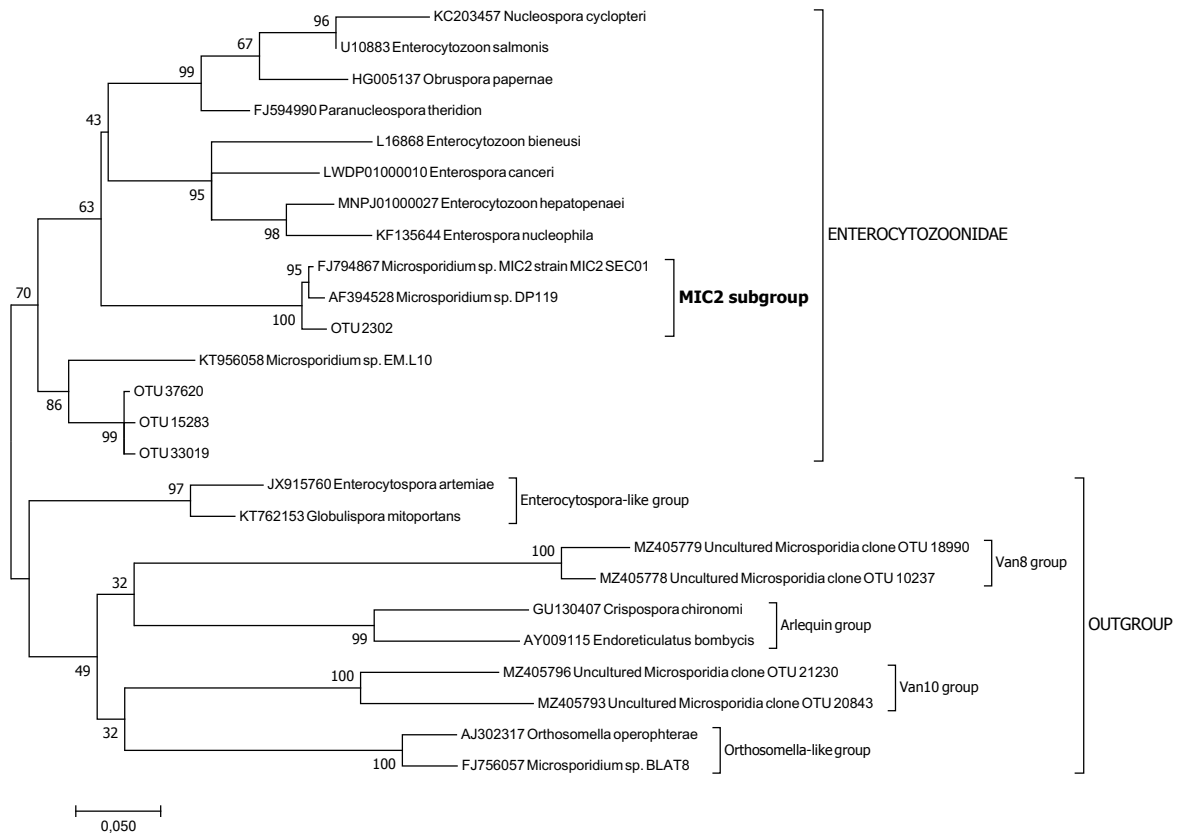
C



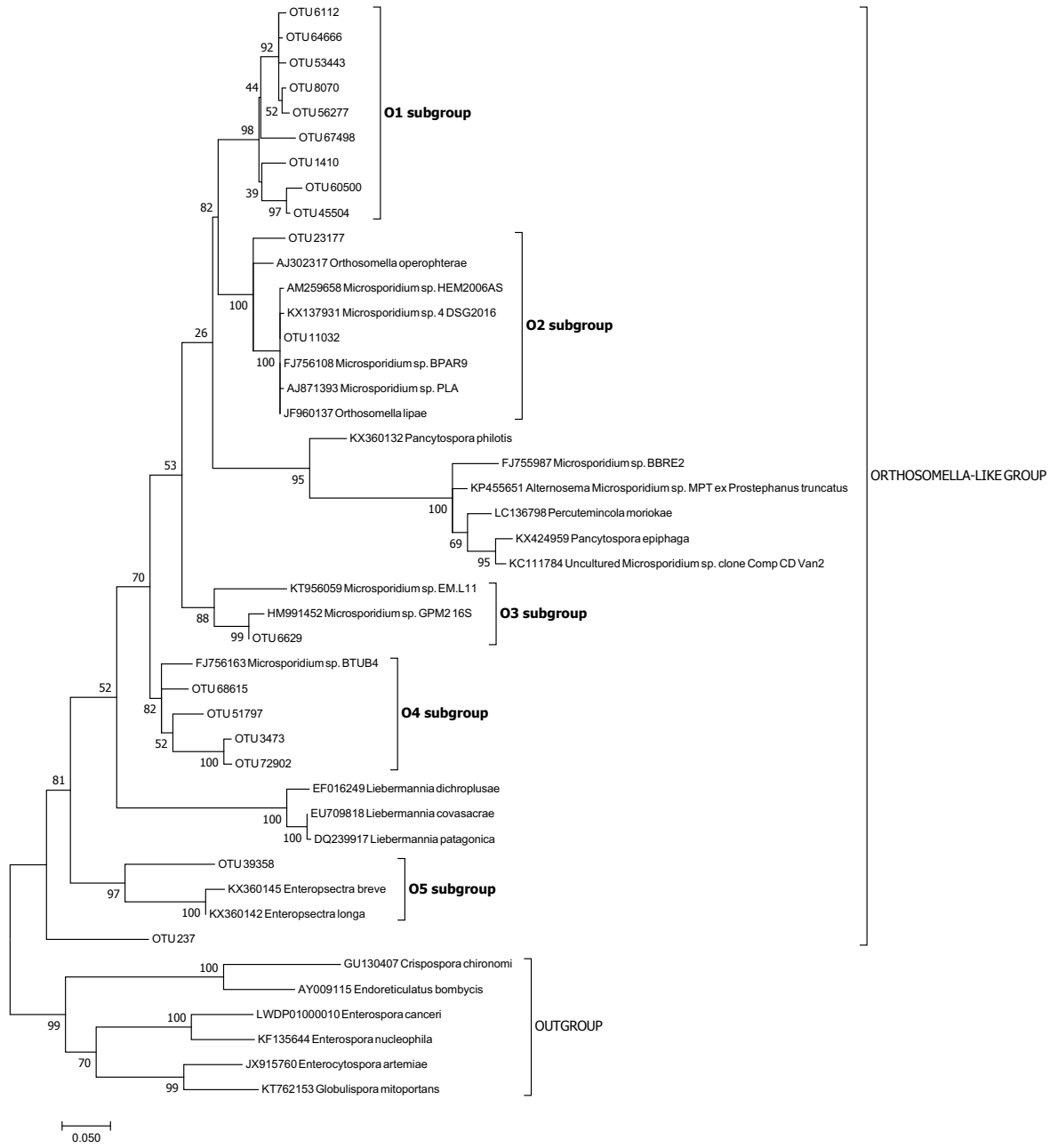
D



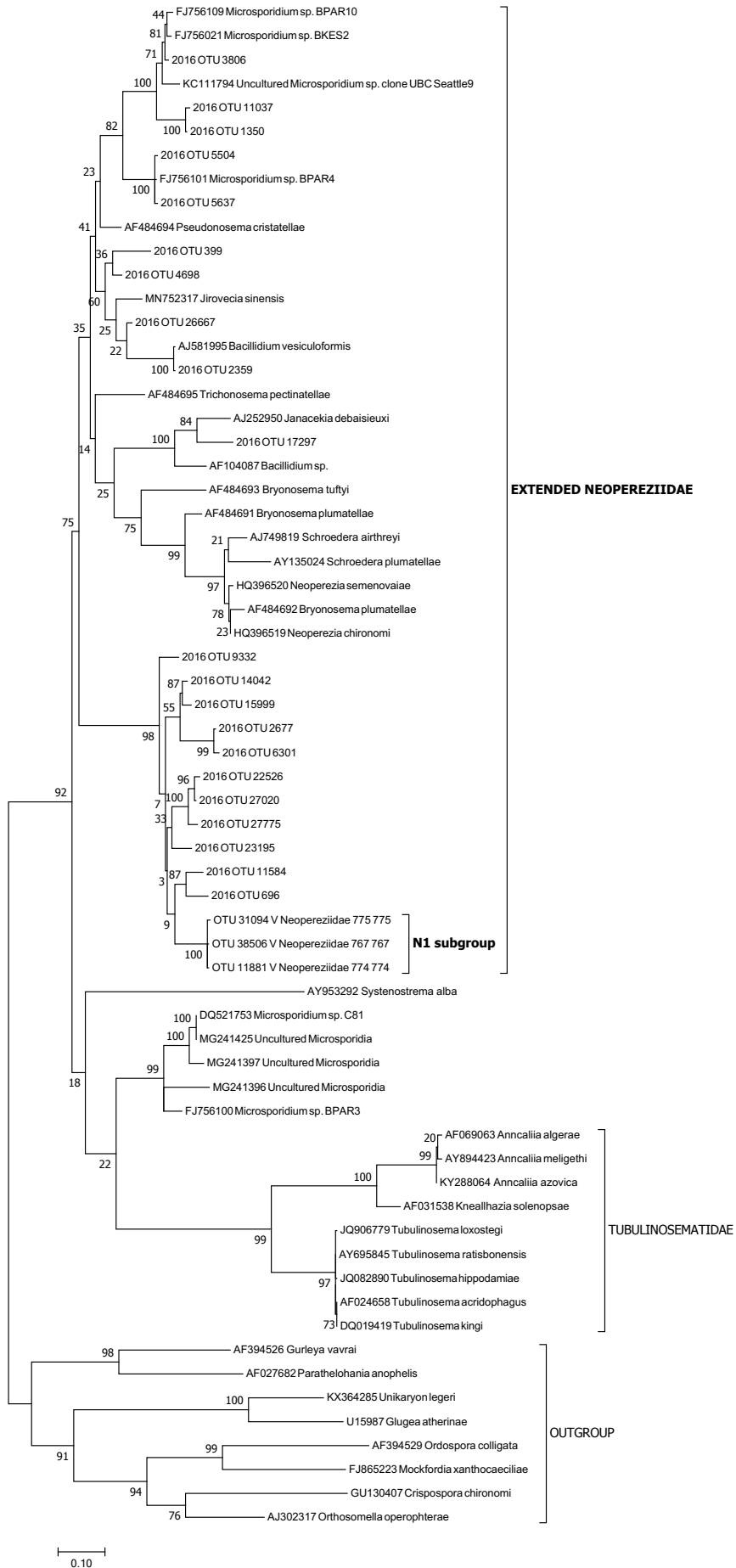
E

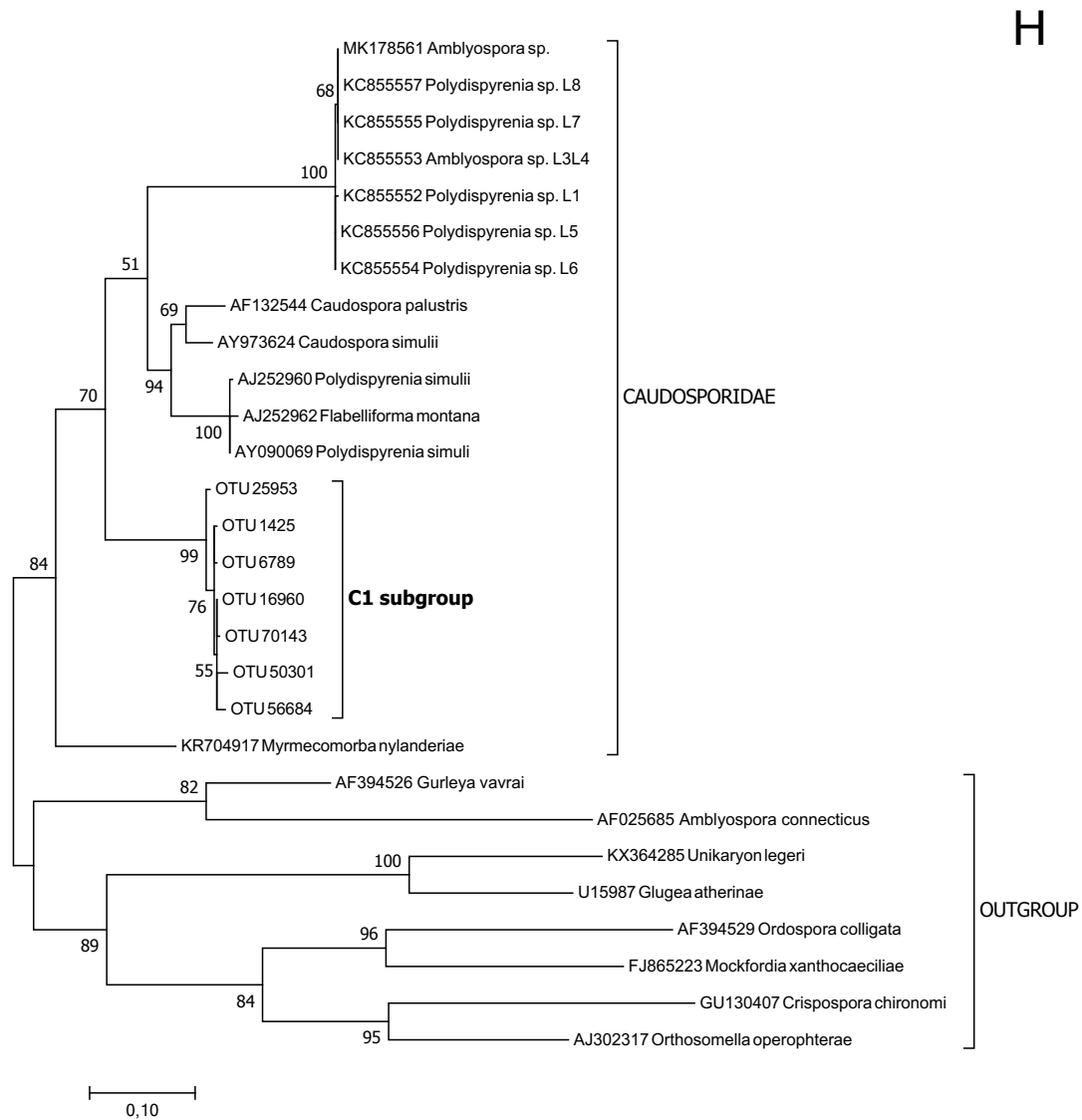


F



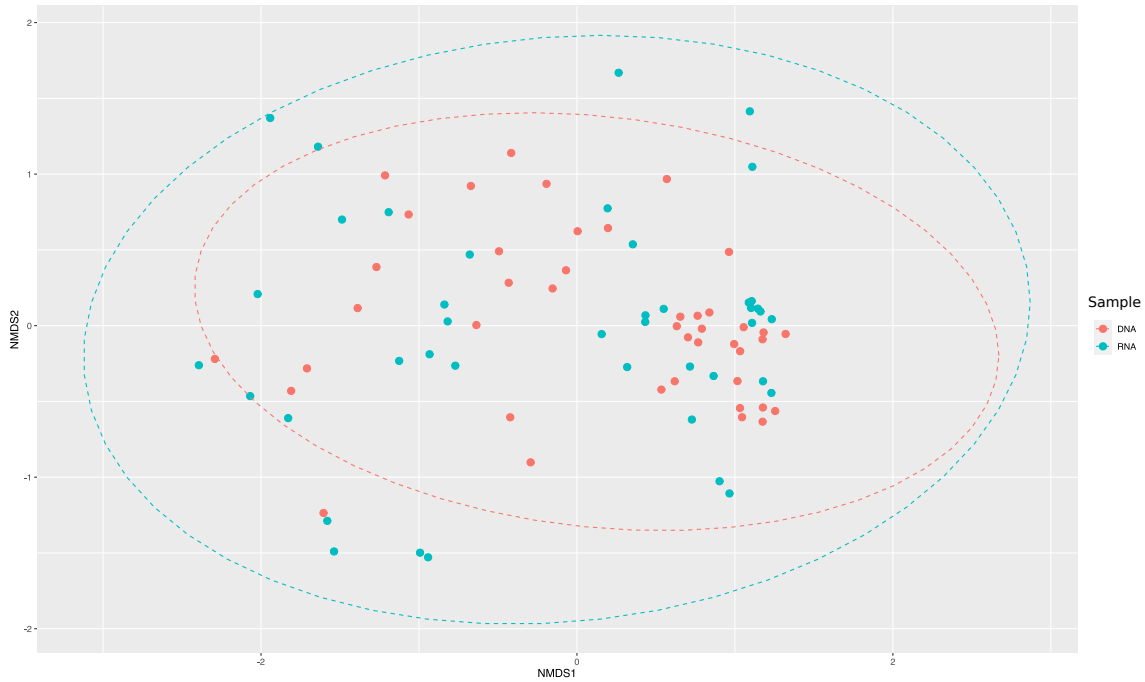
G



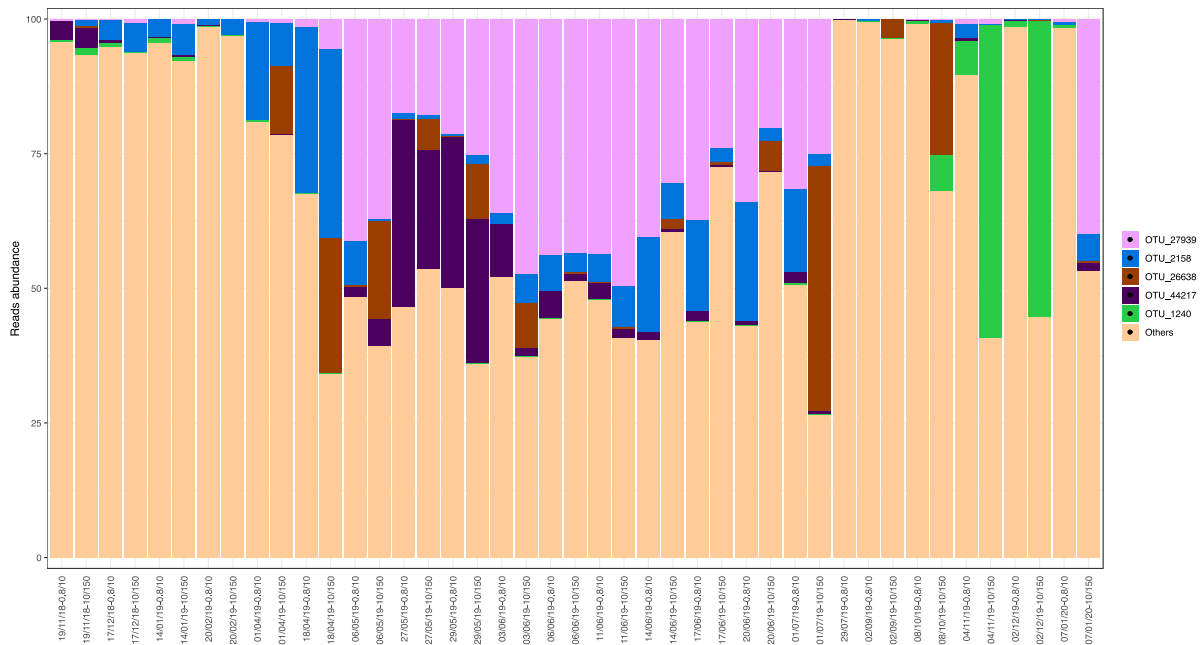


Supplementary Information 6: Maximum Likelihood phylogenies of abundant OTUs (>500 reads) affiliated to (A) Aquatic outgroup (clade I), (B) clade IV1, (C) clade IV2, (D) Arlequin group (clade IV2), (E) Enterocytozoonidae (clade IV2), (F) *Orthosomella*-like group (clade IV2), (G) clade V and (H) Caudosporidae (clade VIII).

Numbers next to branches indicate the ML bootstrap support (200 replicates). Group names are given in capital letters, subgroups in lower case. Groups and subgroups identified during these phylogenies are given in bold. When the sequences were not affiliated to any group (only to a clade), we considered that some formed a group when they clustered together with a good bootstrap (higher than 80) and separately from any other known group. All these sequences fall into phylogenetic groups defined in a previous study (Dubuffet *et al.*, 2021). When sequences were affiliated to a group but not to a genus, we considered that some of them formed a subgroup when they were grouped together with a good bootstrap (higher than 75, often even higher than 90) and separately from any other known genus. The mean identity within these subgroups was 96.6%.

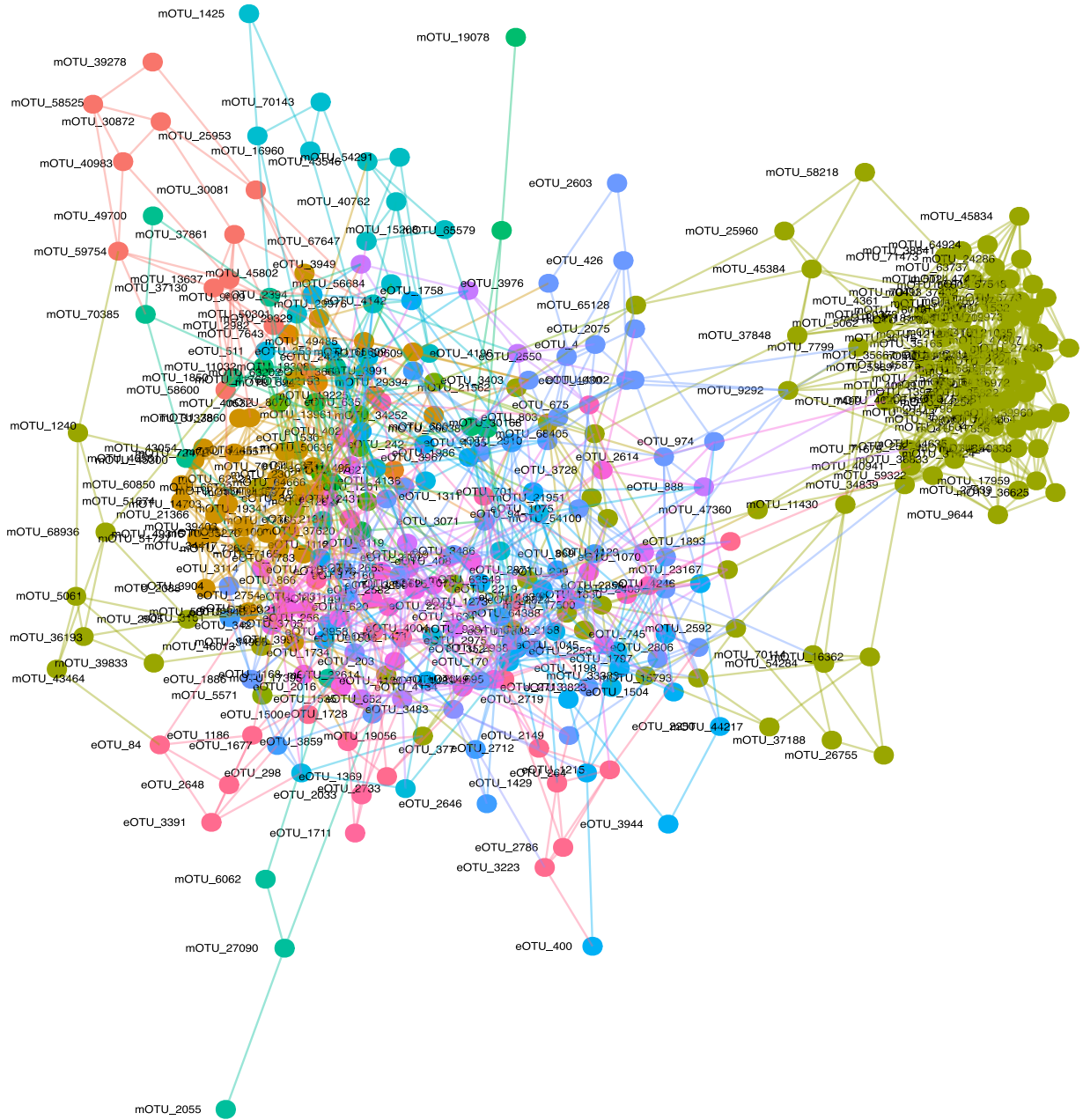


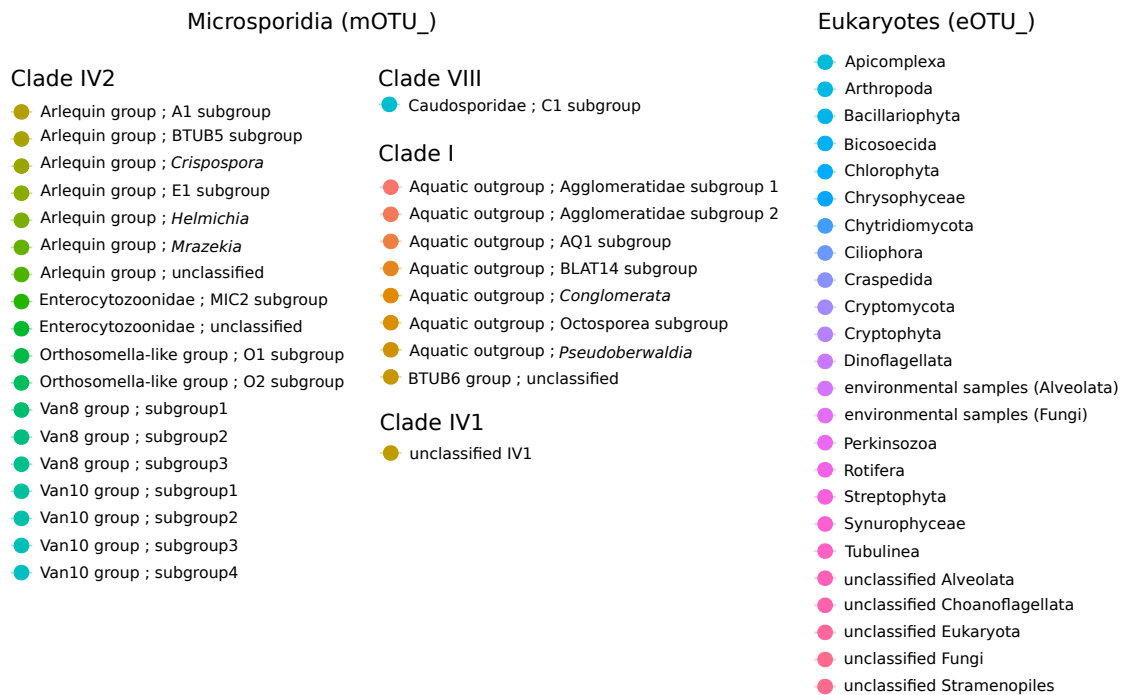
Supplementary Information 7: Non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on Bray-Curtis distances of the microsporidian OTUs relative abundances across samples (stress = 0.15). Colours of the data points indicate the type of sample (DNA or RNA). Ellipses in the plots denote 95% confidence intervals, points that are not overlapped by the two ellipses are considered significantly different.



Supplementary Information 8: Relative abundances of the five most abundant OTUs across DNA samples.

The orange zone at the bottom of each bar represent the cumulative proportion of all the other OTUs. OTU_27939, OTU_2158, OTU_44217 and OTU_1240: Clade IV2, Arlequin group, *Crispospora* OTU_26638: Clade IV2, van8 group, subgroup1. Label = sampling date (DD/MM/YY)-fraction





Supplementary Information 9: Co-occurrence network built from microsporidian and eukaryotic OTUs (abundance >0.05%) with SPIEC-EASI.

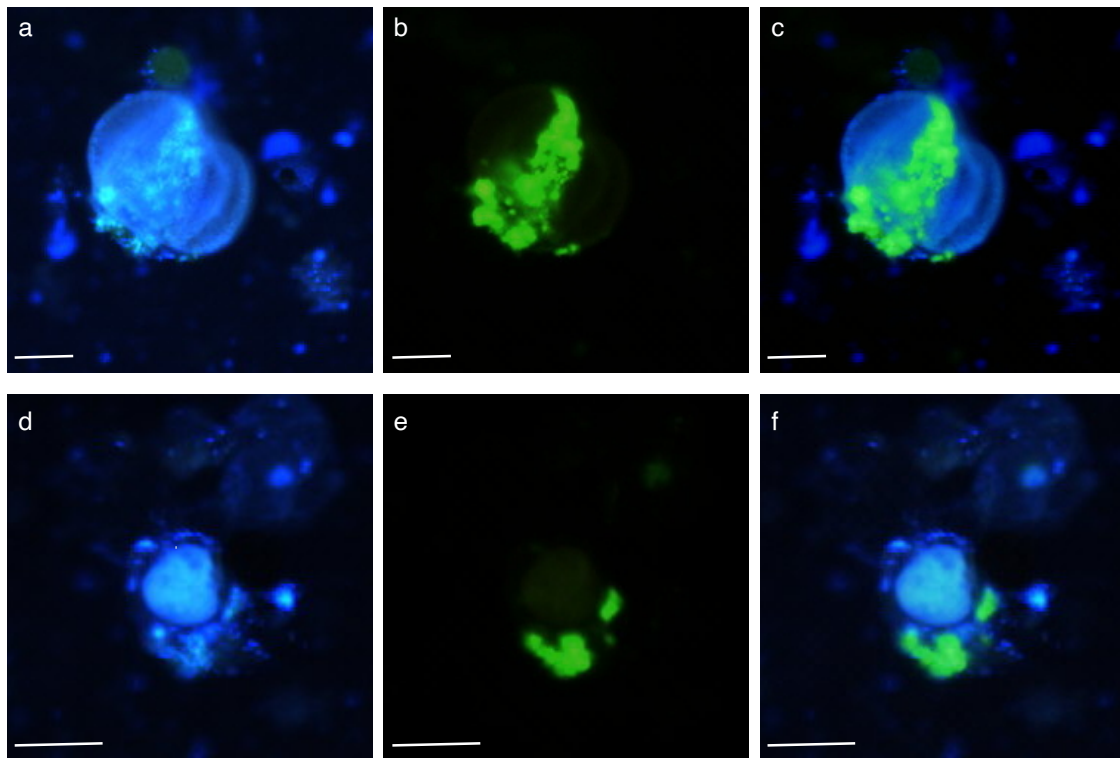
Each node represents one OTU, nodes are colored by genus/subgroup (microsporidian OTUs) and by phylum or class (eukaryotic OTUs). Edges between nodes represent a positive interaction between the two nodes. Only positive interactions are shown, between Microsporidia and eukaryotes, Microsporidia themselves and eukaryotes themselves. 354 nodes are connected by 1 324 edges. In this network, Microsporidia don't show a central position, they're scattered throughout the network.

			Apicomplexa	Arthropoda	Bacillariophyta	Bicosoecida	Chlorophyta	Chrysophyceae	Chytridiomycota	Ciliophora
Clade I	Aquatic outgroup	Agglomeratidae subgroup 1			2				2	1
		Agglomeratidae subgroup 2		1						
		AQ1 subgroup		1	2					
		BLAT14 subgroup								1
		<i>Conglomerata</i>	1	1						
		Octosporea subgroup		2			1	2		1
		<i>Pseudoberwaldia</i>								15
Clade IV2	Arlequin group	A1 subgroup								4
		BTUB5 subgroup								1
		<i>Crispospora</i>		2	2	1	1		4	27
		E1 subgroup								
		<i>Helmichia</i>								
	Enterocytozoonidae	MIC2 subgroup								
	Orthosomella-like group	O1 subgroup		2					1	3
		O2 subgroup						1		
	Van8 group	subgroup 1	1						1	
		subgroup 2		1			2	1		1
		subgroup 3		1	1			3		
	Van10 group	subgroup 1								1
		subgroup 2								1
subgroup 3			1			3	1	1		
subgroup 4					1	1		1		

			Craspedida	Cryptomycota	Cryptophyta	Dinoflagellata	Perkinsozoa	Rotifera	Streptophyta	Synurophyceae
Clade I	Aquatic outgroup	Agglomeratidae subgroup 1								
		Agglomeratidae subgroup 2								
		AQ1 subgroup				1				
		BLAT14 subgroup						2		
		<i>Conglomerata</i>								
		Octosporea subgroup								1
		<i>Pseudoberwaldia</i>	1	1	1	1	1	6		
Clade IV2	Arlequin group	A1 subgroup						2	1	
		BTUB5 subgroup								
		<i>Crispospora</i>		2	1	3		5	2	1
		E1 subgroup				1		1		
		<i>Helmichia</i>				1				
	Enterocytozoonidae	MIC2 subgroup	1					1	1	
	Orthosomella-like group	O1 subgroup					1			
		O2 subgroup								
	Van8 group	subgroup 1						1		
		subgroup 2								
		subgroup 3				1				1
	Van10 group	subgroup 1							2	
		subgroup 2								
subgroup 3					1					
subgroup 4								1		

Supplementary Information 10: Overview of the number of edges between Microsporidia and the different eukaryotic taxa.

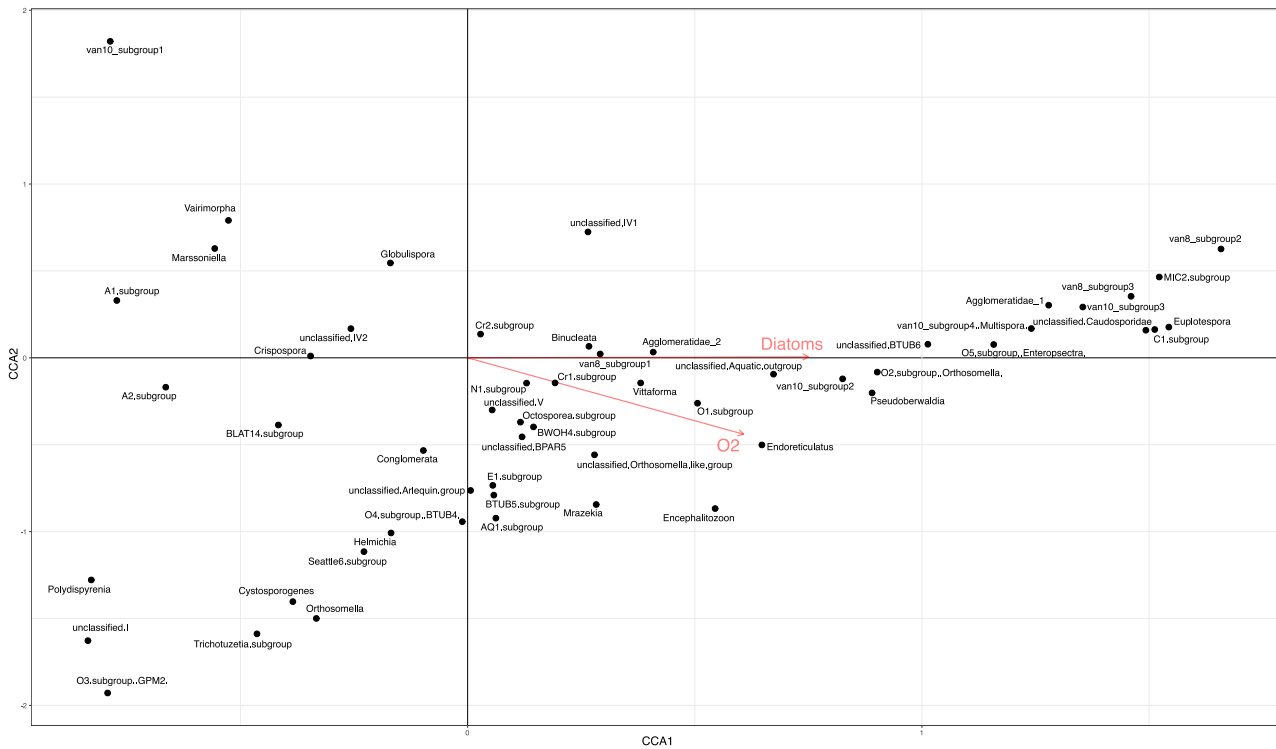
Co-occurrences involving eukaryotic OTUs not affiliated to a phylum and/or microsporidian OTUs not affiliated to a genus/subgroup are not shown.



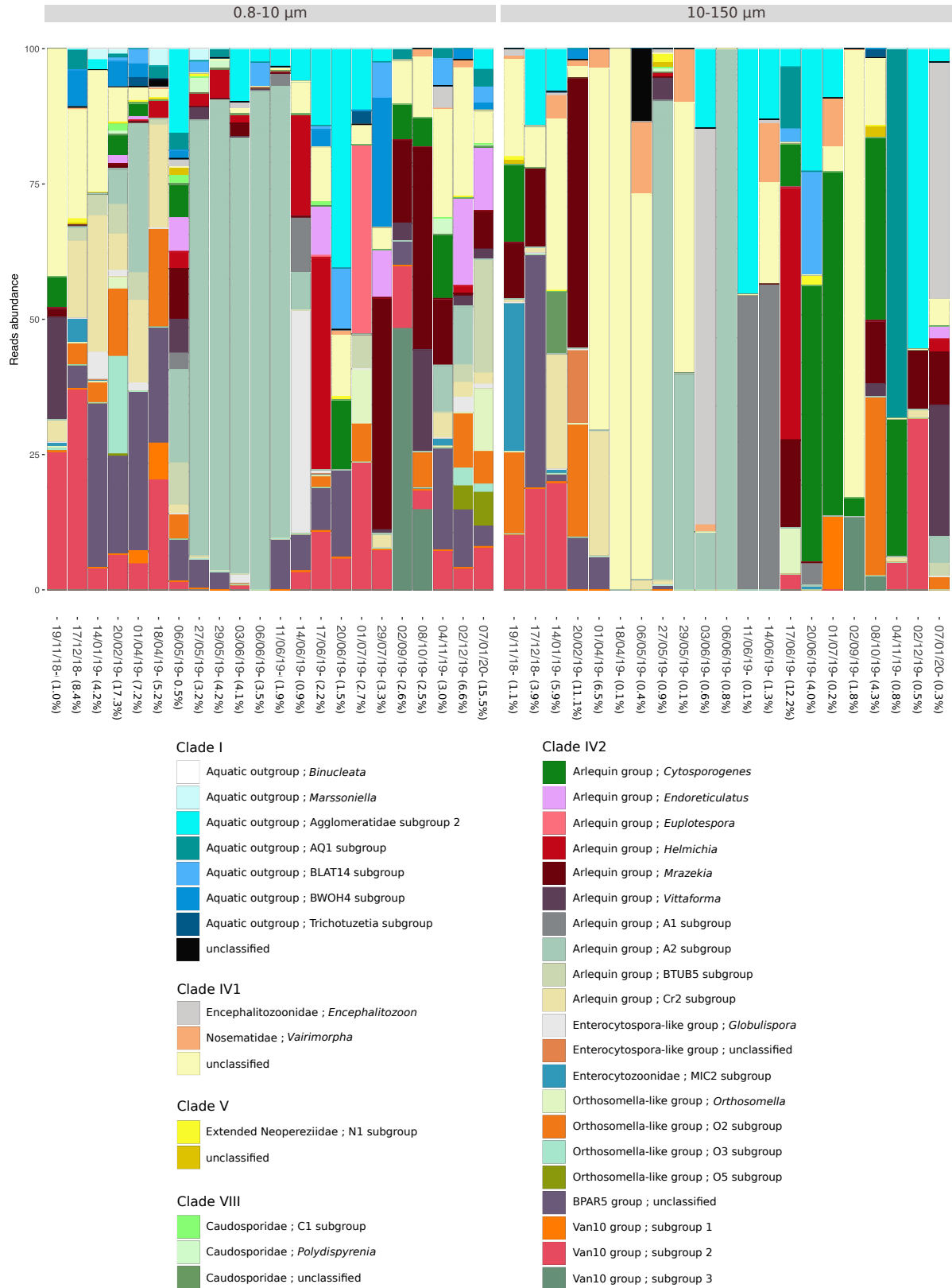
Supplementary Information 11: Microsporidia (targeted by TSA-FISH with the USP01 probe) in association with unidentified hosts.

Under UV showing nucleus after DAPI staining (a, d), under blue light showing Microsporidia in green fluorescence (b, e), overlay (c, f).

Scale bars, 10 μm

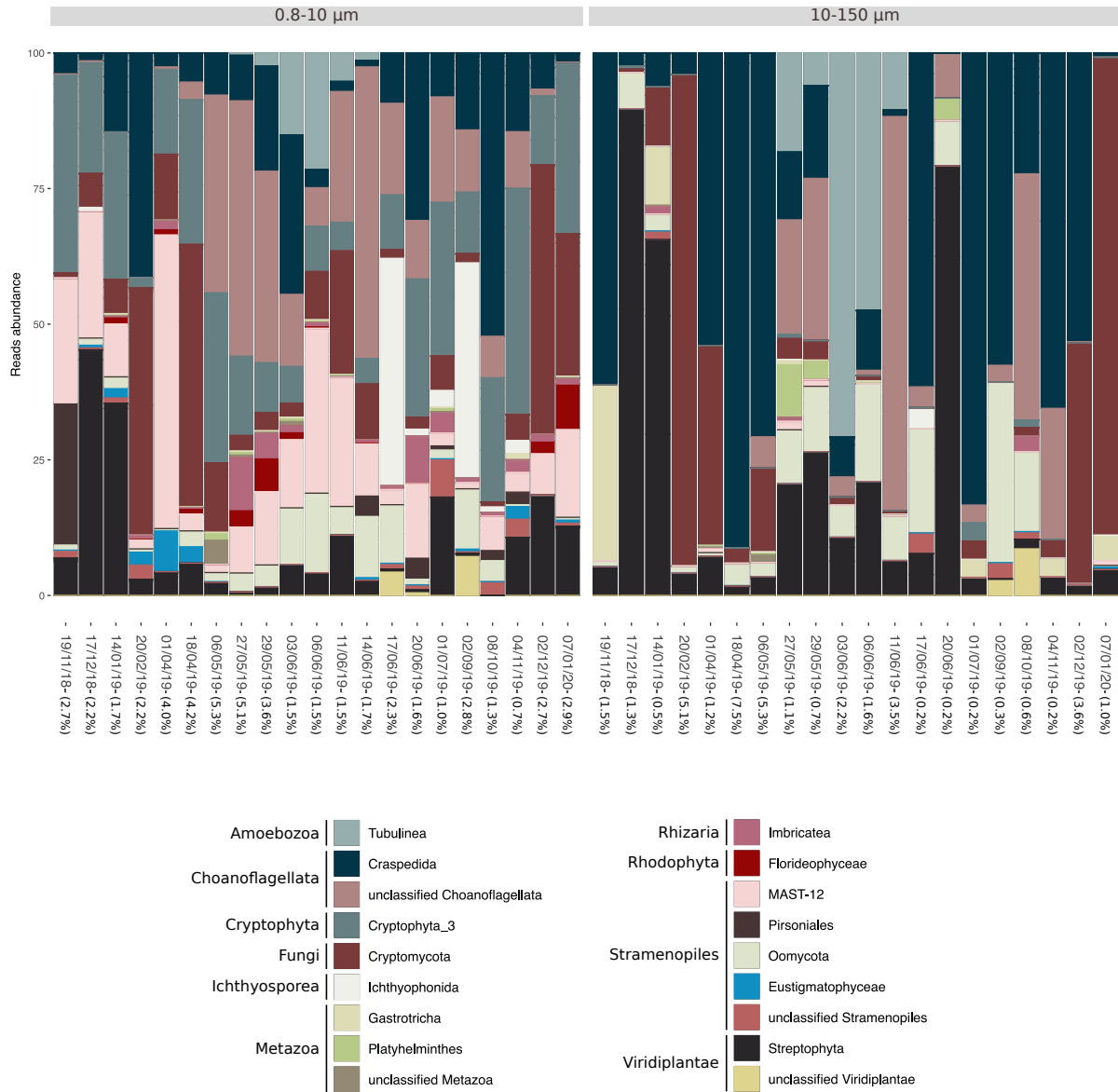


Supplementary Information 12: Canonical correspondence analysis (CCA) of the microsporidian subgroups/genera (points) including the two significant variable (diatoms and oxygen, $p < 0.001$) among the following tested: temperature, oxygen and photosynthetic pigment concentration (green algae, Cyanobacteria, diatoms, Cryptophyta and total pigment concentration).



Supplementary Information 13: Relative abundances of the less abundant (<0.5% of the total reads) microsporidian genera/subgroups across DNA samples.

Numbers given in brackets represents the proportion of reads grouping phyla with a total abundance <0.5%. Label = sampling date (DD/MM/YY)



Supplementary Information 14: Relative abundances of the less abundant (<0.5% of the total reads) eukaryotic phyla across DNA samples.

Numbers given in brackets represents the proportion of reads grouping phyla with a total abundance <0.5%. Label = sampling date (DD/MM/YY)

CHAPITRE V

DÉCOUVERTE D'UNE NOUVELLE ASSOCIATION
HÔTE-MICROSPORIDIE DANS UN LAC D'EAU
DOUCE PAR SINGLE CELL

Contexte de l'étude

Les hôtes des microsporidies en milieu aquatique sont généralement identifiés suite à des études ciblées sur des hôtes d'intérêt (*e.g.* daphnies, poissons, crustacés). De nombreuses études ont par exemple porté sur les microsporidies parasites de poissons et crustacés comestibles représentant un intérêt économique (Schuster *et al.*, 2022) ou encore sur les daphnies, des organismes bioindicateurs d'eau douce (Vávra *et al.*, 2019). Les microsporidies peuvent par ailleurs avoir des effets très importants sur les populations de ces hôtes, tels qu'une réduction importante de la longévité et de la fécondité ou encore une augmentation de la vulnérabilité vis-à-vis des prédateurs (*e.g.* Ebert, 2005). Les chapitres III et IV ont montré que la diversité des microsporidies était largement sous-estimée dans des fractions de taille abritant principalement des protistes et des organismes microplanctoniques (Dubuffet *et al.*, 2021 ; Chauvet *et al.*, 2022). Dans le chapitre IV nous avons en particulier mis en évidence de nouvelles associations entre microsporidies et rotifères. En effet, grâce à une sonde spécifique des microsporidies, nous avons observé des rotifères parasités, avec une prévalence moyenne de 38% d'individus infectés. Des espèces de rotifères appartenant aux genres *Brachionus* et *Asplanchna* ont déjà été décrites en association avec des microsporidies (observations morphologiques uniquement ; Gorbunov et Kosova, 2001 ; Wolska et Mazurkiewicz-Zapalowicz, 2013) mais les rotifères impliqués dans cette association ont été identifiés morphologiquement comme appartenant au genre *Kellicottia*, jusqu'ici jamais décrit comme hôte de microsporidies.

L'objectif de ce chapitre était ainsi de confirmer qu'une gamme plus importante de rotifères qu'initialement décrite pouvait être parasitée par des microsporidies, et de caractériser moléculairement et *via* des observations microscopiques les deux partenaires. Nous avons pour cela prélevé puis isolé manuellement un à un des rotifères de genres différents du lac d'Aydat. Les individus uniques ont ensuite été criblés pour détecter la présence de microsporidies grâce aux amorces spécifiques utilisées dans les chapitres précédents, les associations hôte-parasite ont également été confirmées par l'approche d'hybridation *in situ*.

Single Cell Analysis Reveals a New Microsporidia-Host Association in a Freshwater Lake

Marina Chauvet*, Arthur Monjot*, Anne Moné, Cécile Lepère¹

* These authors contributed equally to this work

¹ Corresponding author: cecile.lepere@uca.fr

CNRS, Laboratoire Microorganismes : Génome Et Environnement, Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

Publié dans *Microbial Ecology* – Mai 2022

doi: 10.1007/s00248-022-02023-7

I. Abstract

Microsporidia are a large group of obligate intracellular eukaryotic parasites. Recent studies suggest that their diversity can be huge in freshwater lake ecosystems especially in the < 150- μ m size fraction. However, little is known about their hosts and therefore their impact on the trophic food web functioning. In this study, single cell analysis and fluorescence microscopy were used to detect new host-parasite association within rotifer communities in lake Aydat (France). Our analysis showed the existence of a potential new species belonging to the *Crispospora* genus able of infecting the rotifer *Kellicottia* with a high prevalence (42.5%) suggesting that Microsporidia could have a great impact on the rotifer populations' regulation in lakes.

II. Note

Microsporidia are obligate intracellular eukaryotic parasites related to Fungi. They are mostly known to parasitize a broad range of hosts among the animal kingdom in different environments [1]. Recent metabarcoding studies revealed an unexpected diversity in lake ecosystems especially in the < 150- μ m size fraction suggesting that Microsporidia could have an impact on the planktonic communities at the base of the food web [2, 3]. However, they have rarely

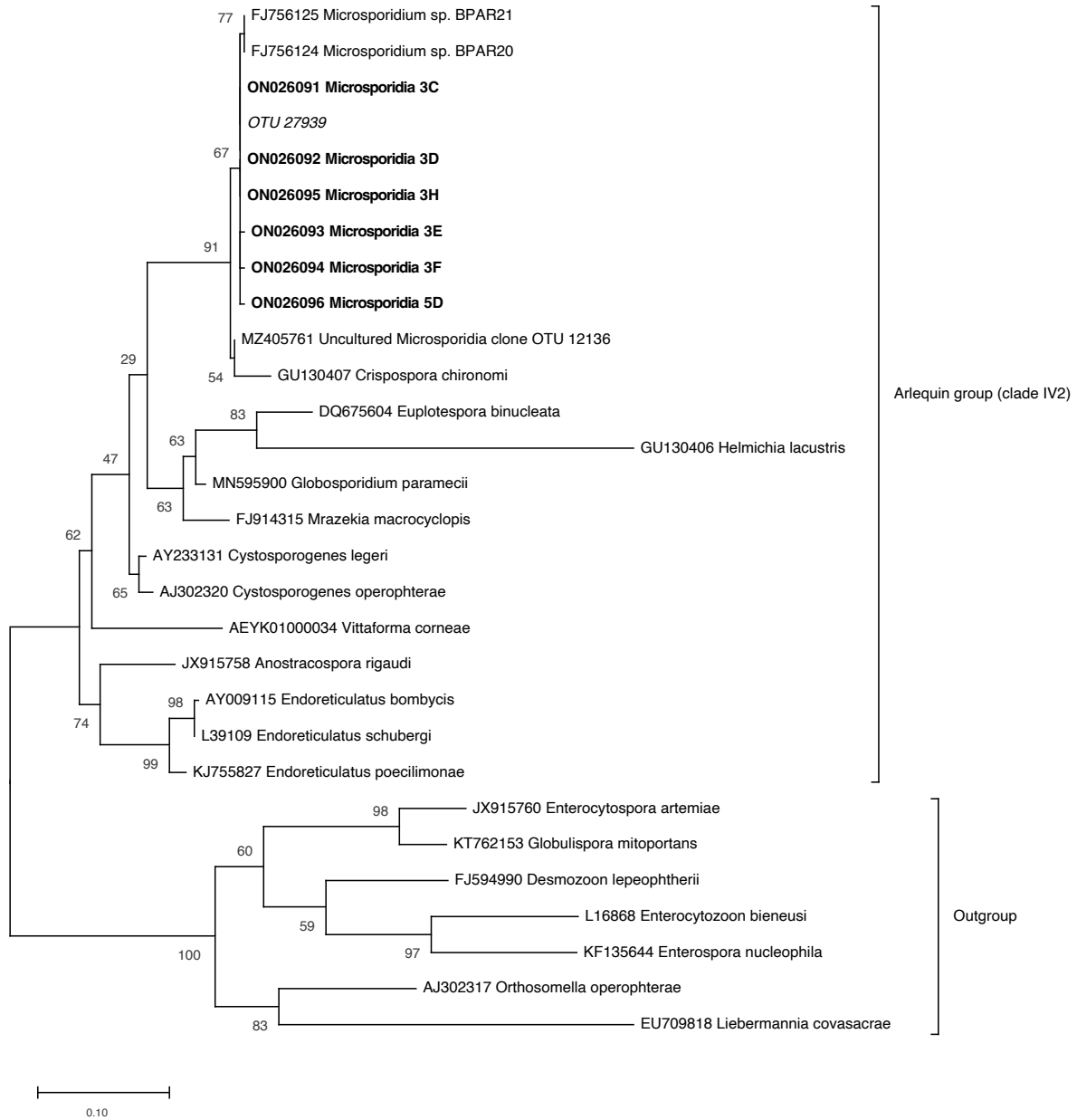


Figure 33: Maximum likelihood phylogeny of microsporidian sequences.

We included in this phylogeny several sequences from undescribed microsporidian species (found through BLAST search) and a sequence found extensively in a previous study (in italic, [3]), in addition to described species, all belonging to the Arlequin group (clade IV2). Sequences from this study are given in bold. Outgroup species are representative species of other groups belonging to clade IV2. Numbers next to branches indicate the ML boot-strap support (100 replicates).

been described as parasites of protists and microzooplankton. In marine environments, they are mainly known to parasitize gregarines (e.g. [4]), but they were also shown in association with *Paramyxea* [5]. In freshwaters, only a few observations showed Microsporidia parasitizing ciliates with only two microsporidian species characterized by morphological and molecular approaches (*Euplotespora binucleata* and *Globosporidium paramecii* parasitizing the ciliates *Euplotes woodruffi* and *Paramecium aurelia*, respectively [6, 7]). Among microzooplankton, Microsporidia have been observed in the rotifers *Brachionus calyciflorus* as well as in *Asplanchna priodonta* and *A. brightwellii* in both river and freshwater lakes [8, 9]; however, these observations (no molecular data) remain sporadic and for most at low prevalence. Moreover, with co-occurrence network and microscopic observations, a more recent study suggested that Microsporidia could infect a broader range of rotifers [3]. We therefore used, in this study, single cell analysis as well as Tyramide Signal Amplification – Fluorescent *In Situ* Hybridization (TSA-FISH) to detect new host-parasite association within microzooplankton communities in a lake ecosystem (lake Aydat, Massif Central, France) and especially (i) confirm the hypothesis raised about the broader range of rotifers parasitized by Microsporidia and (ii) characterize by molecular information and microscopic observation both partners.

Zooplankton was sampled with vertical tows of 20- μ m-mesh plankton net at the central point of the lake (depth = 14 m) on the 18/05/2021 (see Supplementary Material). Seventeen rotifers, identified morphologically as probably belonging to the genera *Kellicottia* ($n = 13$) and *Keratella* ($n = 4$), were isolated by micromanipulation and individually placed in a 96-wells plate before Whole Genome Amplification (WGA) (see Supplementary Material). The Single Amplified Genomes (SAGs) were then screened for the presence of Microsporidia by the amplification of the V1–V3 region of the microsporidian gene coding for the SSU rRNA according to Chauvet *et al.* [3]. The sequences obtained after cloning and sequencing were compared to those available in public databases and included in a phylogenetic tree (see Supplementary Material). This analysis showed that on the 17 isolated rotifers, 6 *Kellicottia* had a positive PCR amplification signal with Microsporidia primers; however, no Microsporidia amplification was recorded in *Keratella*. All Microsporidia sequences were affiliated to the genus *Crispospora* (**Fig. 33**) which is affiliated to the clade IV2; Arlequin group (defined in Dubuffet *et al.* [2]), and well represented (~ 50% of the total OTUs) in metabarcoding studies conducted in lake Aydat [2, 3]. With 97% identity with *Crispospora chironomi* (the only known species of the genus so far), these sequences could represent a new species of the *Crispospora* genus (Fig. S2a). Indeed, although thresholds for species delineation

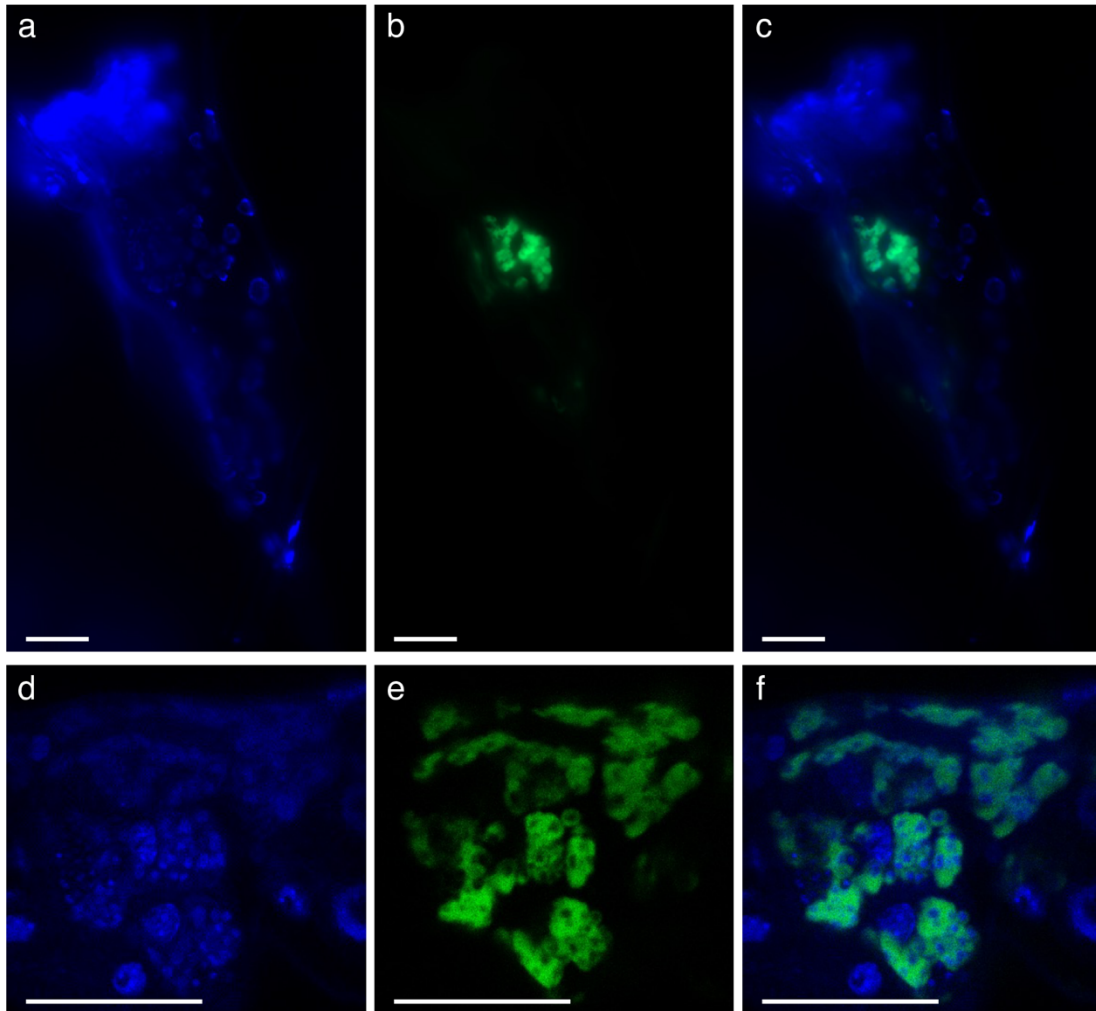


Figure 34: Microsporidia (targeted by TSA-FISH with the USP01 probe, [3]) infecting a rotifer (genus *Kellicottia*).

Under UV showing nucleus after DAPI staining (a), under blue light showing Microsporidia in green fluorescence (b), overlay (c). Magnification on microsporidian cells inside a rotifer with a confocal microscope (UV (d), blue light (e), overlay (f)). Scale bars, 20 μm

may vary, an identity close to 100% is suggested for taxa separation at the species level for Microsporidia [2, 10]. *Crispospora chironomi* is known to parasitize chironomids eggs [11] that can be found in aquatic environments especially when they are eutrophic and anthropized [12]. On the Microsporidia positive SAGs, rotifers were characterized by amplification of the COI using the 30F and 885R primers set according to Zhang *et al.* [13] with some modifications (see Supplementary Material). The rotifer affiliation analysis revealed that this potential new species of *Crispospora* is able to parasitize the genus *Kellicottia* (Fig. S1). Even though *Kellicottia* sequences grouped into two clades in the phylogenetic analysis, species determination is challenging due to high intraspecific variation of identity percent which can be higher than 20% for rotifers (Fig. S2b) [14].

To visualize and quantify Microsporidia-rotifer associations, TSA-FISH was performed on the rest of the plankton net sample, using a Microsporidia specific probe (USP01) according to Chauvet *et al.* [3] (see Supplementary Material). Positive signals were obtained in *Kellicottia* rotifers with a surprisingly high prevalence (42.5%, total rotifers observed = 73) (**Fig. 34**). Microsporidia were so far recorded in a small number of rotifers [8, 9]. *Microsporidium* sp. and *Microsporidium asperospora* have been observed in *Brachionus calyciflorus*, and *Microsporidium polygona* in *Asplanchna priodonta* and *A. brightwellii* in freshwater ecosystems most of the time at low prevalence (e.g., *Brachionus calyciflorus* by *Microsporidium* sp. on 1.2% of the host population, [9]). However, these descriptions were only morphological and neither the site of infection nor the microsporidian spore or intracellular form was described. Here, we identified an infection which could be in the rotifer's stomach or pseudocoelom. The intracellular forms of the Microsporidia were on average 1.53 μm long, most being oval, some spherical. These findings were consistent with the described shape of the only known *Crispospora* species (*i.e.*, *Crispospora chironomi*), with two shapes identified: short oval and spherical, with a size of $1.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ and $1.5 \times 2 \mu\text{m}$, respectively [11].

This finding is highly relevant since Microsporidia, along with hyphomycetes and oomycetes [15, 16], could be an important regulator of these populations in lakes. Rotifers are indeed an important component of plankton in aquatic ecosystems playing fundamental role in both microbial loop and classical food web and as a link in energy flow between primary producers (algae, cyanobacteria) and higher trophic levels (zooplankton, shellfish, fish) [17]. *Kellicottia* can reach 600 ind./l in lake Aydat and is the most abundant rotifers along with *Keratella* [18]. Microsporidia sequences retrieved during this study had an identity > 99% with a highly abundant OTU identified in the same lake in a previous study where the temporal dynamic of the Microsporidia diversity was analyzed over 1 year [3] (Fig. S2a). This *Crispospora* OTU

and the only OTU affiliated to *Kellicottia* presented the same pattern of temporal variations (data not shown). This co-variation and the high prevalence of this association suggest an impact on the dynamic of *Kellicottia* in the lake; however, this needs to be confirmed for example by the culture of both partners which will also allow the characterization of the developmental cycle of this potential new species of Microsporidia.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Jonathan Colombet and Eugénie Carriere for their help with sampling. We also gratefully acknowledge the platform CLIC (CLermont-ferrand Imagerie Confocale, Université Clermont Auvergne) and especially Caroline Vachias for her assistance with the confocal microscopy. The work of MC and AM was supported by two PhD fellowships funded by the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation'.

Data Availability

All data and material are available in this publication and additional information online (supplementary material and supplementary figures). Sequences are available on GenBank, accession numbers from ON026091 to ON026096 for the microsporidian sequences and from ON033621 to ON033624 for the rotifers.

Competing Interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Murareanu BM, Sukhdeo R, Qu R, Jiang J, Reinke AW (2021) Generation of a Microsporidia species attribute database and analysis of the extensive ecological and phenotypic diversity of Microsporidia. *mBio* 12:e01490-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.01490-21>
2. Dubuffet A, Chauvet M, Moné A, Debroas D, Lepère C (2021) A phylogenetic framework to investigate the microsporidian communities through metabarcoding and its application to lake ecosystems. *Environ Microbiol* 23:4344–4359. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15618>
3. Chauvet M, Debroas D, Moné A, Dubuffet A, Lepère C (2022) Temporal variations of Microsporidia diversity and discovery of new host-parasite interactions in a lake ecosystem. *Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15950>
4. Mikhailov KV, Simdyanov TG, Aleoshin VV (2016) Genomic survey of a hyperparasitic Microsporidian *Amphiamblys* sp. (Metchnikovellidae). *Genome Biol Evol* 9:454–467. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw235>
5. Stentiford GD, Ramilo A, Abollo E, Kerr R, Bateman KS, Feist SW et al (2017) *Hyperspora aquatica* n.gen., n.sp. (Microsporidia), hyperparasitic in *Marteilia cochillia* (Paramyxida), is closely related to crustacean-infecting microsporidian taxa. *Parasitology* 144:186–199. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001633>
6. Fokin SI, Di Giuseppe G, Erra F, Dini F (2008) *Euplotespora binucleata* n. gen., n. sp. (Protozoa: Microsporidia), a parasite infecting the hypotrichous ciliate *Euplotes woodruffi*, with observations on microsporidian infections in ciliophora. *J Eukaryot Microbiol* 55:214–228. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00322.x>

7. Yakovleva Y, Nassonova E, Lebedeva N, Lanzoni O, Petroni G, Potekhin A et al (2020) The first case of microsporidiosis in *Paramecium*. *Parasitology* 147:957–971. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000633>
8. Gorbunov AK, Kosova AA (2001) Parasites in rotifers from the Volga delta. *Hydrobiologia* 446:51–55. <https://doi.org/10.1023/A:1017569004998>
9. Wolska M, Mazurkiewicz-Zapalowicz K (2013) Parasites of zooplankton and periphyton assemblages in the littoral zone of lakes in Drawa National Park, Poland. *Acta Mycol* 48:51–59. <https://doi.org/10.5586/am.2013.007>
10. Tokarev YS, Huang W-F, Solter LF, Malyshev JM, Becnel JJ, Vossbrinck CR (2020) A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *J Invertebr Pathol* 169:107279. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279>
11. Tokarev YS, Voronin VN, Seliverstova EV, Pavlova OA, Issi IV (2010) Life cycle, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Crispospora chironomi* g.n. sp.n. (Microsporidia: Terresporidia), a parasite of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *Parasitol Res* 107:1381–1389. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2012-x>
12. Langdon PG, Ruiz Z, Brodersen KP, Foster IDL (2006) Assessing lake eutrophication using chironomids: understanding the nature of community response in different lake types. *Freshw Biol* 51:562–577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01500.x>
13. Zhang Y, Xu S, Sun C, Dumont H, Han B-P (2021) A new set of highly efficient primers for COI amplification in rotifers. *Mitochondrial DNA B* 6:636–640. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1878951>
14. Zhang Y-N, Xu S-L, Huang Q, Liu P, Han B-P (2021) Application of COI primers 30F/885R in rotifers to regional species diversity in (sub)tropical China. *Diversity* 13:390. <https://doi.org/10.3390/d13080390>
15. Barron GL, Szijarto E (1990) A new genus of the hyphomycetes endoparasitic in rotifers. *Mycologia* 82:134–137. <https://doi.org/10.2307/3759974>
16. Thomas SH, Housley JM, Reynolds AN, Penczykowski RM, Kenline KH, Hardegee N et al (2011) The ecology and phylogeny of oomycete infections in *Asplanchna* rotifers: oomycete infections in *Asplanchna*. *Freshw Biol* 56:384–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02505.x>
17. Rico-Martínez R, Arzate-Cardenas MA, Robles D, Pérez-Legaspi I, Alvarado-Flores J, Santos Medrano GE (2016) Rotifers as models in toxicity screening of chemicals and environmental samples. In: *Invertebrates – experimental models in toxicity screening*. InTech, London, pp 57–99. <https://doi.org/10.5772/61771>
18. Lair N, Oulad Ali H (1990) Grazing and assimilation rates of natural populations of planktonic rotifers *Keratella cochlearis*, *Keratella quadrata* and *Kellicottia longispina* in a eutrophic lake (Aydat, France). *Hydrobiologia* 194:119–131. <https://doi.org/10.1007/BF00028413>

Supplementary Material and Methods

Sampling

This study was conducted in lake Aydat (Massif Central, France, 45°39' 50" N, 2° 59' 04" E). It is a dimictic and eutrophic lake with a maximum depth of 15 m, situated at an altitude of 825 m. 150 ml of water concentrated in zooplankton was sampled using vertical tows of 20 µm-mesh plankton net and kept at RT until the next day.

Single cell isolation

17 rotifers were isolated by micromanipulation. A drop of the plankton net sample diluted with distilled water was placed in the center of a medium sized petri dish. Using an inverted microscope (Axio Vert.A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and a stretched capillary, rotifers were individually collected. Each rotifer was then placed in a 96 wells plate in which 1 µl of PBS was previously deposited. After centrifugation, the 96 wells plate was stored at -80 °C until further processing.

Host-Parasite characterization

Whole Genome Amplification (WGA) was carried out using the GenomiPhi™ V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Chicago, IL). Briefly, the cells underwent 5 cycles of thermic lysis (alternatively, bowled water and liquid nitrogen). The sorted cells were chemically lysed with the addition of 1 µl of an alkaline solution (400 mM KOH, 100 mM DTT and 10 mM EDTA) and incubated at RT for 10 min. Lysed samples were neutralized with 1 µl of neutralization buffer (HCL 400 mM, Tris-HCl 600 mM pH 7.5). 7 µl of sample buffer was added and incubated 3 min at 95 °C. A total of 10 µl of master mix was added (9 µL of reaction buffer and 1 µl of Phi29 DNA polymerase) and the plate was incubated at 30 °C for 16 h. A final incubation at 65 °C for 10 min inactivated the Phi29 DNA polymerase. The amplification reactions were stored at -20 °C.

After the WGA, the Single Amplified Genomes (SAGs) were screened for the presence of Microsporidia by the amplification of the V1-V3 region of the microsporidian gene coding for the SSU rRNA according to Chauvet *et al.* [1]. Microsporidia positive PCR products were then cloned into pCR 2.1-TOPOs vectors (TA cloning kit, Invitrogen, Carlsbad, CA) and transformed into *Escherichia coli* competent cells following the manufacturer's instructions. The presence of the target small-subunit rRNA gene insert in positive colonies was checked by PCR amplification using flanking vector primers (M13f and M13r). PCR products purified with

QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) were sequenced using Sanger technology (Eurofins Genomics, Luxembourg, Luxembourg). The sequences were then compared with those available in public databases with the NCBI BLAST web application (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) and included in a phylogenetic tree after an alignment using the MAFFT algorithm [2]. Maximum Likelihood tree was obtained using IQ-TREE [3] with the ModelFinder [4] tool to find the best predicted model of evolution (TVM+F+I+G4) according to the BIC score, with 100 bootstrap replications. Average Nucleotide Identities (ANIs) between sequences were determined using PYANI tool v0.2.11 [5].

On the Microsporidia positive SAGs, rotifers were characterized by amplification of the COI using the 30F and 885R primers set according to Zhang *et al.* [6] with the following modifications. Each PCR was performed in a total volume of 20 µL including 4 µl of 5x Green GoTaq Flexi buffer, 1.6 µl of 25 mM MgCl₂, 0.4 µl of 10 mM each dNTP, 0.4 µl of each 10 µM primer, 0.2 µl of 50 mg/mL BSA, 0.12 µl of GoTaqG2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, 5 U/µL) and 1 µl of DNA sample. The amplification conditions consisted of an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles for 30 s at 95 °C, 40 s at 51 °C and 30 s at 72 °C, and a final elongation at 72 °C for 10 min. PCR products underwent the same protocol previously detailed for Microsporidia characterization. The Maximum Likelihood tree was obtained using the best predicted model of evolution (GTR+G+I) according to the BIC score, with 200 bootstrap replications and partial deletion (85%), using MEGA11 [7].

Tyramide Signal Amplification – Fluorescent In Situ Hybridization (TSA-FISH)

TSA-FISH was performed using a Microsporidia specific probe (USP01) according to Chauvet *et al.* [1]. Hybridized cells were visualized under a Zeiss Axio Imager 2 microscope and confocal images were acquired with a Zeiss LSM 980 microscope.

References (Supplementary Material and Methods)

1. Chauvet M, Debroas D, Moné A, Dubuffet A and Lepère C (2022) Temporal variations of Microsporidia diversity and discovery of new host-parasite interactions in a lake ecosystem. *Environ Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15950>
2. Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33:511–518. <https://doi.org/10.1093/nar/gki198>
3. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 32:268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

4. Kalyaanomoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin LS (2017) ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* 14: 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
5. Pritchard L, Glover RH, Humphris S, Elphinstone JG, Toth IK (2015) Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal Methods* 8:12–24. <https://doi.org/10.1039/C5AY02550H>
6. Zhang Y, Xu S, Sun C, Dumont H, Han B-P (2021) A new set of highly efficient primers for COI amplification in rotifers. *Mitochondrial DNA B* 6:636–640. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1878951>
7. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Supplementary Figures

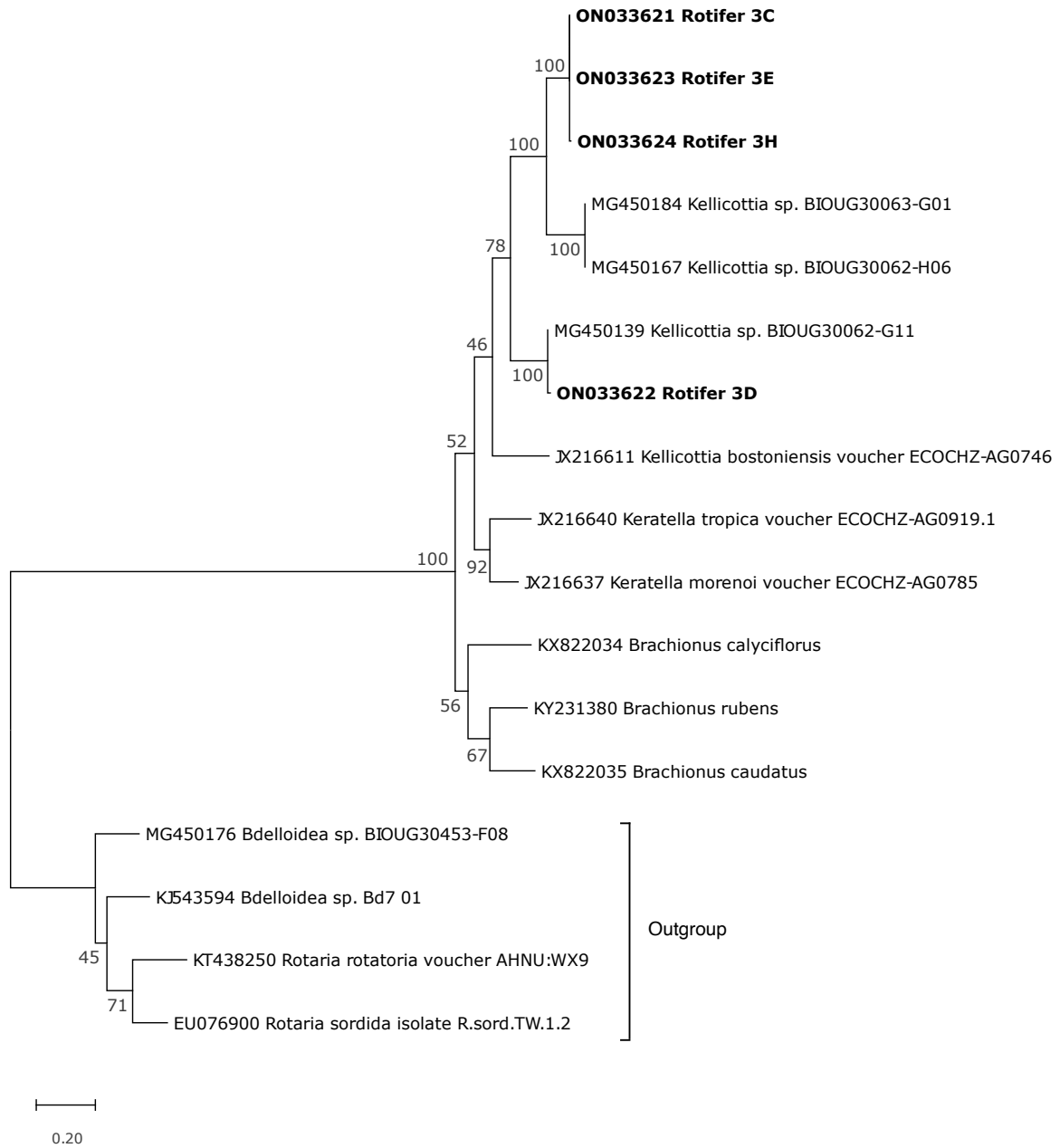
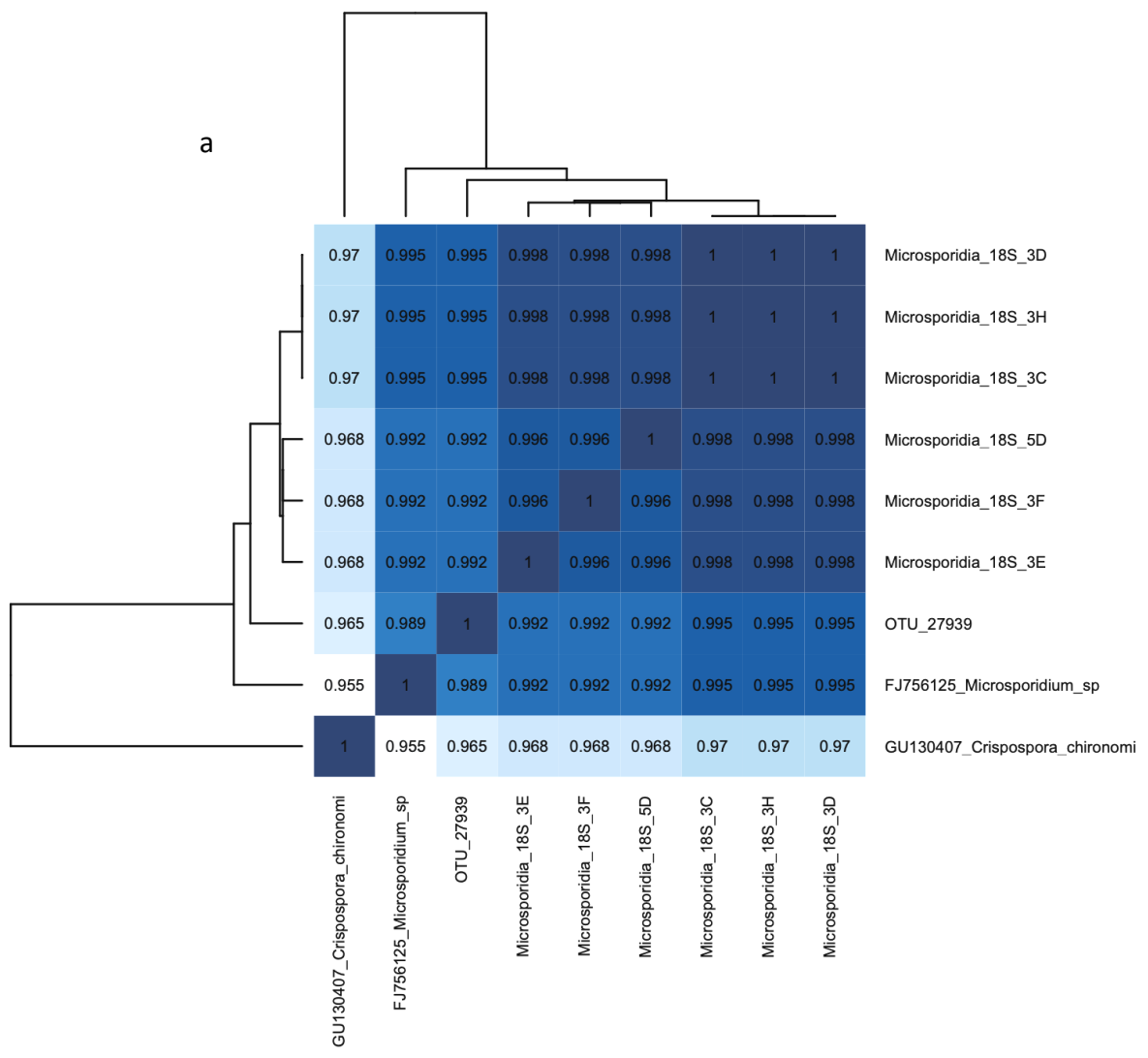


Fig. S1: Maximum Likelihood phylogeny of rotifer sequences.

We included in this phylogeny several sequences of environmental *Kellicottia* [1] and sequences of identified rotifer species. Sequences from this study are given in bold. Outgroup species are rotifers belonging to the Bdelloidea subclass. Numbers next to branches indicate the ML bootstrap support (200 replicates).



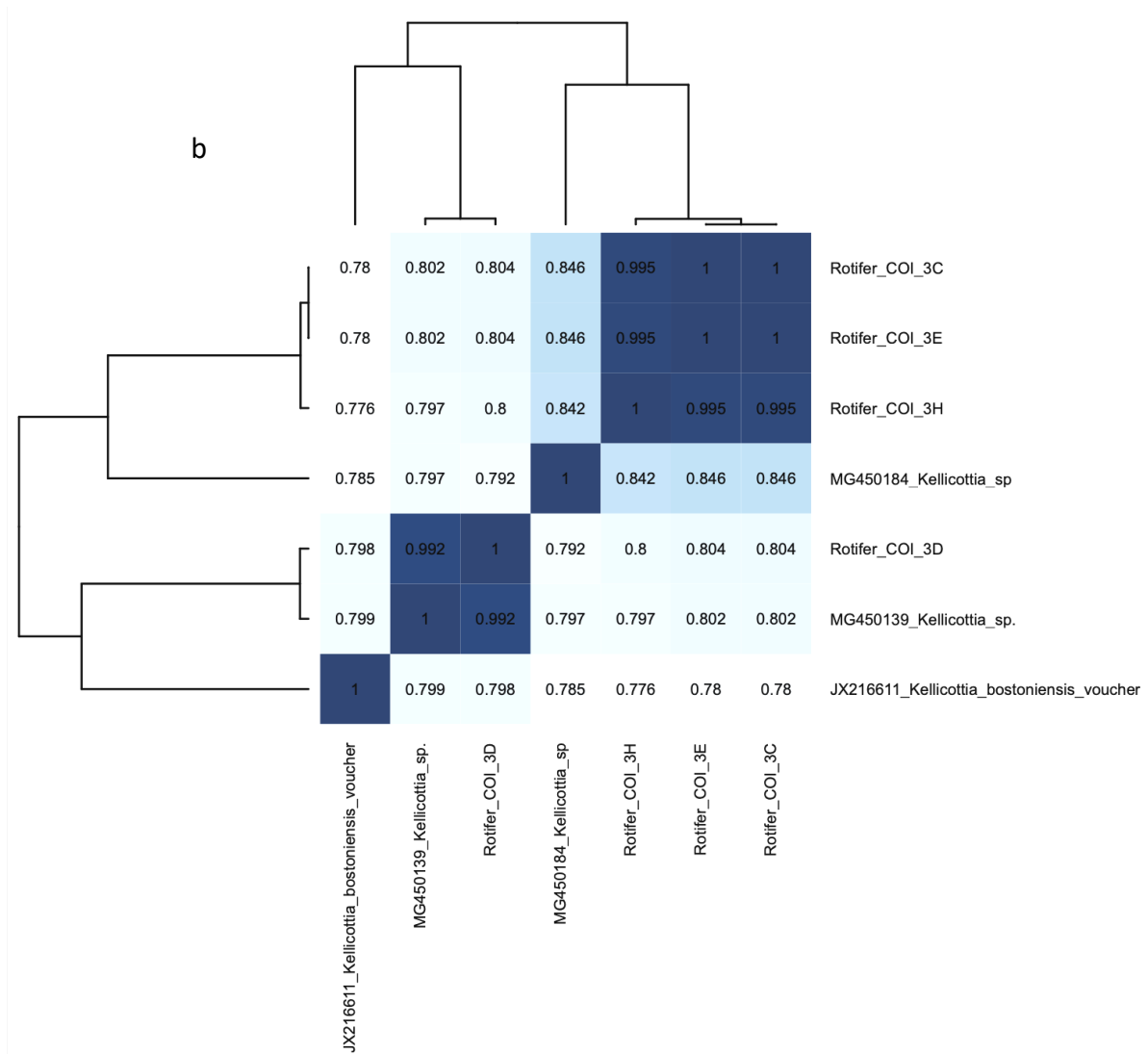


Fig. S2: Heatmap of the Average Nucleotide Identity (ANI) of Microsporidia (a) and *Kellicottia* (b) sequences included in the phylogenetic analyses.

Reference (Supplementary Figure)

1. Elías-Gutiérrez M, Valdez-Moreno M, Topan J, et al (2018) Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton. *Ecol Evol* 8:3002–3018. <https://doi.org/10.1002/ece3.3742>

CHAPITRE VI

DIVERSITÉ DES MICROSPORIDIES ET HÔTES PLANCTONIQUES : DES LACS AUX OCÉANS

Contexte de l'étude

Les résultats obtenus dans les chapitres III et IV montrent une diversité de microsporidies jusqu'ici insoupçonnée dans les environnements lacustres. En effet, ces études ont révélé une large diversité dont une proportion importante (entre 40 et 50%) non affiliée à des genres décrits, suggérant que le groupe des microsporidies renferme une importante diversité de genres et d'espèces inconnus. Des variations spatio-temporelles considérables ont également été observées, encourageant ainsi de futurs travaux. Ces études se sont cependant limitées à deux écosystèmes lacustres. En 2018, Williams et collaborateurs ont initié l'étude de la diversité des microsporidies en milieu aquatique, incluant notamment des échantillons marins, mais cette étude n'a permis qu'une analyse limitée en raison du faible nombre d'OTUs obtenu. Dans l'ensemble, ces études ont ouvert la voie à la caractérisation de la diversité globale des microsporidies en milieu aquatique, mais n'ont pas permis une large comparaison de cette diversité. De plus, les chapitres IV et V confortent l'hypothèse selon laquelle les microsporidies pourraient jouer un rôle important dans la régulation des communautés à la base du fonctionnement du réseau trophique.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre était donc d'évaluer la diversité des microsporidies à une échelle spatiale plus large. Nous avons ainsi échantillonné un plus grand nombre d'écosystèmes d'eau douce (9) couvrant un large panel de conditions environnementales (statut trophique, profondeur, altitude, *etc.*) et nous avons également ajouté des sites marins (6) pour combler le manque de données sur cet environnement. Nous avons également recherché de potentiels nouveaux hôtes dans ces deux types d'écosystèmes *via* des analyses de cooccurrence et d'hybridation *in situ*.

Microsporidian diversity and planktonic hosts: from lakes to ocean

Marina Chauvet¹, Arthur Monjot, Cécile Lepère

¹ Corresponding author: chauvet.marina.pro@gmail.com

CNRS, Laboratoire Microorganismes : Génome Et Environnement, Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

En révision (Limnology and Oceanography)

I. Abstract

Microsporidia are a large group of obligate intracellular eukaryotic parasites related to Fungi primarily known as parasites of vertebrates and invertebrates. They are well described as parasites of organisms of interest (*e.g.* edible fish and crustaceans, honeybees, bioindicators, humans) on which they can have an important impact (reduced survival or fecundity and sex ratio distortion, for example). However, their diversity in aquatic environments, especially in marine ecosystems, has been greatly understudied since they are not targeted by classical eukaryotic primers used in metabarcoding studies. Moreover, little is known about their hosts among protists or micro-zooplankton and therefore about their impact on the trophic food web functioning. In this work, we sampled 15 different sites across marine and freshwater environments, size-fractionated the samples and used microsporidian specific primers associated with metabarcoding to study the microsporidian diversity (and the associated spatial variation). Co-occurrence networks as well as Tyramide Signal Amplification-Fluorescent *In Situ* Hybridization were used to link potential hosts (planktonic eukaryotes < 150 µm) and Microsporidia diversity. Our analysis unraveled a large microsporidian diversity which was widely divergent between the two environments studied. In both of them, an important part of this diversity was not affiliated to a genus, suggesting an important reservoir of new microsporidian species and thus new hosts among planktonic eukaryotes. Co-occurrence networks and fluorescence microscopy showed for the first time associations between Microsporidia and dinoflagellates in freshwater and marine environments.

II. Introduction

Parasitism has been described as one of the oldest and most ubiquitous interactions in nature (Cavalier-Smith, 1993), however the diversity of parasites and their effects on the aquatic trophic food web functioning have long been neglected (Marcogliese and Cone, 1997). In the last decades, high throughput sequencing allowed the description of an increasing number of parasites (*e.g.* Singer *et al.*, 2021) and revolutionized our understanding of aquatic food webs in term of trophic interactions as well as of energy and biomass flows (Lafferty *et al.*, 2008; Kagami *et al.*, 2014). Among these parasites, Microsporidia (obligate intracellular eukaryotic parasites related to Fungi (Karpov *et al.*, 2014)) were known in aquatic ecosystems only through the search of infectious agent in organisms of interest (*e.g.* edible fish and crustaceans, bioindicators, humans, etc.). These host-targeted studies show that Microsporidia can have a considerable impact on host populations that are of great importance in freshwater ecosystems, by causing a decrease in the survival and fecundity rates of daphnia for example (Ebert, 2005). However, they were missing from metabarcoding studies focusing on microbial eukaryotes diversity (Bass *et al.*, 2015) especially due to their divergence from other eukaryotes (rapid evolution and compaction of their genome (Keeling and Fast, 2002)) making the primers unable to detect them (Hadziavdic *et al.*, 2014; Hugerth *et al.*, 2014). As a result, the overall microsporidian diversity in aquatic (freshwater and marine) ecosystems is largely unknown and thus their impact on ecosystem functioning is neglected.

In 2018, a targeted metabarcoding study (*i.e.* using specific primer for Microsporidia) presented the first description of the microsporidian diversity in various environments including freshwater and marine samples (Williams *et al.*, 2018), but this allowed only a limited analysis due to the low number of OTUs obtained. This study nevertheless allowed the identification of a new diversity across the microsporidian tree and encouraged further work. Indeed, two others metabarcoding studies focusing on lacustrine ecosystems followed and allowed the discovery of an unsuspected diversity of Microsporidia (Dubuffet *et al.*, 2021; Chauvet *et al.*, 2022a). In these studies, between 40% and 50% of the uncovered diversity couldn't be affiliated to a genus suggesting that the microsporidian phylum hide a large amount of undiscovered diversity. These studies also provided temporal variation data and highlighted new microsporidian planktonic hosts in a small size fraction (*i.e.* <150µm) (Chauvet *et al.*, 2022a, 2022b). Moreover, few Microsporidia are currently described as parasites of protists or microzooplankton (Murareanu *et al.*, 2021), even though they are major components of food webs.

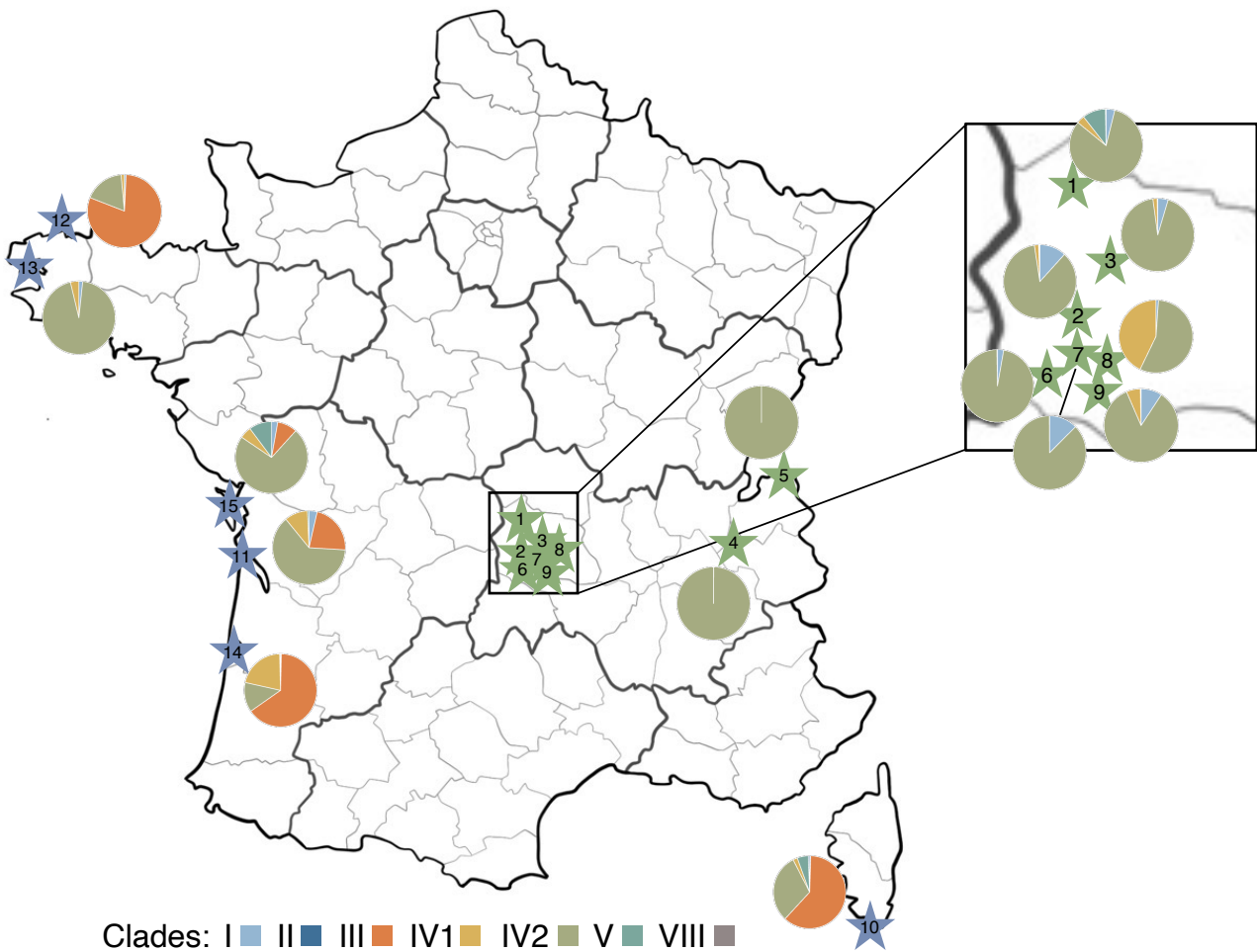


Figure 35: Sample collection sites.

Samples were collected in France from freshwater lakes (green stars): 1 Saint-Gervais (hypereutrophic), 2 Chambon (eutrophic), 3 Aydat (eutrophic), 4 Bourget (oligomesotrophic), 5 Lemans (mesotrophic), 6 Chauvet (oligotrophic), 7 Pavin (oligomesotrophic), 8 Estivadoux (temporary marsh), 9 Bourdouze (oligotrophic); and marine environments (blue stars): 10 Corsica (bay), 11 Royan (estuary), 12 Roscoff (coastal), 13 Brest (bay), 14 Arcachon (bay), 15 La Rochelle (coastal). Pie charts represent the proportions of microsporidian clades identified in each sample.

Altogether, the previous studies did not allow a broad comparison of the diversity of Microsporidia across aquatic ecosystems and thus lead to an incomplete picture of their diversity. Although Dubuffet *et al.* (2021) and Chauvet *et al.* (2022) showed an in-depth description of the microsporidian diversity, these studies were limited to two lakes (Aydat and Pavin, Massif Central, France). Moreover, the microsporidian diversity in marine ecosystems is probably still underestimated as it has been neglected so far. Here, spatial variation of the microsporidian diversity (canonical (or long-branch) Microsporidia (Bass *et al.*, 2018)) was assessed through targeted metabarcoding in nine different freshwater and six marine ecosystems. Co-occurrence and fluorescence microscopy were eventually used to identify potential new microsporidian hosts among microeukaryotes.

III. Materials

1. Study sites and sampling procedure

Water samples were collected in France from different freshwater lakes ($n = 9$) and marine environments ($n = 6$; Mediterranean Sea and Atlantic Ocean) (**Fig. 35**) between 18/06/21 and 27/09/21 (SI1). 2.5 to 22 litres of water were sampled at the surface with a Niskin bottle or along the euphotic zone using an integrated sampler IWS (HYDRO-BIOS, Altenholz, Germany) (SI1).

For most of the samples we collected the 0.8-150 μm fraction to concentrate potentially infected planktonic hosts except for the Brest and Roscoff samples where we were able to collect the >3 μm fraction (SI1). Part of the microbial biomass of each size-fraction was collected on 0.8- μm -pore-size polycarbonate filters (Millipore, Burlington, MA) at a very low vacuum to prevent cell damage (<15 kPa) and stored at -80°C until nucleic acids extraction. For some samples (SI1), the rest of the microbial biomass was fixed with paraformaldehyde (final concentration, 2%), incubated at 4°C for 24 h and collected on 0.8- μm -pore-size polycarbonate filters (Millipore; pressure <15 kPa). Filters were preserved by dehydration in an ethanol series (50, 80, and 100% ethanol for three min each) and stored at -20°C until TSA-FISH staining.

2. Nucleic acids extraction, amplification and sequencing

Filters prepared for DNA extraction were processed as described in Dubuffet *et al.* (2021).

Amplification of the V1-V3 region of the microsporidian gene coding for the SSU rRNA was performed using the universal microsporidian V1F and 530R primers set (Baker *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1994). Each PCR was performed in a total volume of 30 μ L containing 6 μ L of 5x Green GoTaq Flexi buffer, 2.4 μ L of 25 mM MgCl₂, 0.18 μ L of GoTaqG2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, 5 U/ μ L), 0.6 μ L of 10 mM each dNTP, 0.3 μ L of 50 mg/mL BSA and 0.6 μ L of each 10 μ M primer. The amplification conditions consisted of initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 35 cycles for 1 min at 95 °C, 1 min 30 s at 62 °C and 1 min 30 s at 72 °C, and a final elongation of 7 min at 72 °C.

Amplification of the V4 region of total eukaryotes (excluding Microsporidia) was performed using the universal primer 515F (Caporaso *et al.*, 2011) and the eukaryotic primer 951R (Mangot *et al.*, 2013). Each PCR was performed in the mix described above. The amplification conditions consisted of initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 33 cycles for 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C and 1 min 30 s at 72 °C, and a final elongation of 10 min at 72 °C.

The amplicons were purified and concentrated using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). Samples were then sequenced on a MiSeq Illumina instrument (2x250 bp) (Microsynth AG, Balgach, Switzerland).

3. Amplicon analysis and taxonomic affiliation

Sequencing data were processed using the PANAM2 (Phylogenetic Analysis of Next-generation AMplicons v2 - <https://github.com/meb-team/PANAM2>) pipeline (Taib *et al.*, 2013). Sequences with ambiguous 'N' bases, those below 200 bp, chimeras or sequencing errors in the primers were eliminated. The sequences were then assembled (overlap of 50 bp minimum between forward and reverse reads, maximum 2 mismatches in the overlap) and clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) with a similarity threshold of 99% for Microsporidia (Dubuffet *et al.*, 2021) and 95% for other eukaryotes (Mangot *et al.*, 2013; Debroas *et al.*, 2017). The representative sequences of each OTU were affiliated using a custom curated reference database (Freshwater-database: <https://github.com/panammeb/Freshwater-database>). Affiliations to microsporidian groups and genera were considered as valid when the identity

scores were above 85% and 94.5%, respectively (Dubuffet *et al.*, 2021). As clustering threshold used here (especially for Microsporidia) may generate OTUs resulting from sequencing errors, we only kept for the final analysis OTUs representing more than 0.005% (Bokulich *et al.*, 2013) of the total reads. Data were normalized using the SRS (Scaling with Ranked Subsampling) method (Beule and Karlovsky, 2020).

4. Diversity and correlation analyses

Diversity analyses were performed using R (R Development Core Team, 2012). Community richness and diversity indices (Richness observed, Chao1, Shannon and Simpson) were used to infer the taxa richness of Microsporidia. These estimators were computed with the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013) as well as the principal coordinates analysis (PCoA) ordination based on a Bray-Curtis dissimilarity matrix (Bray and Curtis, 1957; Paliy and Shankar, 2016).

As microsporidian and eukaryotic communities' composition were largely different between marine and freshwater samples, the correlation analysis was done on each dataset. To reduce the number of tested hypotheses and focus the analysis on 'abundant OTUs', only those representing more than 0.05% of the reads were retained, representing 302 eukaryotic OTUs and 253 microsporidian OTUs in freshwater and 237 eukaryotic OTUs and 268 microsporidian OTUs in marine ecosystems. Spearman's ρ correlations were calculated, and to decrease false discovery rate due to multiple testing we used Benjamini-Hochberg corrections (Benjamini and Hochberg, 1995). A correlation was considered as valid when $\rho > 0.8$ and the associated p-value < 0.01 . Correlations were then visualized with chord diagrams using the circlize package on R (R Development Core Team, 2012; Gu *et al.*, 2014).

5. TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification-Fluorescent *In Situ* Hybridization)

TSA-FISH was performed using a Microsporidia specific probe (USP01) as described in Chauvet *et al.* (2022a). Observations were performed using a Zeiss Axio Imager 2 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

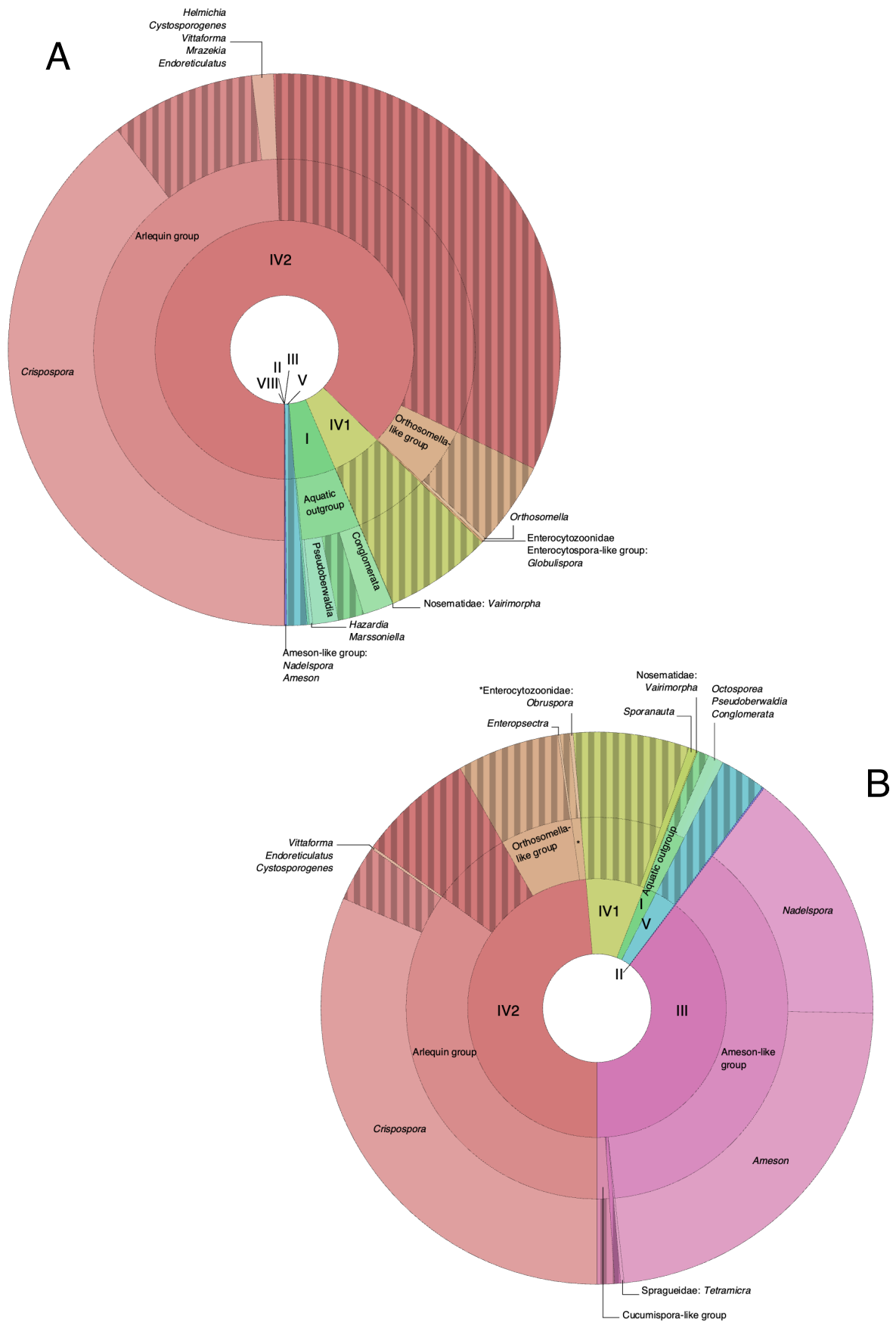


Figure 36: Krona charts representing the taxonomic affiliation of the microsporidian OTUs retrieved in freshwater (A) and marine (B) samples.

Inner circle represents clades. Deeper taxonomic ranks (groups and genera) are presented in outer circles. Genera names are given in *italics*. Hatched patterns represent OTUs unaffiliated beyond the group/clade. Genera listed are ranked from most to least abundant.

IV. Results and discussion

In this work, we sampled 15 different sites across freshwater ($n = 9$) and marine ($n = 6$) environments (**Fig. 35**, SI1), size-fractionated the samples and used microsporidian specific primers to unravel microsporidian diversity which once associated with total eukaryotic diversity allow the identification of potential host-parasite associations.

After quality filtering, clustering at 99% and cleaning steps, a total of 1 853 microsporidian OTUs were obtained from 2 944 084 SSU rRNA gene sequencing reads (1 045 560 reads after normalization). OTUs obtained in this study belonged to the canonical (or long-branch (Bass *et al.*, 2018)) Microsporidia and were all affiliated at least to a clade. Among the 10 clades defined for canonical Microsporidia (Dubuffet *et al.*, 2021), our OTUs were distributed in seven clades: I, II, III, IV1, IV2, V, VIII (**Fig. 35**). 63.9% of the OTUs were affiliated to a group and 9 groups were identified. Less than half (45.5%) of the OTUs were affiliated to a genus among the 20 genera identified, demonstrating that a large part of the microsporidian diversity remains to be described.

1. Does the microsporidian diversity vary across freshwater environments?

So far, few studies have investigated the global diversity of Microsporidia in freshwater ecosystems using high-throughput sequencing (*i.e.* metabarcoding). However, these studies (Williams *et al.*, 2018; Dubuffet *et al.*, 2021; Chauvet *et al.*, 2022a) allowed the identification of a huge and new microsporidian diversity but did not allow a broad comparison of this diversity across different freshwater ecosystems.

Here, we studied this diversity in nine different freshwater sites: eight lakes and one temporary marsh (**Fig. 35**, SI1). The freshwater microsporidian diversity was largely represented by clade IV2, accounting for over 87% of the total reads (**Fig. 36A**). This clade is highly diverse and is known to parasitize a wide range of hosts such as insects, nematodes, crustaceans and fish, as well as humans, and its members have been identified in terrestrial, freshwater, and marine environments (Dubuffet *et al.*, 2021). *Euplotespora binucleata* and *Globosporidium paramecii* (Fokin *et al.*, 2008; Yakovleva *et al.*, 2020), which are among the few microsporidian species known (SSU sequences available) to parasitize protists (*i.e.* ciliates), are also found in this clade.

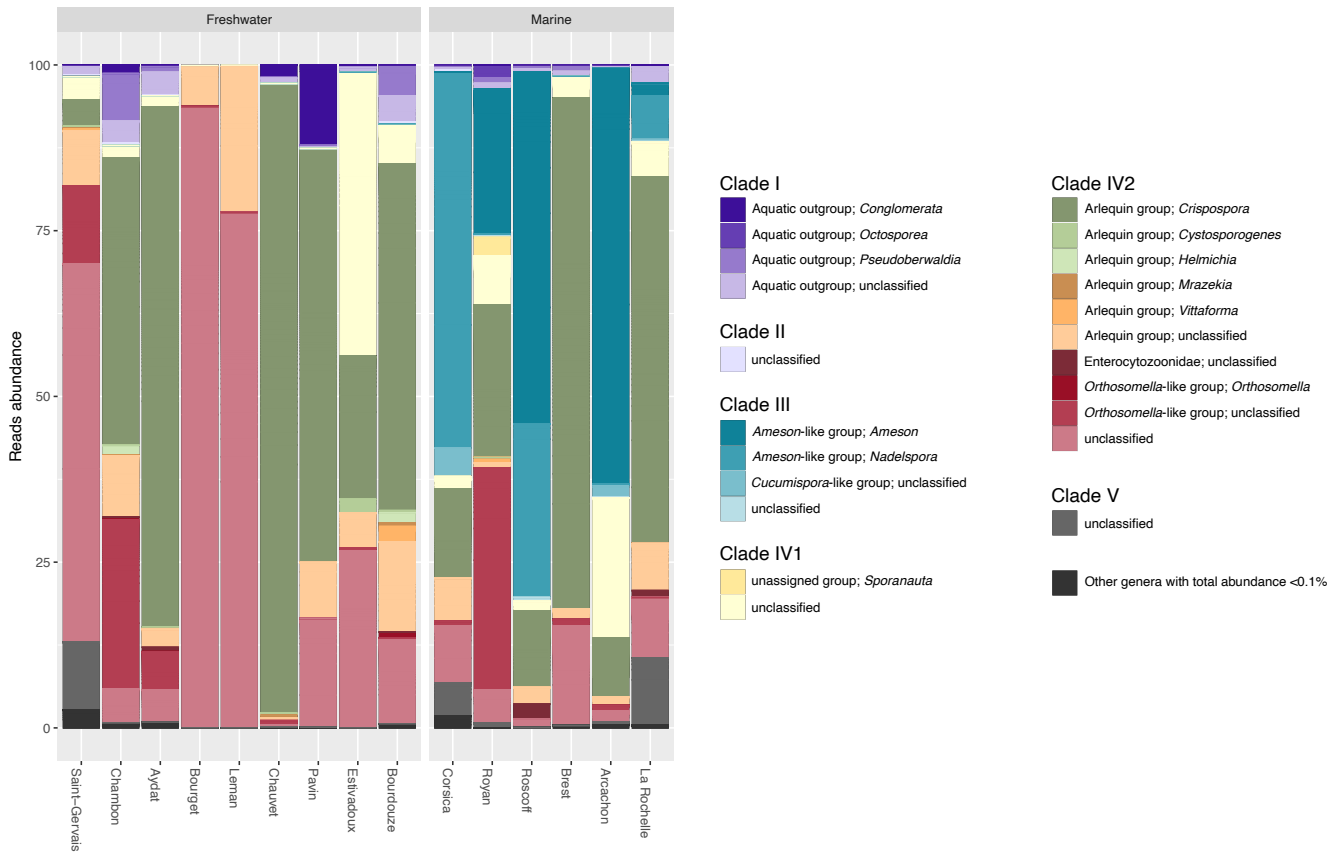


Figure 37: Relative abundances of the most abundant (>0.1% of the total reads) microsporidian genera across freshwater (left) and marine (right) samples.

The black zone at the bottom of each bar represents the cumulative proportion of other genera with low abundances.

Clades IV1 and I were the next most abundant representing 6% and 5% of the OTUs, respectively. The first one mainly includes species described as insects' parasites in terrestrial environments (Park and Poulin, 2021), including also human-infecting species. Clade I, on the other hand, is commonly described as a freshwater clade, since it is mainly found in freshwater crustaceans and insects in various environments such as lakes, rivers, ponds, etc. (Andreadis *et al.*, 2012; Vossbrinck *et al.*, 2014). The other clades were less than 1% abundant (**Fig. 36A**). These findings partly overlap those from Dubuffet *et al.* (2021) and Chauvet *et al.* (2022a) in which clade IV2 and I were the most abundant. However, in these two studies clade IV1 was not well represented (~2%), whereas it was the second most abundant clade in the present dataset, largely due to its overrepresentation in the Estivadoux sample (**Fig. 35, 37**). Among the sampled freshwater ecosystems which are mostly lakes, the Estivadoux is quite different, it is indeed a temporary marsh that can be completely dried during summer. The typical hosts of clade IV1 are mainly insects of terrestrial environments, it therefore seems consistent to retrieve this clade with a higher abundance in this sample.

The Arlequin group (clade IV2) was the most abundant (49% of the reads), this group being largely represented by the *Crispospora* genus (40% of the reads), as already found in previous studies (Dubuffet *et al.*, 2021; Chauvet *et al.*, 2022a) (**Fig. 35**). It's noteworthy that the only one OTU shared by the nine freshwater samples was affiliated to the genus *Crispospora* and was actually the most abundant OTU in the whole dataset. In this genus only one species is described (*Crispospora chironomi*) and known to parasitize chironomid larvae (*Chironomus plumosus*) in freshwater ecosystems (Tokarev *et al.*, 2010). Moreover, a recent study suggests that a new *Crispospora* species might be able to parasitize *Kellicottia* rotifer in lake environments (Chauvet *et al.*, 2022b).

Also in agreement with previous studies, *Pseudoberwaldia* and *Conglomerata* (Aquatic outgroup; clade I) were the next most abundant genera (**Fig. 36A**). These two genera are, each, described by only one species, both of which are known to be parasites of cladocerans in freshwater (Vávra *et al.*, 2018, 2019).

Some groups and/or genera were recorded with a significant abundance only in two or three samples as the *Orthosomella*-like group (clade IV2), mainly found in samples from lakes Chambon, Saint-Gervais and Aydat. This group is so far only described as parasite of insects and nematodes in terrestrial environments (Nishikori *et al.*, 2018). *Conglomerata* (Aquatic outgroup; clade I) was mainly found in lakes Chambon, Pavin and Chauvet, and *Pseudoberwaldia* (Aquatic outgroup; clade I) in lakes Bourdouze and Chambon (**Fig. 37**).

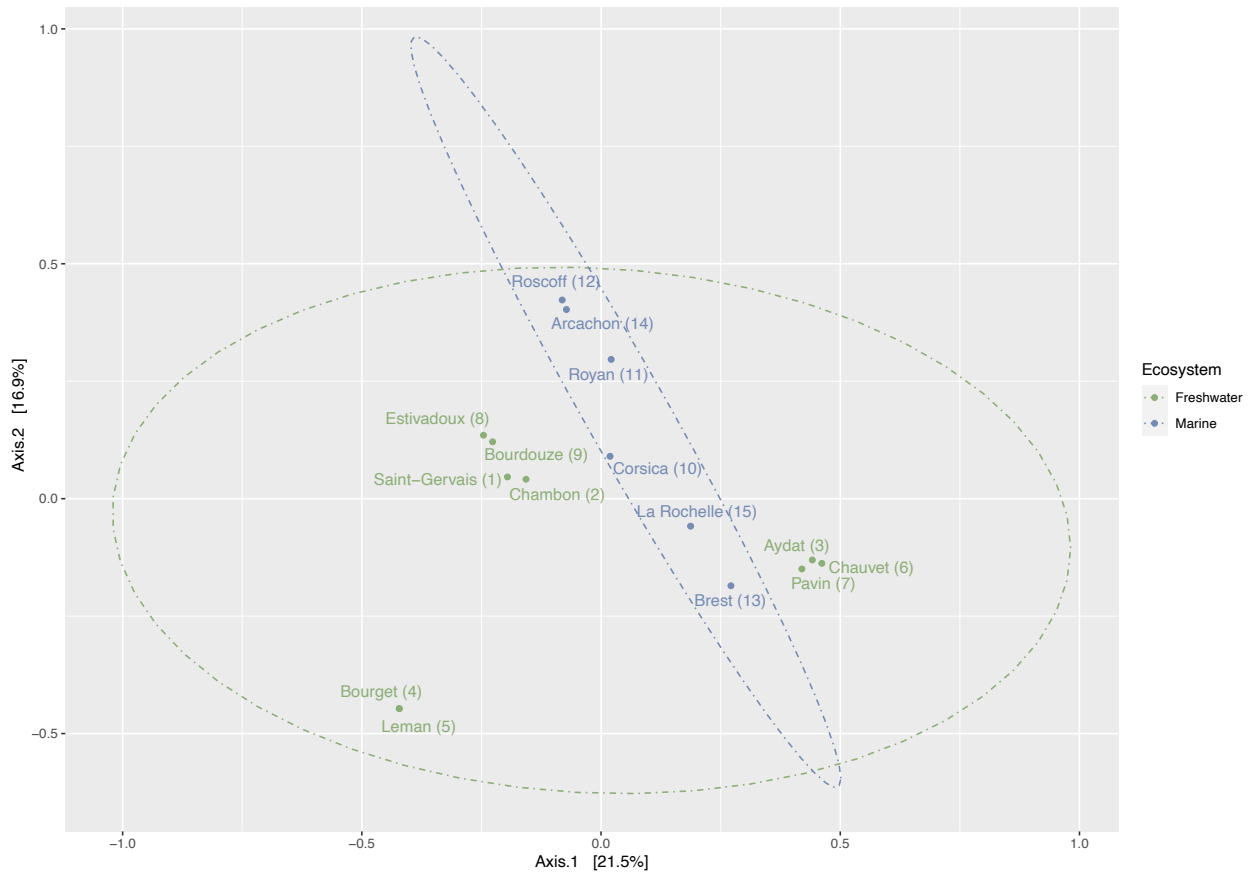


Figure 38: Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Bray-Curtis distances of the microsporidian OTUs relative abundances across samples.

Colours of the data points indicate the ecosystem (freshwater or marine). Sample numbers are displayed in brackets (see Fig. 35). Ellipses in the plots denote 95% confidence intervals, points that are not overlapped by the two ellipses are considered significantly different.

These sites may be particularly rich in daphnia (cladoceran), which is the only described host of the latter two genera. Surprisingly, the *Vittaforma* genus (Arlequin group; clade IV2) has been mainly found in lake Bourdouze and not in the recreative lakes (Aydat, Chambon, Lemans, Bourget), whereas it is currently described through a single species that is a human parasite (Silveira and Canning, 1995).

It therefore appeared that the microsporidian diversity varied across freshwater sampling sites even at a high taxonomic rank (*i.e.* clade level (**Fig. 35, 37, 38**)). In addition, a surprising result compared to previous studies was the significant proportion of clade IV2 OTUs not affiliated to any group (33%), especially in samples from lakes Bourget and Lemans where these OTUs accounted for 83.2% and 75%, respectively (**Fig. 37**). These two lakes could represent an important reservoir of new microsporidian genera and species and thus potential new hosts. Altogether, these results illustrated the importance to increase the sampling effort in freshwater to unravel the full extent of the microsporidian diversity in these environments.

2. What about the marine microsporidian diversity?

To date, the overall diversity of Microsporidia in marine ecosystems has received little attention. Indeed, to our best knowledge, only Williams *et al.* (2018) have initiated the study of the global microsporidian diversity in the marine environment, through coastal, estuary and rock pool samples, however with a low number of OTUs. Here, we studied this diversity in six different marine sites close to the coast: three bays, one estuary and two coastal ecosystems (**Fig. 35**, SI1). The marine microsporidian diversity was largely dominated by clade IV2 and III, accounting for 49% and 40% of the total reads (**Fig. 36B**), the latter being a clade commonly described as ‘marine’, but which includes species parasite of crustaceans and fish, in both marine and freshwater environments (Vossbrinck *et al.*, 2014; Park and Poulin, 2021 (clade V in these studies = clade III here)). This clade also includes a protist parasite, the species *Hyperspora aquatica* hyperparasite of paramyxids (Stentiford *et al.*, 2017). Clades IV1, V and I followed with 7%, 3% and 2% of the reads, respectively. Clade II was the least abundant with 0.1% of the reads and was identified only in Corsica (**Fig. 36B**). Due to the low number of OTUs (50) obtained by Williams *et al.* (2018) the comparison with our data is limited. However, we can mention that higher proportion of clade III was recorded in our samples but lower proportions of clades I, V and especially II and no OTUs belonging to clade IX was found. The

latter clades (I, II, V and IX) are known to be parasites of terrestrial and/or freshwater hosts including crustaceans, insects, nematodes, annelids, bryozoans, and humans (Vossbrinck *et al.*, 2014; Dubuffet *et al.*, 2021), it is thus not surprising to find them with a low abundance here. Clades IV2 and III on the other hand are the ones with the most members found in marine ecosystems (Park and Poulin, 2021).

The *Ameson*-like group (clade III) and Arlequin group (clade IV2) were the most abundant with 38% and 35% of the total reads, respectively (**Fig. 36B**). Three samples were mostly represented by the *Ameson*-like group (Roscoff, Corsica and Arcachon), while two other samples were dominated by the Arlequin group (Brest and La Rochelle) (**Fig. 37**).

Three genera were particularly abundant: *Crispospora* (Arlequin group), *Ameson* and *Nadelspora* (*Ameson*-like group), accounting for 31%, 23% and 15% of the reads, respectively (**Fig. 36B**). *Crispospora* has never been identified in hosts living in marine environments, and neither chironomids nor rotifers are abundant in these systems, thus raising the hypothesis of one or many other hosts for the *Crispospora* genus. Moreover, the proportion of *Crispospora* identified here in the two ecosystems studied, both in terms of OTUs and abundance, suggests that a significant diversity remains to be discovered within this genus where only one species is currently described. This abundance may also reveal significant host diversity.

The *Ameson* genus includes different species all described as parasitizing arthropods in the marine environment. The hosts described are mainly crustaceans (crab, lobster, shrimp) and one species is described as an insect parasite (Murareanu *et al.*, 2021). *Nadelspora* is known to parasitize the crab *Metacarcinus magister* through the only described species: *Nadelspora canceri* (Olson *et al.*, 1994). Other genera identified in these samples were much less abundant such as *Sporanauta* (clade IV1), *Octosporea* and *Pseudoberwaldia* (Aquatic outgroup; clade I), each representing about 0.5% of the reads (**Fig. 36B**). *Sporanauta* and *Pseudoberwaldia* are described by one species each as parasites of nematodes and cladocerans, respectively (Ardila-Garcia and Fast, 2012; Vávra *et al.*, 2019). *Octosporea* genus, on the other hand, includes many species that are parasitic on different hosts, all of which belong to the arthropods. *Octosporea* species are mainly described as insect parasites (Diptera and Hemiptera) and are also found in some cladocerans (*Daphnia*) and amphipods (*Gammarus*) (Murareanu *et al.*, 2021).

In these marine samples, a higher proportion of the diversity was common between the samples compared to freshwater ecosystems as 402 OTUs were shared by the six marine samples; 84% of these OTUs were affiliated to *Crispospora*. Despite these shared OTUs, some samples could be quite different from each other considering some clades/groups/genera (**Fig. 37**). The sample

from Brest, for example, had only one OTU belonging to clade III. This was surprising since this was the second most abundant clade in our study and the clade in which the highest number of marine Microsporidia are found.

3. What drive microsporidian community composition across ecosystem?

Although marine samples contained less reads than freshwater samples, all diversity index showed a more diverse community in marine sites (SI2, SI3). The marine sample from La Rochelle for example was the one with the highest number of OTUs (1 157) but the fewest reads (71 122). 63.4% of the OTUs were common at both ecosystem types (the majority belonging to the *Crispospora* genus, or being unaffiliated beyond clade IV2), 16.1% and 20.5% were specific to freshwater and marine ecosystems, respectively. Most of the OTUs (82%) found only in freshwater samples belong to the clade IV2, whereas OTUs specific to marine samples were mostly found in clade III (72%). Only one OTU (the most abundant of the whole dataset), affiliated to *Crispospora* (clade IV2; Arlequin group), was shared by all the samples. The affiliation was better in marine samples, as 58.4% of OTUs were affiliated to a group and 38.9% to a genus in freshwater *versus* 62.0% and 53.6% in marine samples suggesting that a large part of the diversity is unknown. It therefore seems essential to continue the sampling effort across aquatic ecosystems to unravel the global microsporidian diversity (without the bias of targeting hosts).

At the clade level, the major differences were the absence of clade VIII in the marine samples and the very low abundance (0.003%) of clade III in freshwater whereas it represents 40% of the microsporidian abundance in marine samples (**Fig. 36A, 36B**). Species belonging to clade VIII are described as parasites of insects (mainly Diptera), affecting larvae that are present in freshwater (Murareanu *et al.*, 2021). Clade III is mostly described as parasitizing fishes and crustaceans in marine and freshwater environments and is sometimes described as the ‘marinosporidia’ clade (Vossbrinck *et al.*, 2014) even if Williams *et al.* (2018) showed the inconsistency in the classification based on the ecological niche that Microsporidia and/or their hosts inhabit. However, the primers used in this study target a wide microsporidian diversity,

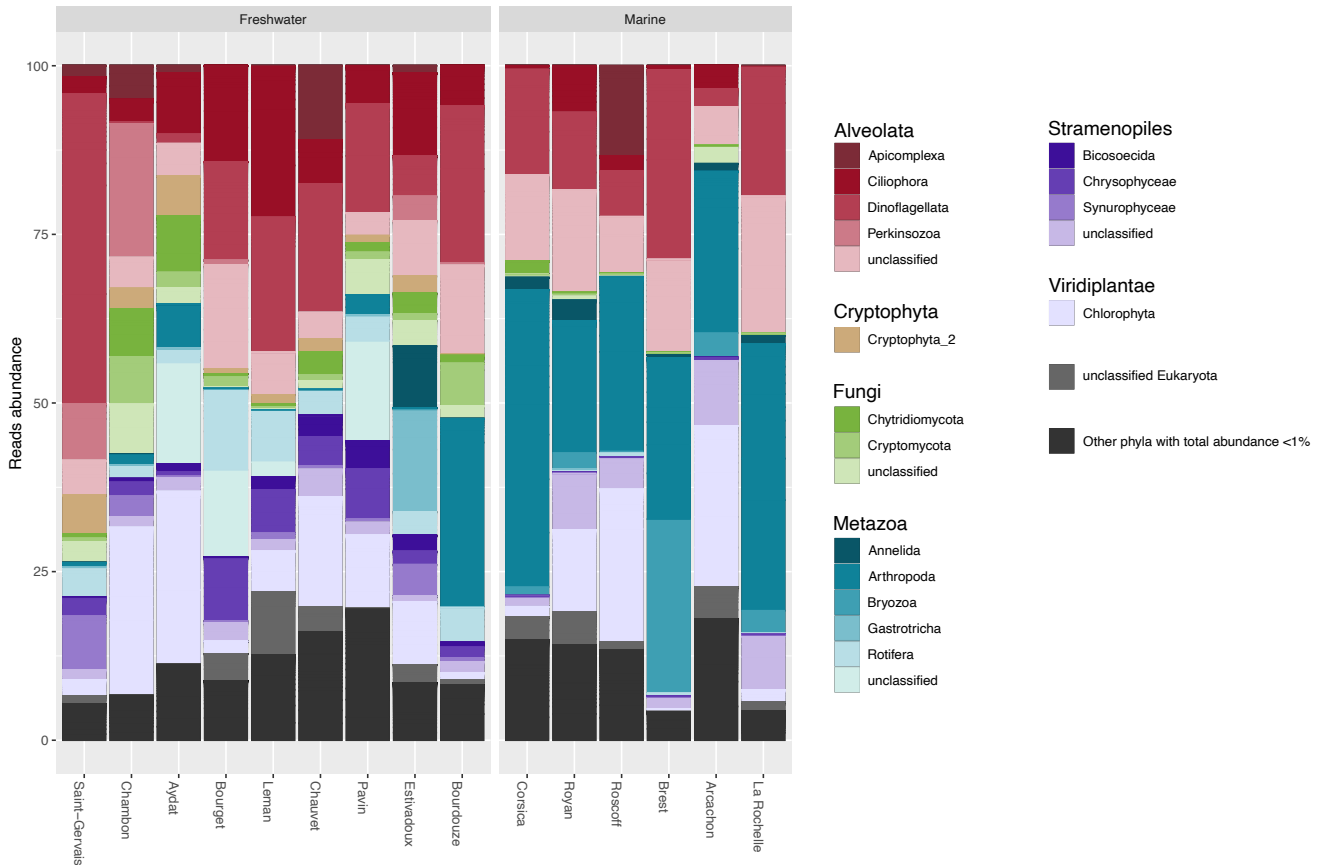


Figure 39: Relative abundances of the most abundant (>1% of the total reads) eukaryotic phyla across freshwater (left) and marine (right) samples.

The black zone at the bottom of each bar represents the cumulative proportion of other phyla with low abundances.

except in clade III (data not shown). The environmental diversity of Microsporidia affiliated to clade III is therefore likely underestimated in the two types of ecosystems.

Other differences at the genus level (apart from the genera belonging to clade III) were notable between the two types of environments such as the significantly higher abundance of *Conglomerata* (Aquatic outgroup; clade I) in freshwater (SI4) and the absence of *Octosporea* (Aquatic outgroup; clade I) as well as *Mrazekia* and *Helmichia* (both in Arlequin group; clade IV2) in freshwater and marine samples, respectively (**Fig 36A, 36B, 37**). Some of these results are consistent with the type of host described for these genera, such as *Conglomerata* which is currently described as parasitizing only the freshwater *Daphnia pulex* (Vávra *et al.*, 2018). These differences nevertheless involve genera found at low abundance, not allowing us to clearly establish their real absence in the second ecosystem and to draw conclusions on these differences.

The environmental variables studied here (salinity and temperature), trophic states, ecosystem type, size fraction, and geographical location, do not seem to explain the distribution of the microsporidian communities (**Fig. 38**, SI1). Although the number of parameters considered here are low, it has also never been shown that abiotic parameter can directly influence Microsporidia in their environment. The diversity observed was rather in agreement with the hosts described so far, at least in terms of habitat, even though some genera have been surprisingly identified in an environment that does not harbour their (often single) described hosts. Ultimately, it appears that microsporidian communities are probably driven by their biotic interactions and thus their eukaryotic hosts. Most of the Microsporidia identified in this study are nevertheless described as parasites of organisms much larger than the studied size fraction (<150µm) such as fish, crustaceans, and insects. It therefore appears that either these Microsporidia infect smaller and so far, unknown hosts and/or that their free-living forms, the spores, actively circulate in the water column via ingestion/filtration. Approximately 80% of the Microsporidian species described (with host data) are specialists (*i.e.* described as infecting only a single host), the remaining species are generalists with some capable of infecting more than ten hosts (Murareanu *et al.*, 2021), some having the ability to infect both vertebrate and invertebrate (Stentiford *et al.*, 2016). The hypothesis of a second host is already suggested for *Pseudoberwaldia* (Vávra *et al.*, 2019) for example. Our results thus also suggest that a significant proportion of Microsporidia could infect more than one host, especially in the overlooked microeukaryotic compartment. It therefore seems essential to study the

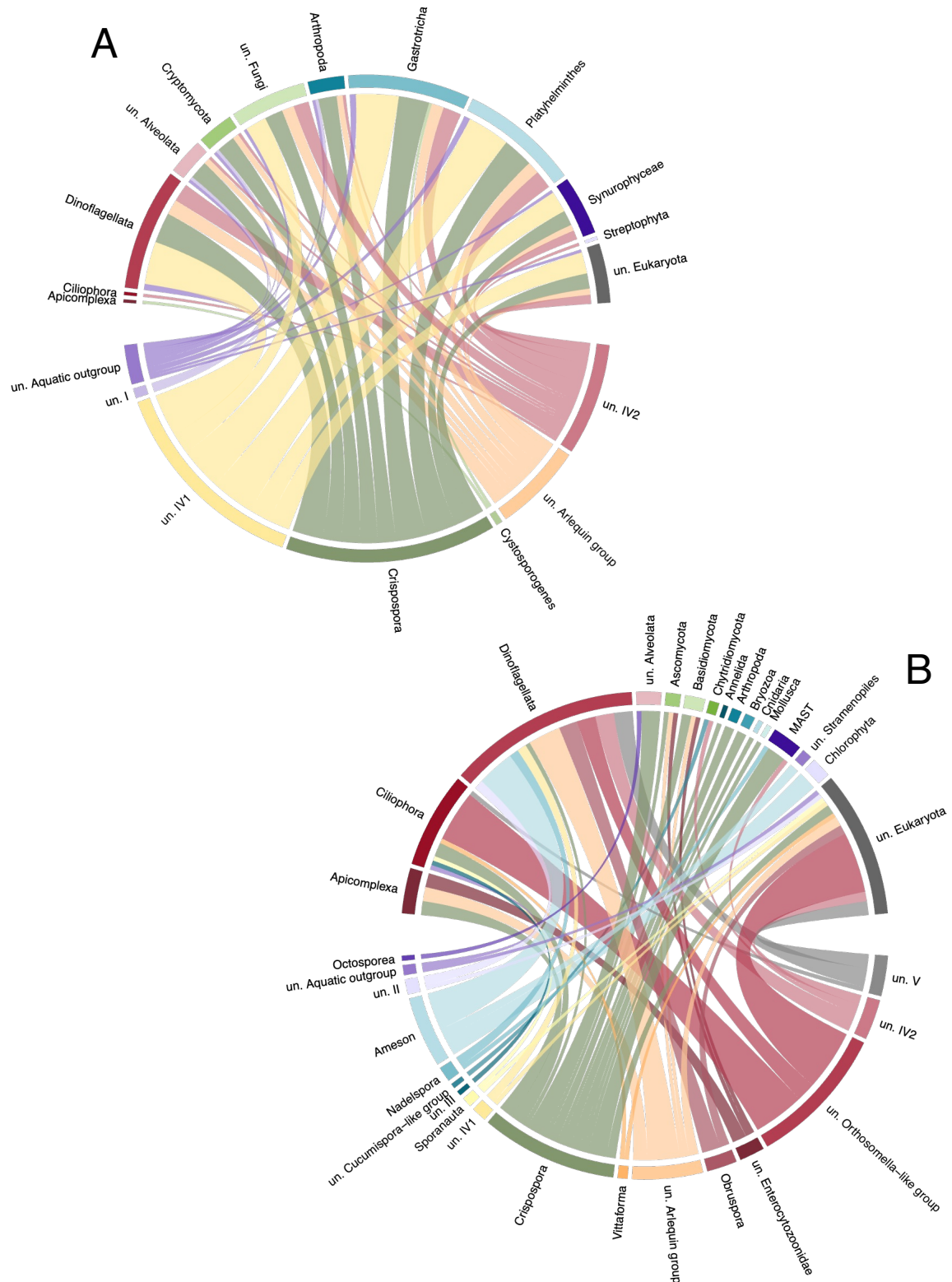


Figure 40: Diagrams showing the positive correlations between microsporidian OTUs (bottom) and eukaryotic OTUs (top) in freshwater (A) and marine (B) ecosystems.

Microsporidian OTUs are grouped by genus, eukaryotic OTUs are grouped by phylum or class. One line represents one positive correlation between two OTUs. un. = unclassified

microsporidian diversity in relation to their potential hosts, which ultimately could explain their distribution through ecosystems.

We studied the diversity of Microsporidia and planktonic eukaryotes (< 150 µm) in parallel (**Fig. 39**). The eukaryotic communities identified were quite different between the two types of ecosystems studied (**Fig. 39**, SI5). The freshwater diversity was mainly represented by dinoflagellates (16%), Chlorophyta (11%), ciliates (9%) and rotifers (5%), whereas marine diversity was mainly composed of arthropods (29%), dinoflagellates (14%), Chlorophyta (10%) and Bryozoa (6%) (**Fig. 39**).

As for Microsporidia, some sites showed a specificity in their eukaryotic diversity that could explain the distribution of the microsporidian communities. Lakes Lemans and Bourget, for example, were particularly rich in rotifers compared to other lakes (**Fig. 39**), these rotifers belonging mainly to the Brachionidae and Notommatidae. Similarly, dinoflagellates were most abundant in lake Saint Gervais and Bryozoa in the Brest sampling point. To identify new host-parasite associations, OTUs representing more than 0.05% of reads in both datasets were used to reveal co-occurrences. Only positive associations were considered as it has already been showed that parasitism is retrieved as a positive link between the partners in co-occurrence network despite the detrimental impact of the parasite on the host (Weiss *et al.*, 2016). Moreover, potential associations were searched by ecosystem types since it is better to have homogeneous environments to identify biotic interactions (Faust, 2021).

In freshwater, 205 potential associations were identified between 32 microsporidian OTUs and 14 eukaryotic OTUs, mostly involving metazoans (platyhelminths, gastrotrichs and arthropods) and alveolates (dinoflagellates, apicomplexans, and ciliates) (**Fig. 40A**). These correlations largely involved OTUs unaffiliated beyond the clade (IV1, IV2 and I) or the group (Arlequin and Aquatic outgroup), as well as two genera: *Cystosporogenes* and *Crispospora* (both in the Arlequin group; clade IV2). In marine environments, 128 potential associations were identified between 69 microsporidian OTUs and 35 eukaryotic OTUs (**Fig. 40B**). As well as for freshwater, a lot of potential associations involved microsporidia OTUs unaffiliated beyond the clade (V, IV2, IV1, II and III) or the group (Arlequin, *Orthosomella*-like, Enterocytozoonidae, *Cucumispora*-like and Aquatic outgroup), and some genera: *Crispospora*, *Ameson*, *Obruspora*, *Naselspora*, *Vittaforma*, *Sporanauta* and *Octosporea*. Eukaryotic OTUs involved belong mostly to the alveolates (dinoflagellates, apicomplexans, and ciliates). Metazoans (cnidarians, arthropods, annelids, mollusks, and Bryozoa) and Fungi (Ascomycota, Basidiomycota, chytrids) were also involved in these co-occurrences (**Fig. 40B**). Metazoans represent most of

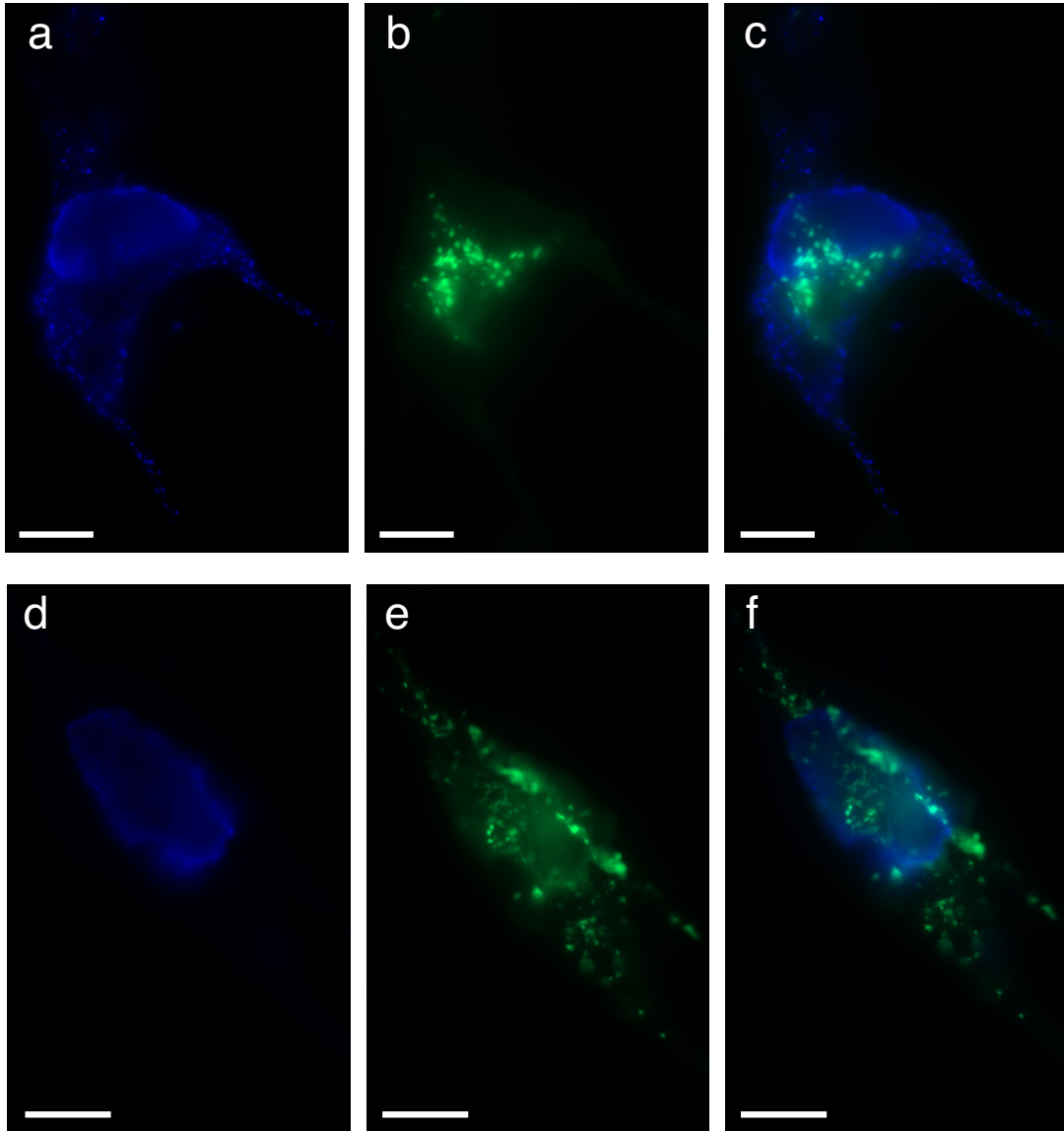


Figure 41: Microsporidia (targeted by TSA-FISH with the USP01 probe (Chauvet *et al.*, 2022a)) infecting dinoflagellates in (a, b, c) freshwater and (d, e, f) marine samples.

Under UV showing nucleus after DAPI staining (a,d), under blue light showing Microsporidia in green fluorescence (b,e), overlay (c,f). Scale bars, 20 μm

the described microsporidian host. Among them, arthropods, platyhelminths, gastrotrichs, cnidarians, annelids, mollusks, and Bryozoa (identified here in the co-occurrences) have already been described as hosts (Murareanu *et al.*, 2021). Similarly, the potential associations identified with alveolates were previously described for some, as Microsporidia have been shown to parasitize apicomplexans and ciliates although these descriptions are anecdotal and generally only morphological (*e.g.* only two microsporidian SSU sequences parasites of ciliates (Fokin *et al.*, 2008; Yakovleva *et al.*, 2020)). In contrast, there are currently no descriptions of Microsporidia parasitizing dinoflagellates. Fungi, also retrieved in these co-occurrences in potential association with Microsporidia, have also never been described as their hosts. In both ecosystems, some correlations were also found with phytoplanktonic organisms (**Fig 40A, 40B**), whereas to date, infection by Microsporidia in phytoplankton has never been recorded. Interestingly, some of the potential associations identified here were also retrieved in co-occurrence networks involving short-branch Microsporidia (Doliwa *et al.*, 2021).

Although co-occurrences network analyses should be interpreted with caution (Carr *et al.*, 2019; Blanchet *et al.*, 2020) they are increasingly used to identify potential associations within microorganisms. The method used here (correlation), although showing good results (Hirano and Takemoto, 2019), has its limitations in predicting associations, as other tools are more efficient and adapted to such datasets (*e.g.* Kurtz *et al.*, 2015) but often require more samples. However, associations between Microsporidia and eukaryotes suggested by co-occurrences network should be considered as working hypothesis and need to be confirmed by other approaches allowing the observation and the identification of both partners (*e.g.* fluorescence microscopy or host/parasite genomic analysis).

Using TSA-FISH with a universal microsporidian probe (USP01, Chauvet *et al.*, 2022a) we confirmed the Microsporidia- *Kellicottia* (rotifer) association already observed in another lake (Chauvet *et al.*, 2022a, 2022b), here in lake Chauvet. We also identified microsporidian infections in dinoflagellates both in freshwater and marine ecosystems (**Fig. 41**). Indeed, these infections were observed in lakes Lemans (prevalence, 49% of infected individuals), Bourget (53%) and Saint Gervais (20%), and in the La Rochelle (38%) marine sample. These observed Microsporidia-dinoflagellates associations in both ecosystems significantly expand the host range of Microsporidia and their impact on food web functioning. Indeed, dinoflagellates are relatively abundant in freshwater and marine environments, and show a diversity of trophic modes (autotrophy, heterotrophy or mixotrophy). Thanks to this diversity, dinoflagellates are

among the major primary producers (with diatoms), they can as well be grazers, and have symbiotic or parasitic relationships, while others are known to be important toxin producers (Carty and Parrow, 2015).

V. Conclusion

In conclusion, this study highlighted for the first time a huge microsporidian diversity in marine samples, with an important part (46%) of the OTUs not affiliated to a genus suggesting an important reservoir of new microsporidian species and thus potential new hosts, especially among clade IV2. This diversity was also widely divergent from the diversity identified in freshwater. Interestingly, most of the identified genera are described as parasites of organisms much larger than the studied size fraction (<150 µm). It therefore appears that these Microsporidia infect smaller and, so far, unknown hosts such as dinoflagellates both in marine and freshwater ecosystems. Also, the abundance of the *Crispospora* genus raises questions about their hosts and impact especially in marine environments and should be the subject of further research.

Altogether, these results indicate that the microsporidian diversity and host spectrum could be therefore more important than previously described, and their role in the functioning of aquatic ecosystems and especially marine ecosystems is undoubtedly largely unknown.

Acknowledgements

The authors are very grateful towards the LIENSs (LIttoral ENvironnement et Sociétés), EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux) and CARRTEL (Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et Ecosystèmes Limniques) labs for their hospitality and help with the sampling. We especially want to thank Hélène Agogué, Philippe Pineau, Yves Brizard, Yolanda Del Amo, Laurent Letord, Anne Bohi, Isabelle Domaizon, Jean-Christophe Hustache and the French Oceanographic Fleet. We also gratefully acknowledge Raffaele Siano (Ifremer), Fabienne Rigaut-Jalabert (Station Biologique de Roscoff) and the captain and crew of the Neomysis research ship for the sampling in Brest and Roscoff. We also thank Simon Lafarge for facilitating the access of the private lake Chauvet.

We thank the SOMLIT program (Service d'Observation en Milieu Littoral, CNRS/INSU, a monitoring network of the Research Infrastructure ILICO), ROME project (Réseau d'Observatoires de Microbiologie Environnementale intégré) and OLA observatory (Observation au long terme et expérimentation - écosystèmes LAcustres, OLA-IS, AnaEE-France, INRAE of Thonon-les-Bains, CIPEL, Rimet *et al.*, 2020) for collecting samples and granting access to some metadata.

Finally, we would like to thank Jonathan Colombet, Marie Diogon, Maxime Fuster, Karine Massé, Jean-Christophe Pointud and Agnès Vellet for their help with sampling and filtration.

The work of MC was supported by a PhD fellowship funded by the ‘ministère de l’enseignement supérieur de la recherche et de l’innovation’.

Competing Interests

The authors declare they have no competing interests.

Author contributions

MC and CL designed the study. MC, AM, and CL performed sampling and experiments. MC and CL wrote the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

References

- Andreadis, T. G., A. V. Simakova, C. R. Vossbrinck, J. J. Shepard, and Y. A. Yurchenko. 2012. Ultrastructural characterization and comparative phylogenetic analysis of new microsporidia from Siberian mosquitoes: Evidence for coevolution and host switching. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 59–75. doi:10.1016/j.jip.2011.09.011
- Ardila-Garcia, A. M., and N. M. Fast. 2012. Microsporidian Infection in a Free-Living Marine Nematode. *Eukaryot Cell* 11: 1544–1551. doi:10.1128/EC.00228-12
- Baker, M. D., C. R. Vossbrinck, J. V. Maddox, and A. H. Undeen. 1994. Phylogenetic relationships among Vairimorpha and Nosema species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J Invertebr Pathol* 64: 100–106. doi:10.1006/jipa.1994.1077
- Bass, D., L. Czech, B. A. P. Williams, and others. 2018. Clarifying the Relationships between Microsporidia and Cryptomycota. *J. Eukaryot. Microbiol.* 65: 773–782. doi:10.1111/jeu.12519
- Bass, D., G. D. Stentiford, D. T. J. Littlewood, and H. Hartikainen. 2015. Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. *Trends in Parasitology* 31: 499–513. doi:10.1016/j.pt.2015.06.013
- Benjamini, Y., and Y. Hochberg. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57: 289–300. doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Beule, L., and P. Karlovsky. 2020. Improved normalization of species count data in ecology by scaling with ranked subsampling (SRS): application to microbial communities. *PeerJ* 8: e9593. doi:10.7717/peerj.9593
- Blanchet, F. G., K. Cazelles, and D. Gravel. 2020. Co-occurrence is not evidence of ecological interactions E. Jeffers [ed.]. *Ecol Lett* 23: 1050–1063. doi:10.1111/ele.13525
- Bokulich, N. A., S. Subramanian, J. J. Faith, D. Gevers, J. I. Gordon, R. Knight, D. A. Mills, and J. G. Caporaso. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 10: 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276
- Bray, J. R., and J. T. Curtis. 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27: 325–349. doi:10.2307/1942268
- Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, P. J. Turnbaugh, N. Fierer, and R. Knight. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 4516–4522. doi:10.1073/pnas.1000080107
- Carr, A., C. Diener, N. S. Baliga, and S. M. Gibbons. 2019. Use and abuse of correlation analyses in microbial ecology. *ISME J* 13: 2647–2655. doi:10.1038/s41396-019-0459-z
- Carty, S., and M. W. Parrow. 2015. Dinoflagellates, p. 773–807. *In* *Freshwater Algae of North America*. Elsevier.
- Cavalier-Smith, T. 1993. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. *MICROBIOL. REV.* 57: 42.

- Chauvet, M., D. Debroas, A. Moné, A. Dubuffet, and C. Lepère. 2022a. Temporal variations of Microsporidia diversity and discovery of new host–parasite interactions in a lake ecosystem. *Environmental Microbiology* 1462-2920.15950. doi:10.1111/1462-2920.15950
- Chauvet, M., A. Monjot, A. Moné, and C. Lepère. 2022b. Single Cell Analysis Reveals a New Microsporidia-Host Association in a Freshwater Lake. *Microb Ecol*. doi:10.1007/s00248-022-02023-7
- Debroas, D., I. Domaizon, J.-F. Humbert, L. Jardillier, C. Lepère, A. Oudart, and N. Taïb. 2017. Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data. *FEMS Microbiology Ecology* 93. doi:10.1093/femsec/fix023
- Doliwa, A., M. Dunthorn, E. Rassoshanska, F. Mahé, D. Bass, and C. Duarte Ritter. 2021. Identifying Potential Hosts of Short-Branch Microsporidia. *Microb Ecol* 82: 549–553. doi:10.1007/s00248-020-01657-9
- Dubuffet, A., M. Chauvet, A. Moné, D. Debroas, and C. Lepère. 2021. A phylogenetic framework to investigate the microsporidian communities through metabarcoding and its application to lake ecosystems. *Environmental Microbiology* 23: 4344–4359. doi:10.1111/1462-2920.15618
- Ebert, D. 2005. Some parasites of *Daphnia*, *In Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. National Center for Biotechnology Information.
- Faust, K. 2021. Open challenges for microbial network construction and analysis. *ISME J* 15: 3111–3118. doi:10.1038/s41396-021-01027-4
- Fokin, S. I., G. Di Giuseppe, F. Erra, and F. Dini. 2008. *Euplotespora binucleata* n. gen., n. sp. (Protozoa: Microsporidia), a parasite infecting the hypotrichous ciliate *Euplotes woodruffi*, with observations on microsporidian infections in ciliophora. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55: 214–228. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00322.x
- Gu, Z., L. Gu, R. Eils, M. Schlesner, and B. Brors. 2014. circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* 30: 2811–2812. doi:10.1093/bioinformatics/btu393
- Hadziavdic, K., K. Lekang, A. Lanzen, I. Jonassen, E. M. Thompson, and C. Troedsson. 2014. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. *PLOS ONE* 9: e87624. doi:10.1371/journal.pone.0087624
- Hirano, H., and K. Takemoto. 2019. Difficulty in inferring microbial community structure based on co-occurrence network approaches. *BMC Bioinformatics* 20: 329. doi:10.1186/s12859-019-2915-1
- Hugerth, L. W., E. E. L. Muller, Y. O. O. Hu, L. A. M. Lebrun, H. Roume, D. Lundin, P. Wilmes, and A. F. Andersson. 2014. Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS ONE* 9: e95567. doi:10.1371/journal.pone.0095567
- Kagami, M., T. Miki, and G. Takimoto. 2014. Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Front. Microbiol.* 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00166
- Karpov, S. A., M. A. Mamkaeva, V. V. Aleoshin, E. Nasonova, O. Lilje, and F. H. Gleason. 2014. Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. *Front Microbiol* 5: 112. doi:10.3389/fmicb.2014.00112
- Keeling, P. J., and N. M. Fast. 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 93–116. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160854
- Kurtz, Z. D., C. L. Müller, E. R. Miraldi, D. R. Littman, M. J. Blaser, and R. A. Bonneau. 2015. Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks C. Von Mering [ed.]. *PLoS Comput Biol* 11: e1004226. doi:10.1371/journal.pcbi.1004226
- Lafferty, K. D., S. Allesina, M. Arim, and others. 2008. Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology Letters* 11: 533–546. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01174.x

- Mangot, J.-F., I. Domaizon, N. Taib, N. Marouni, E. Duffaud, G. Bronner, and D. Debroas. 2013. Short-term dynamics of diversity patterns: evidence of continual reassembly within lacustrine small eukaryotes. *Environ. Microbiol.* 15: 1745–1758. doi:10.1111/1462-2920.12065
- Marcogliese, D. J., and D. K. Cone. 1997. Food webs: a plea for parasites. *Trends in Ecology & Evolution* 12: 320–325. doi:10.1016/S0169-5347(97)01080-X
- McMurdie, P. J., and S. Holmes. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data M. Watson [ed.]. *PLoS ONE* 8: e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217
- Murareanu, B. M., R. Sukhdeo, R. Qu, J. Jiang, and A. W. Reinke. 2021. Generation of a Microsporidia Species Attribute Database and Analysis of the Extensive Ecological and Phenotypic Diversity of Microsporidia. *mBio* 12: e01490-21. doi:10.1128/mBio.01490-21
- Nishikori, K., D. H. E. Setiamarga, T. Tanji, E. Kuroda, H. Shiraishi, and A. Ohashi-Kobayashi. 2018. A new microsporidium *Percutemincola moriokae* gen. nov., sp. nov. from *Oscheius tipulae*: A novel model of microsporidia–nematode associations. *Parasitology* 145: 1853–1864. doi:10.1017/S0031182018000628
- Olson, R. E., K. L. Tiekotter, and P. W. Reno. 1994. *Nadelspora canceri* N. G., N. Sp., an Unusual Microsporidian Parasite of the Dungeness Crab, Cancer Magister. *J Eukaryotic Microbiology* 41: 349–359. doi:10.1111/j.1550-7408.1994.tb06089.x
- Paliy, O., and V. Shankar. 2016. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology* 25: 1032–1057. doi:10.1111/mec.13536
- Park, E., and R. Poulin. 2021. Revisiting the phylogeny of microsporidia. *International Journal for Parasitology* 51: 855–864. doi:10.1016/j.ijpara.2021.02.005
- R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing.
- Rimet, F., O. Anneville, D. Barbet, and others. 2020. The Observatory on LAKes (OLA) database: Sixty years of environmental data accessible to the public: The Observatory on LAKes (OLA) database. *J Limnol* 79. doi:10.4081/jlimnol.2020.1944
- Silveira, H., and E. U. Canning. 1995. *Vittaforma corneae* N. Comb. for the Human Microsporidium *Nosema corneum* Shadduck, Meccoli, Davis & Font, 1990, Based on its Ultrastructure in the Liver of Experimentally Infected Athymic Mice. *J Eukaryotic Microbiology* 42: 158–165. doi:10.1111/j.1550-7408.1995.tb01557.x
- Singer, D., C. V. W. Seppey, G. Lentendu, and others. 2021. Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems. *Environment International* 146: 106262. doi:10.1016/j.envint.2020.106262
- Stentiford, G. D., -->J.J. Becnel, L. M. Weiss, and others. 2016. Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends in Parasitology* 32: 336–348. doi:10.1016/j.pt.2015.12.004
- Stentiford, G. D., A. Ramilo, E. Abollo, R. Kerr, K. S. Bateman, S. W. Feist, D. Bass, and A. Villalba. 2017. *Hyperspora aquatica* n.g.n., n.sp. (Microsporidia), hyperparasitic in *Marteilia cochillia* (Paramyxida), is closely related to crustacean-infecting microsporidian taxa. *Parasitology* 144: 186–199. doi:10.1017/S0031182016001633
- Taib, N., J.-F. Mangot, I. Domaizon, G. Bronner, and D. Debroas. 2013. Phylogenetic Affiliation of SSU rRNA Genes Generated by Massively Parallel Sequencing: New Insights into the Freshwater Protist Diversity. *PLOS ONE* 8: e58950. doi:10.1371/journal.pone.0058950
- Tokarev, Y. S., V. N. Voronin, E. V. Seliverstova, O. A. Pavlova, and I. V. Issi. 2010. Life cycle, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Crispospora chironomi* g.n. sp.n. (Microsporidia: Terresporidia), a parasite of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *Parasitol. Res.* 107: 1381–1389. doi:10.1007/s00436-010-2012-x

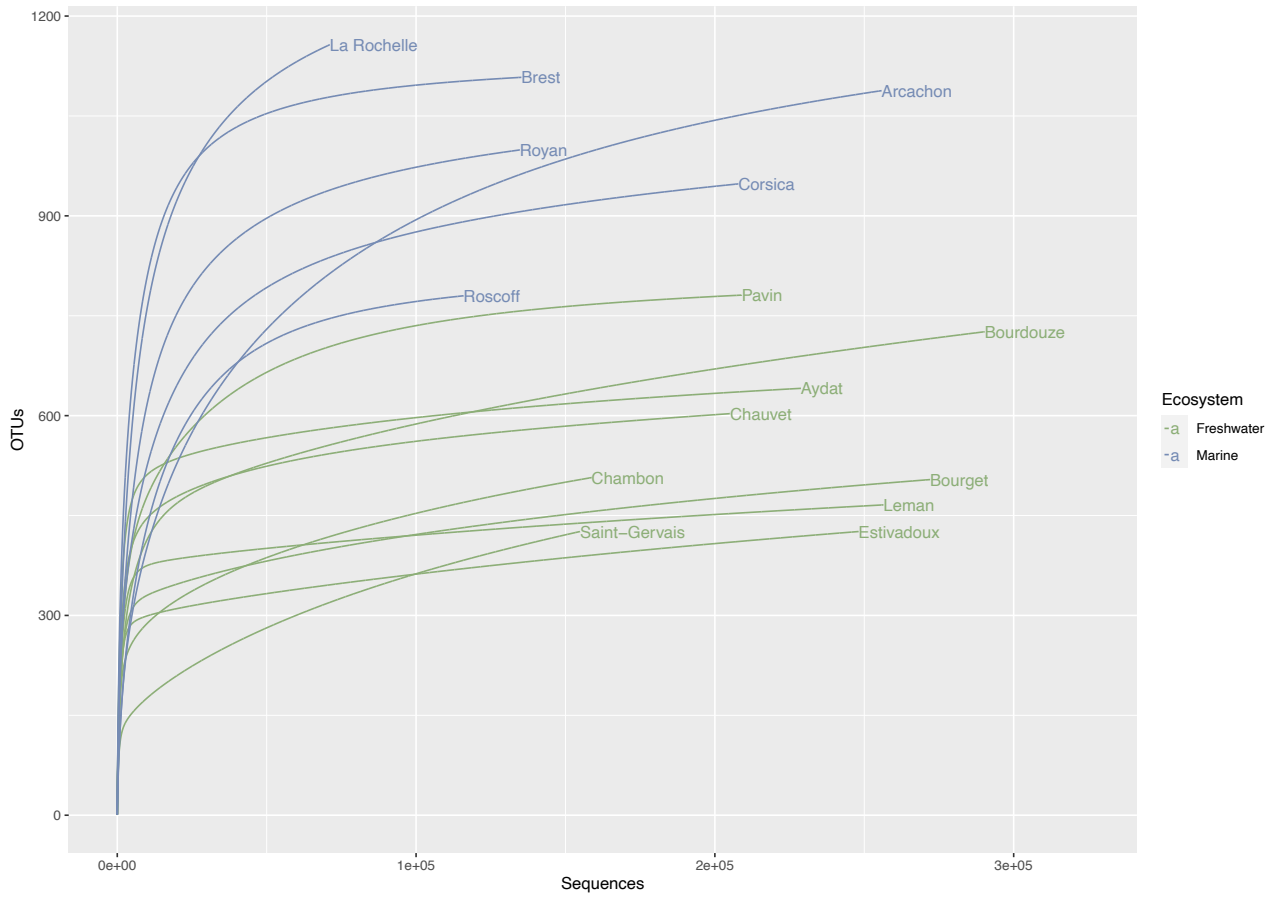
- Vávra, J., I. Fiala, P. Krylová, A. Petrusek, and M. Hyliš. 2018. Molecular and structural assessment of microsporidia infecting daphnids: The “obtusa-like” microsporidia, a branch of the monophyletic Agglomeratidae clade, with the establishment of a new genus *Conglomerata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 159: 95–104. doi:10.1016/j.jip.2018.10.003
- Vávra, J., I. Fiala, P. Krylová, A. Petrusek, and M. Hyliš. 2019. Establishment of a new microsporidian genus and species, *Pseudoberwaldia daphniae* (Microsporidia, Opisthosporidia), a common parasite of the *Daphnia longispina* complex in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 162: 43–54. doi:10.1016/j.jip.2019.02.004
- Vossbrinck, C. R., B. A. Debrunner-Vossbrinck, and L. M. Weiss. 2014. Phylogeny of the Microsporidia, p. 203–220. In L.M. Weiss and J.J. Becnel [eds.], *Microsporidia*. John Wiley & Sons, Inc.
- Weiss, L. M., X. Zhu, A. Cali, H. B. Tanowitz, and M. Wittner. 1994. Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitol (Praha)* 41: 81–90.
- Weiss, S., W. Van Treuren, C. Lozupone, and others. 2016. Correlation detection strategies in microbial data sets vary widely in sensitivity and precision. *ISME J* 10: 1669–1681. doi:10.1038/ismej.2015.235
- Williams, B. A. P., K. M. Hamilton, M. D. Jones, and D. Bass. 2018. Group-specific environmental sequencing reveals high levels of ecological heterogeneity across the microsporidian radiation. *Environ Microbiol Rep* 10: 328–336. doi:10.1111/1758-2229.12642
- Yakovleva, Y., E. Nassonova, N. Lebedeva, O. Lanzoni, G. Petroni, A. Potekhin, and E. Sabaneyeva. 2020. The first case of microsporidiosis in *Paramecium*. *Parasitology* 147: 957–971. doi:10.1017/S0031182020000633

Supplementary Information

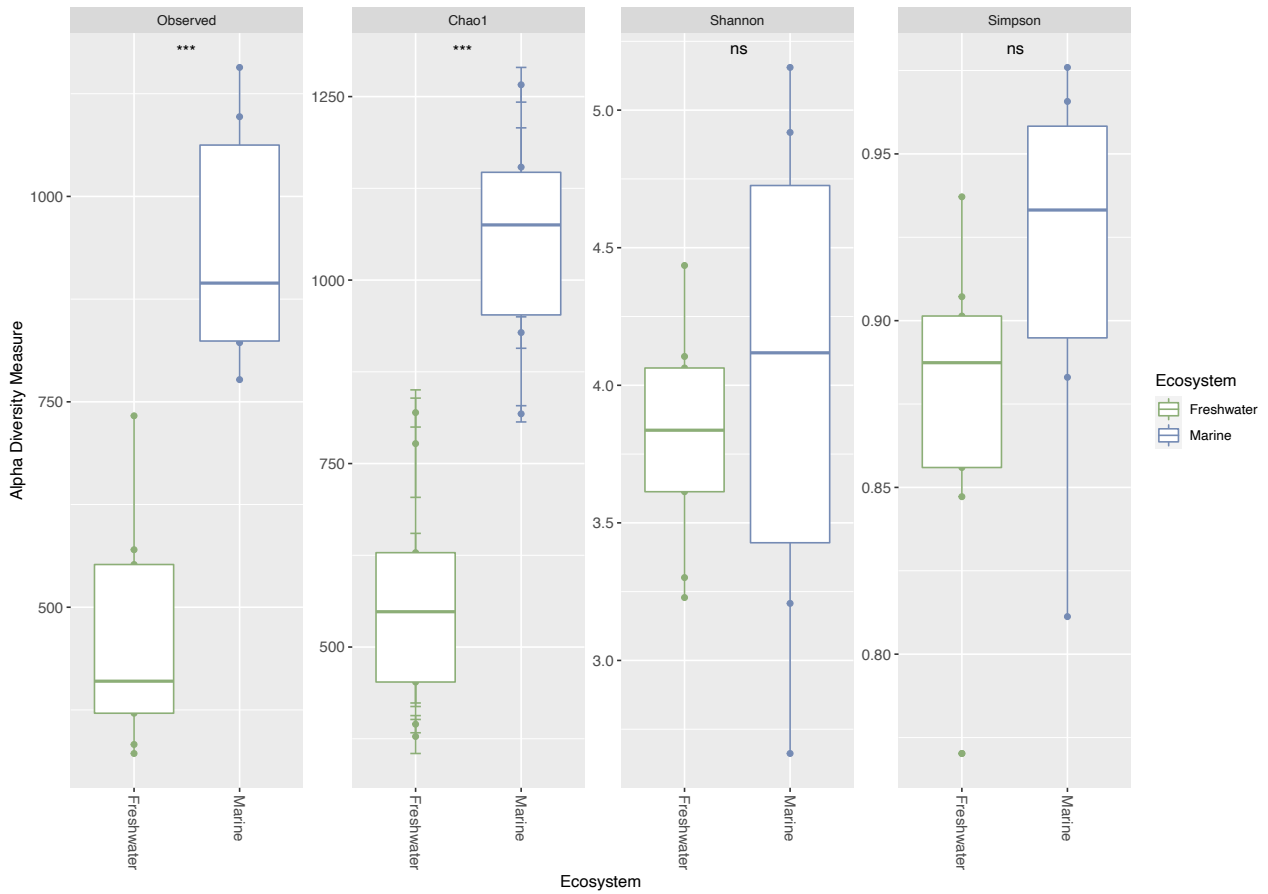
Site	Coordinates	Ecosystem	Date	Temperature (°C)	Salinity (PSU)	Volume (litres)	Depth	Size fraction	Filters	TSA-FISH filters
Saint-gervais	46°02' 17" N, 2° 48' 54" E	Freshwater - Hypereutrophic	30/06/2021	19.8	NA	10	Surface	0.8-150 µm	4	X
Chambon	45°34' 10" N, 2° 55' 26" E	Freshwater - Eutrophic	01/07/2021	15.7	0.03	15	Surface	0.8-150 µm	4	X
Aydat	45°39' 50" N, 2° 59' 04" E	Freshwater - Eutrophic	01/07/2021	17.1	0.06	15	IEZ 5.75 m	0.8-150 µm	4	X
Bourget	45°44' 48" N, 5° 51' 34" E	Freshwater - Oligomesotrophic	06/07/2021	21.7	NA	9.5	IEZ 10 m	0.8-150 µm	4	X
Leman	46°27' 09" N, 6° 35' 19" E	Freshwater - Mesotrophic	07/07/2021	20.0	NA	9.5	IEZ 10 m	0.8-150 µm	4	X
Chauvet	45°27' 36" N, 2° 49' 50" E	Freshwater - Oligotrophic	22/07/2021	17.7	0.01	17	IEZ 9 m	0.8-150 µm	4	X
Pavin	45°29' 45" N, 2° 53' 16" E	Freshwater - Oligomesotrophic	22/07/2021	17.6	0.02	14.5	IEZ 11 m	0.8-150 µm	4	X
Estivadoux	45°29' 31" N, 2° 54' 05" E	Freshwater - Temporary marsh	22/07/2021	NA	NA	2.5	Surface	0.8-150 µm	4	X
Bourdouze	45°28' 11" N, 2° 55' 31" E	Freshwater - Oligotrophic	22/07/2021	21.3	0.02	16	IEZ 2 m	0.8-150 µm	4	X
Corsica	41°28' 13" N, 9° 04' 03" E	Marine - Bay	31/08/2021	24.7	NA	22	Surface	0.8-150 µm	2	
Royan (Vaux-Sur-Mer)	45°37' 42" N, 1° 03' 55" W	Marine - Estuary	15/08/2021	18.5	NA	5	Surface	0.8-150 µm	3	
Roscoff	48°46' 40" N, 3° 56' 15" W	Marine - Coastal	18/06/2021	13.9	35.1	9	Surface	>3 µm	2	
Brest	48°18' 33" N, 4° 26' 54" W	Marine - Bay	22/06/2021	16.5	36.7	20	Surface	>3 µm	4	
Arcachon	44°40' 08" N, 1° 09' 52" W	Marine - Bay	23/09/2021	19.9	33.8	10	Surface	0.8-150 µm	4	X
La Rochelle	46°05' 03" N, 1° 18' 29" W	Marine - Coastal	27/09/2021	16.9	34.8	11.5	Surface	0.8-150 µm	4	X

Supplementary Information 1: Information and metadata from the sampling sites.

NA = Not Available ; IEZ = Integrated Euphotic Zone

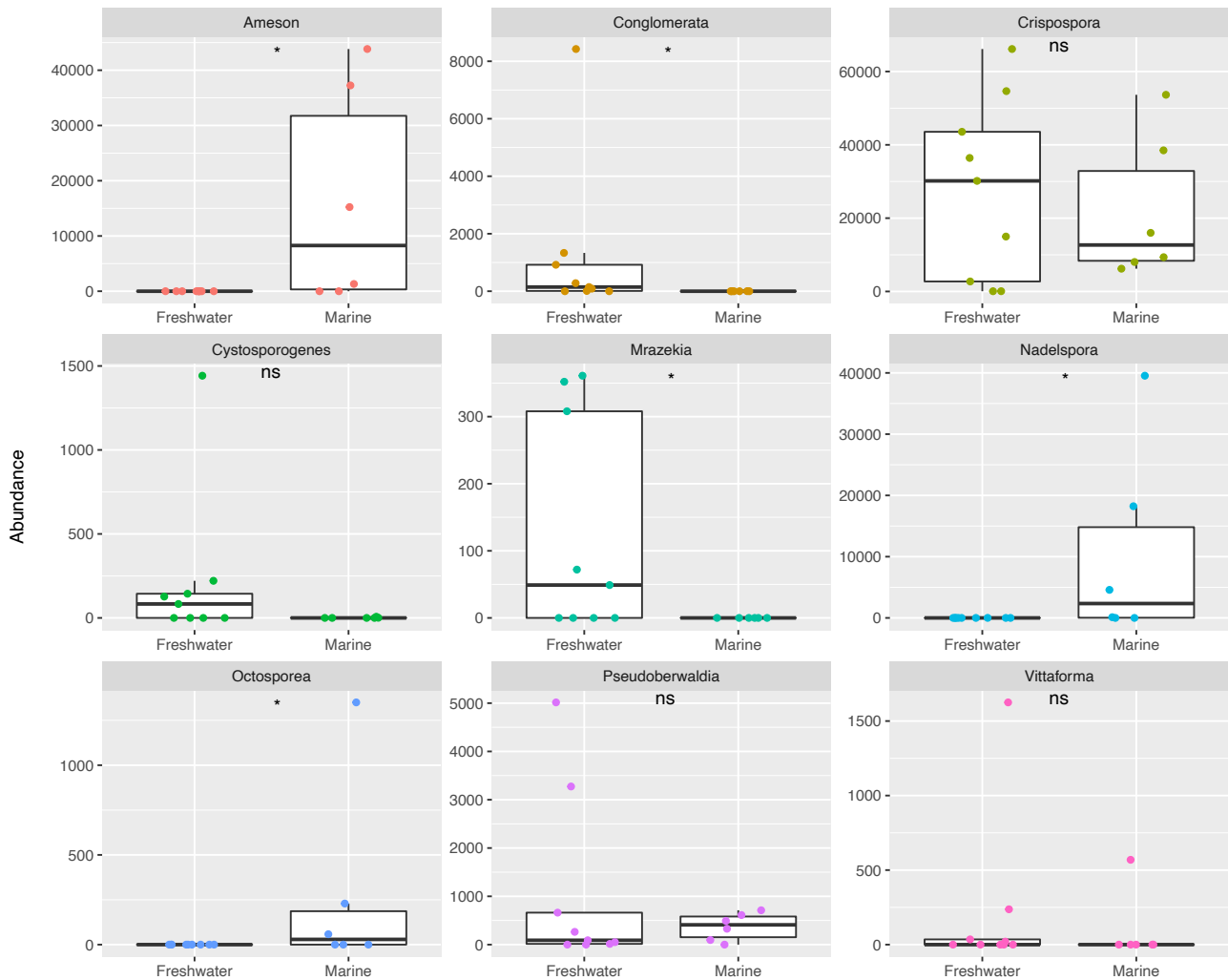


Supplementary Information 2: Rarefaction curves for the microsporidian samples.



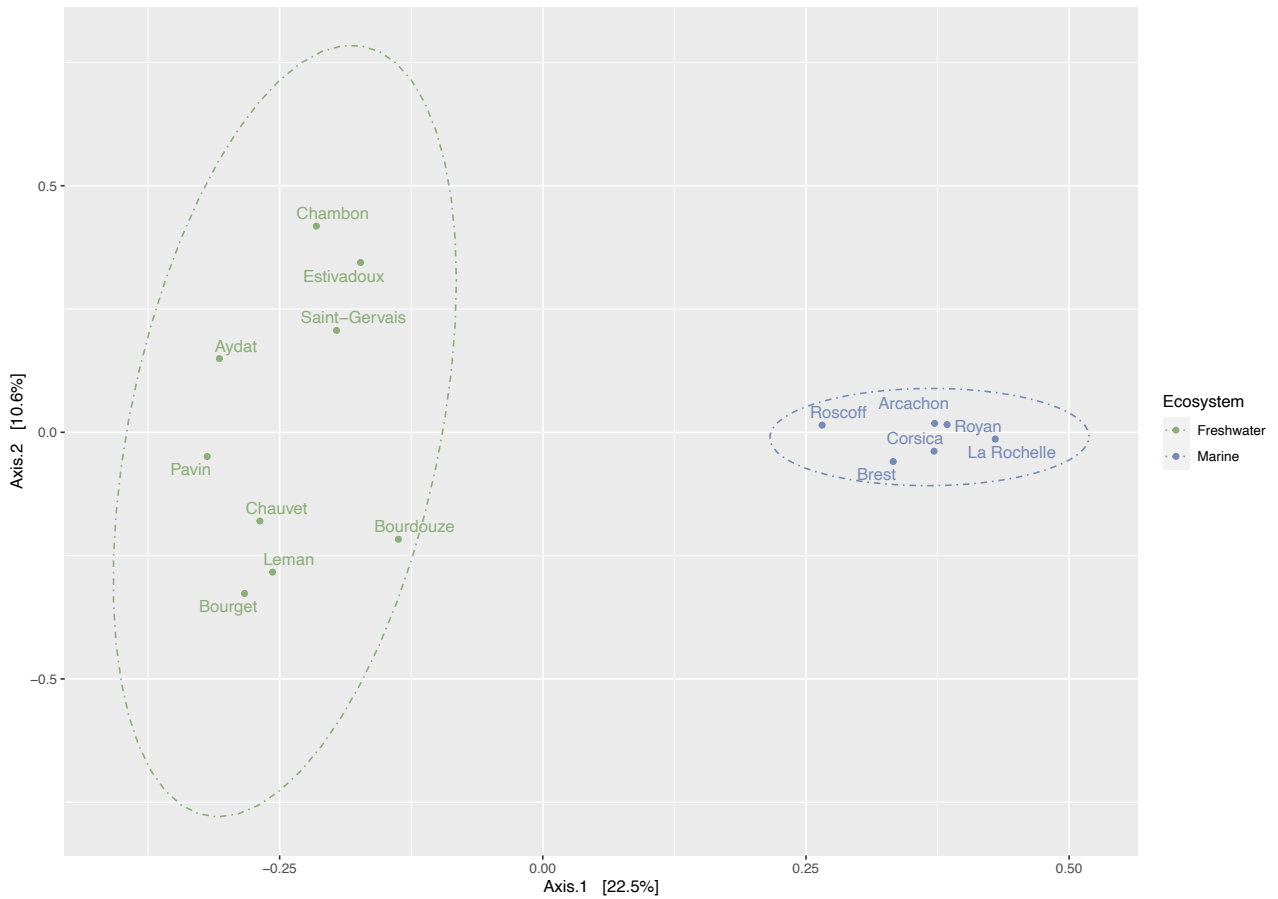
Supplementary Information 3: Boxplot showing α -diversity indices (Richness observed, Chao1, Shannon and Simpson) of Microsporidia community grouped according to the ecosystem.

(Wilcoxon test: ***, p-value < 0.001)



Supplementary Information 4: Differential abundance of the 9 most abundant microsporidian genera between the two ecosystems studied.

(Wilcoxon test: *, p-value < 0.05)



Supplementary Information 5: Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Bray- Curtis distances of the eukaryotic OTUs relative abundances across samples.

Colours of the data points indicate the ecosystem (freshwater or marine). Ellipses in the plots denote 95% confidence intervals, points that are not overlapped by the two ellipses are considered significantly different.

CHAPITRE VII

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Décrypter la diversité des parasites ainsi que leurs interactions avec les autres organismes est une étape clé vers la compréhension des flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes aquatiques, afin d'anticiper les réactions de ces écosystèmes face aux modifications environnementales (changements globaux, apports en nutriments, pollution, *etc.*). De nombreux parasites ont été étudiés ces dernières années, et leurs impacts sont progressivement intégrés dans les modélisations de fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques (Frenken *et al.*, 2017 ; Sures *et al.*, 2017). Parmi ces parasites, les microsporidies n'étaient connues dans les écosystèmes aquatiques que par la recherche d'agents infectieux chez des organismes d'intérêt (poissons et crustacés comestibles, bioindicateurs, *etc.*), chez lesquels les microsporidies peuvent avoir des impacts considérables (*e.g.* Ebert, 2005). En revanche, pour diverses raisons évoquées précédemment dans ce manuscrit, la diversité globale des microsporidies ainsi que leurs impacts dans les écosystèmes aquatiques étaient jusqu'ici grandement sous-estimés. L'objectif général de ces travaux de thèse était donc d'améliorer nos connaissances sur les microsporidies en milieux aquatiques. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à leur diversité, ainsi qu'à leur spectre d'hôtes dans des compartiments jusqu'ici sous-échantillonnés.

I. Les microsporidies dans les écosystèmes aquatiques : une diversité insoupçonnée

Avant ces travaux de thèse, seulement deux études ont exploré la diversité environnementale des microsporidies, en milieu terrestre (Ardila-Garcia *et al.*, 2013) et en milieu aquatique (principalement marin, Williams *et al.*, 2018). Ces deux études ont permis de découvrir une nouvelle diversité parmi les microsporidies, malgré un faible nombre de séquences et d'OTUs identifiés. Nos résultats mettent en évidence une diversité très importante de microsporidies dans différents environnements aquatiques, qu'ils soient d'eau douce ou marins. Les résultats obtenus dans les chapitres III, IV et VI montrent qu'une part non négligeable de la diversité est phylogénétiquement éloignée de toutes les espèces de microsporidies décrites. En moyenne, 49% des OTUs ne sont affiliés à aucun genre et 27% sont affiliés seulement à un clade. Dans les lacs Léman et Bourget par exemple, environ 80% des OTUs ne sont pas affiliés au-delà du clade, ces sites représentent ainsi d'importants réservoirs d'espèces ou genres de microsporidies encore à découvrir.

Lors de l'étude présentée dans le chapitre III, nous avons développé une base de données reposant sur l'analyse phylogénétique de 265 espèces de microsporidies qui nous a permis de les classer en neuf clades distincts. Au cours des différentes études, nous avons été en mesure d'identifier une large diversité de microsporidies réparties dans sept de ces neuf clades. En effet, nous n'avons retrouvé aucune séquence affiliée aux clades VI et VII. Bien que parasites de crustacés d'eau douce, ces clades ne regroupent cependant que très peu d'espèces décrites. Parmi les genres de microsporidies identifiés, *Crispospora*, *Conglomerata*, *Pseudoberwaldia*, *Ameson* et *Nadelspora* sont les plus abondants. Ceux-ci sont tous décrits comme parasitant des hôtes aquatiques, parmi les crustacés (*e.g.* daphnies, crabes, crevettes) ou les insectes (*e.g.* diptères dont les larves vivent en milieu aquatique) (Murareanu *et al.*, 2021). Cependant, tous ces hôtes sont d'une taille bien supérieure à celle visée lors de nos études (*i.e.* 150 µm maximum). Identifier ces microsporidies dans de telles fractions de taille soulève alors deux hypothèses : (i) celles-ci pourraient simplement circuler sous leur forme libre (spore) à travers l'ingestion/filtration d'organismes de classes de taille différentes et/ou (ii) elles pourraient infecter d'autres hôtes que ceux chez lesquels elles sont décrites, notamment dans le compartiment des microeucaryotes. Bien que la première hypothèse ne puisse pas être exclue, les résultats obtenus montrent que la deuxième hypothèse est pertinente. En effet, nous avons par exemple montré que le genre *Crispospora*, connu uniquement comme parasite d'insectes (*i.e.* chironomes) (Tokarev *et al.*, 2010), peut parasiter un rotifère en milieu lacustre avec une forte prévalence (chapitre V). Par ailleurs, ce même genre est retrouvé très abondamment dans la plupart des sites que nous avons échantillonnés, y compris les sites marins (chapitre VI) représentant à lui seul, en moyenne, 38% des OTUs identifiés. Pourtant, ni les chironomes ni les rotifères ne sont abondants en milieu marin, ce qui soulève l'hypothèse d'un ou plusieurs autres hôtes pour le genre *Crispospora*. La proportion de *Crispospora* identifiée dans nos études suggère également qu'une diversité importante reste à découvrir au sein de ce genre où une seule espèce est actuellement décrite. Nous avons ainsi mis en évidence une potentielle nouvelle espèce de *Crispospora* capable d'infecter le rotifère *Kellicottia* en milieu lacustre (chapitre V). De plus, 20% des espèces de microsporidies sont déjà décrites comme infectant au moins deux espèces hôtes différentes (Murareanu *et al.*, 2021), certaines infectant des hôtes très divers (Stentiford *et al.*, 2016). L'accumulation de données concernant de nouveaux hôtes permettra sans doute de révéler de nouvelles espèces de microsporidies généralistes.

Ces études nous ont également permis de constater que la diversité des microsporidies est relativement spécifique à chaque site étudié. En effet, celle-ci peut être complètement

différentes entre deux lacs, ou encore entre deux sites marins. Chacun des sites étudiés présente par ailleurs des OTUs spécifiques (en moyenne 1% des OTUs). Ces résultats montrent ainsi l'importance de poursuivre l'échantillonnage d'un large panel d'environnements afin de révéler l'étendue de la diversité des microsporidies. Malgré la découverte d'une diversité très importante aux cours de nos études, nous sommes probablement encore loin d'avoir mis en lumière toute la diversité des microsporidies en milieu aquatique. Il serait ainsi pertinent de suivre l'évolution de cette diversité au cours du temps dans différents types d'environnements, plus divers que ceux étudiés ici, en incluant par exemple les écosystèmes de rivière dans lesquels la diversité des microsporidies n'a jamais été évaluée. L'exploration de la diversité des microsporidies reste malgré tout à poursuivre dans les écosystèmes étudiés ici, en particulier en milieu marin où très peu de sites ont été échantillonnés, mais où nous avons découvert une diversité très différente de celle identifiée en milieu lacustre.

Au cours de ces études, nous avons également pu constater que les variations spatio-temporelles dans l'abondance relative des différents clades, groupes et genres de microsporidies ne semblent pas liées aux variables environnementales étudiées. Cependant, les variables environnementales suivies au cours de nos études sont peu nombreuses et il sera important à l'avenir d'en inclure plus en parallèle du suivi de la diversité des microsporidies. Des analyses *in vitro* ont montré que divers paramètres tels que des changements locaux de pH, de concentration en sel, de rayonnement UV et de température, peuvent favoriser ou inhiber la dévagination du tube polaire et la décharge du contenu sporal, et donc avoir un impact sur les taux d'infection (Weiss *et al.*, 2014). Il serait ainsi intéressant d'évaluer l'influence potentielle de ces paramètres sur la distribution des microsporidies environnementales. Cependant, nos résultats montrent que la distribution des communautés de microsporidies serait plutôt liée à la dynamique de leurs hôtes. Il a, en effet, déjà été montré que les variations des communautés de différents parasites (*e.g.* chytrides, Perkinsea) sont principalement dues à la disponibilité et l'abondance de leurs hôtes dinoflagellés (Alacid *et al.*, 2017 ; Fernandez-Valero *et al.*, 2022).

L'ensemble de nos données a également permis de démontrer la pertinence de l'approche développée dans le chapitre III. En effet, le but de cette étude était de proposer une méthodologie visant à étudier la diversité environnementale des microsporidies par métabarcoding *via* (i) la définition d'un seuil de clusterisation adapté aux microsporidies et (ii) la mise en place d'une base de données robuste, basée sur une analyse phylogénétique et bibliographique, qui permet de classer les espèces de microsporidies dans un cadre cohérent. Cependant, en 2022, Bojko et collaborateurs ont proposé un nouveau cadre taxonomique pour

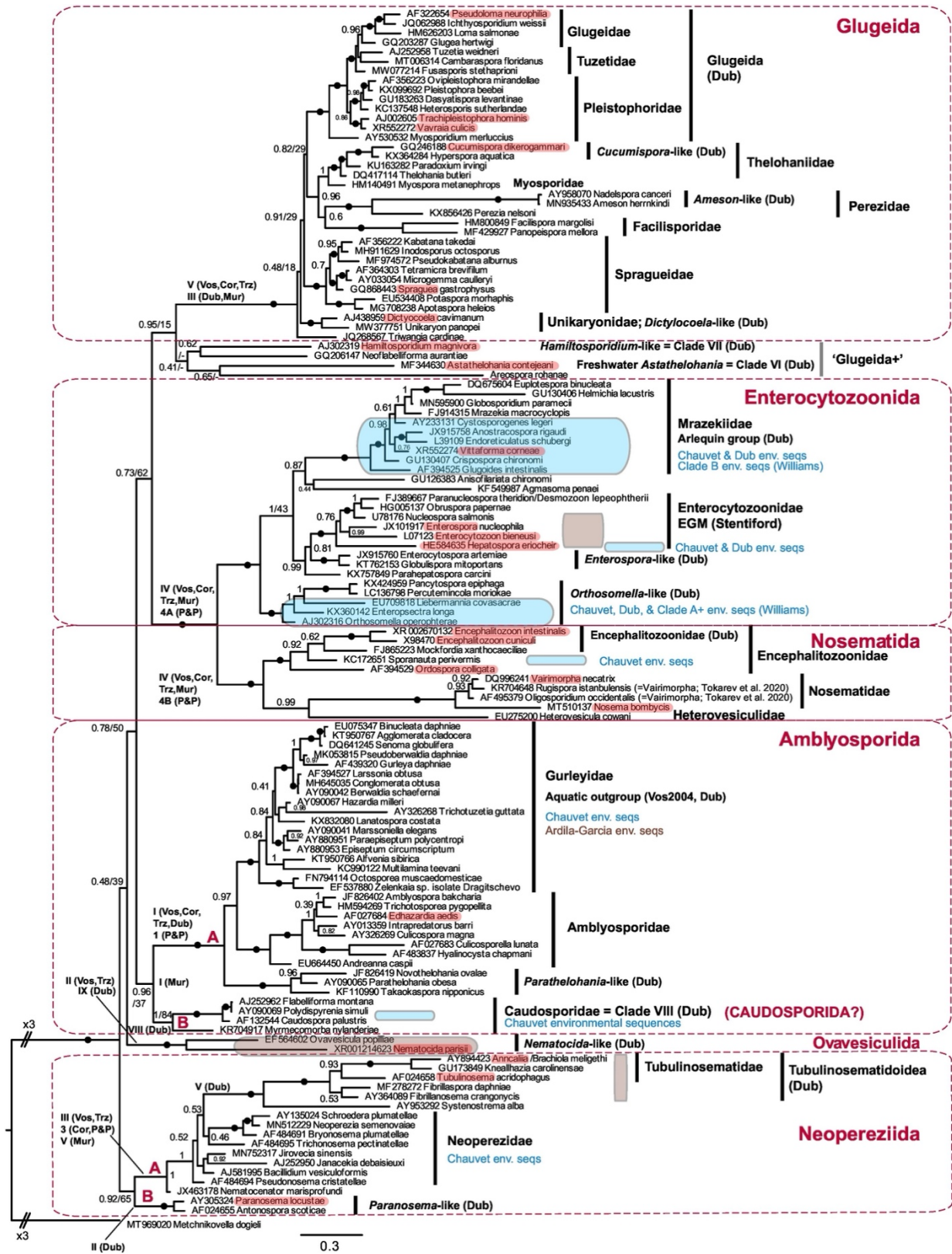


Figure 42 : Arbre phylogénétique des microsporidies présentant un nouveau cadre taxonomique.

Cet arbre présente la nouvelle classification proposée par Bojko et collaborateurs en 2022. Les anciens numéros de clades sont indiqués sur les nœuds : Vos = Vossbrinck *et al.*, 2014; Cor = Corsaro *et al.*, 2019; Trz = Trzebnny *et al.*, 2020; Dub = Dubuffet *et al.*, 2021 ; Mur = Murareanu *et al.*, 2021 ; P&P = Park et Poulin, 2021. Les regroupements proposés sont indiqués par les encadrés en pointillés rouges, et les noms associés sont indiqués en rouge. Les blocs ombragés en bleu et marron indiquent les régions phylogénétiques où des séquences environnementales (provenant d'études aquatiques et terrestres respectivement) ont été identifiées (Ardila-Garcia *et al.*, 2013 ; Williams *et al.*, 2018 ; Dubuffet *et al.*, 2021 ; Chauvet *et al.*, 2022). Les genres ou espèces représentatifs pour lesquels des séquences génomiques sont disponibles sont mis en évidence par un ombrage rouge. Bojko *et al.*, 2022

remplacer le système de numérotation des clades (**Figure 42**), en utilisant des noms taxonomiques informels mais plus informatifs : Glugeida (correspondant au clade III), Nosematida (IV1), Enterocytozoonida (IV2), Amblyosporida (I et VIII), Neopereziida (II et V), et Ovavesiculida (IX). Ces noms de groupes font référence à une entité taxonomique clé acceptée (un « groupe » ou « ordre » solidement soutenu), et sont donc plus informatifs que le système de numérotation abstrait (**Figure 42**). L'utilisation de cette classification par l'ensemble de la communauté travaillant sur la diversité des microsporidies environnementales permettra sans aucun doute une comparaison et une intégration plus efficaces des informations obtenues au cours des différentes études. Il serait ainsi pertinent de mettre à jour notre base de données afin de nous adapter à cette classification.

Ces études de métabarcoding, bien que nous ayant permis de faire avancer de façon significative nos connaissances sur la diversité des microsporidies en milieu aquatique, présentent toutefois l'inconvénient de n'être basées que sur des séquences courtes (région V1-V3 du gène codant pour la petite sous-unité de l'ARNr (SSU)). Ces séquences peuvent parfois être insuffisantes pour distinguer les espèces de microsporidies (Bojko *et al.*, 2022). Deux espèces de microsporidies peuvent par exemple présenter une séquence de SSU identique, mais n'avoir que 92% d'identité sur l'ensemble du génome (Reinke *et al.*, 2017). Il serait donc pertinent de travailler sur des séquences plus longues, intégrant la région ITS ainsi que les régions SSU et LSU les plus complètes possibles *via* le séquençage long read (Stentiford *et al.*, 2018 ; Bojko *et al.*, 2022). Dans cette optique, une étape de design d'amorces devra être envisagée, de telles amorces n'étant actuellement disponibles que pour des groupes restreints de microsporidies (Bojko *et al.*, 2022). Intégrer un marqueur tel que l'ITS, évoluant plus rapidement que le SSU, permettra de différencier les espèces étroitement apparentées et de guider notre compréhension de la diversité dans les études de diversité environnementale. Le séquençage de l'ITS a par exemple déjà été utilisé pour caractériser des espèces de microsporidies parasites de daphnies (Gonzalez-Tortuero *et al.*, 2016). En définitive, le séquençage des génomes entiers permettra également d'aborder plus en profondeur la diversité au sein de certains groupes d'espèces étroitement apparentées (Williams *et al.*, 2016 ; Bojko *et al.*, 2022). A ce jour, environ 40 génomes d'espèces décrites de microsporidies sont disponibles. Ces génomes proviennent d'espèces parasites de l'Homme, de crustacés, d'insectes, de vers (annélides et nématodes) et de poissons.

Enfin, les données de métabarcoding, bien que très informatives sur la diversité et l'abondance relative des différents groupes de microsporidies, ne nous permettent cependant pas d'obtenir des abondances réelles. Il est donc nécessaire de développer des approches afin d'obtenir des données quantitatives, encore manquantes, sur les microsporidies environnementales. L'une de ces approches est la PCR quantitative (qPCR), qui pourrait permettre une quantification absolue des microsporidies, du moins en termes de nombre de copies du gène codant pour la petite sous unité de l'ARNr. Cette méthode passerait par l'utilisation d'un standard, un plasmide contenant un fragment de l'ADNr 18S (Bustin *et al.*, 2009 ; Lefèvre *et al.*, 2010). Les quelques données disponibles à ce jour sur le nombre de copies du gène de l'ARNr chez les microsporidies montrent que celui-ci est relativement faible comparativement aux autres eucaryotes, le maximum identifié étant de 22 copies chez *E. cuniculi* (Jespersen *et al.*, 2022). Obtenir de telles données quantitatives sur les microsporidies en milieu aquatique, permettrait une meilleure estimation de leur impact écologique.

II. Étendue du spectre d'hôtes des microsporidies aquatiques

Jusqu'ici, les hôtes des microsporidies ont généralement été identifiés suite à des études ciblées sur des hôtes d'intérêt et facilement échantillonnables. Ainsi, de nombreuses études ont porté sur les microsporidies parasites de l'Homme (Han *et al.*, 2021), des poissons et crustacés comestibles (Schuster *et al.*, 2022), des insectes auxiliaires (Martinez-Lopez *et al.*, 2022), ou des bioindicateurs en eau douce (Vávra *et al.*, 2019). En milieu aquatique, les microsporidies sont donc majoritairement décrites comme parasites de poissons, de crustacés et d'insectes (Murareanu *et al.*, 2021 ; Bojko *et al.*, 2022). Chez ces hôtes, les impacts de l'infection sont divers (retard de croissance, diminution de la fécondité, mortalité importante, *etc.*). Chez les daphnies par exemple, les impacts de l'infection par une microsporidie vont de la réduction plus ou moins importante de la fécondité et de la survie, en passant par une augmentation de leur vulnérabilité vis-à-vis de leurs prédateurs (Ebert, 2005), et peuvent aller jusqu'à une possible extinction de la population hôte (montrée en laboratoire, Ebert *et al.*, 2000). Les daphnies sont connues pour jouer un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes, de par leur fonction épuratrice, leur régulation du phytoplancton, et elles sont également source d'alimentation importante pour de nombreuses espèces aquatiques et semi-aquatiques (Miner *et al.*, 2012). De par leur impact sur les daphnies, les microsporidies ont ainsi le potentiel d'impacter fortement la structure des réseaux trophiques.

Chez les organismes à la base du fonctionnement de ces réseaux (*e.g.* protistes, microplancton), les descriptions de microsporidies sont plus anecdotiques. Quelques espèces sont en effet décrites chez des protistes : 11 espèces de ciliés, 20 espèces de grégaires, 4 espèces d'amibozoaires et 2 espèces de paramyxides sont connues comme hôtes ; mais ces descriptions sont souvent uniquement morphologiques (Stentiford *et al.*, 2017 ; Yakovleva *et al.*, 2020 ; Murareanu *et al.*, 2021). Seulement deux espèces de microsporidies sont par exemple caractérisées par des approches morphologiques et moléculaires chez les ciliés (Fokin *et al.*, 2008 ; Yakovleva *et al.*, 2020). Deux genres de rotifères ont également été décrits comme hôtes mais grâce à des observations morphologiques uniquement (Gorbunov et Kosova, 2001 ; Wolska et Mazurkiewicz-Zapalowicz, 2013). De plus, aucun cas d'infection chez un organisme phytoplanctonique n'a jamais été rapporté, du moins pour les microsporidies « classiques » étudiées lors de cette thèse. Le développement d'approche « sans *a priori* » (*i.e.* non ciblée) est donc indispensable pour découvrir la réelle étendue du spectre d'hôte des microsporidies, afin de mieux appréhender leurs impacts sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

L'inférence de réseaux de cooccurrence permet la mise en évidence simultanée d'une multitude de potentielles associations entre organismes, de façon non ciblée (*e.g.* Chaffron *et al.*, 2010 ; Lima-Mendez *et al.*, 2015). Ces méthodes, dont l'utilisation s'amplifie ces dernières années, ont permis de mieux comprendre les interactions microbiennes et l'organisation des communautés jusqu'alors inconnues (Röttgers et Faust, 2018) dans divers environnements (*e.g.* marin, terrestre, microbiote humain ; Guidi *et al.*, 2016 ; Jackson *et al.*, 2018 ; Mandakovic *et al.*, 2018). Nous avons ainsi employé cette approche au travers de deux méthodes différentes (voir chapitre II) afin de détecter de potentielles associations hôte-parasite entre microsporidies et autres eucaryotes planctoniques (chapitres IV et VI).

Par le biais des différents réseaux de cooccurrence établis, nous avons principalement identifié de potentielles associations avec les métazoaires et les alvéolés. Les premiers sont les principaux hôtes décrits des microsporidies. Les arthropodes, par exemple, fréquemment impliqués dans nos réseaux, sont les organismes chez lesquels le plus de microsporidies ont été décrites, majoritairement chez les insectes et crustacés (Murareanu *et al.*, 2021). Lors de notre étude temporelle dans le lac d'Aydat (chapitre IV), nous avons également identifié plusieurs associations potentielles avec des rotifères. Parmi les alvéolés, nous avons principalement relevé des cooccurrences avec les ciliés et les dinoflagellés. Les premiers ont, par de rares occasions et souvent uniquement morphologiquement, été décrits comme hôtes (*e.g.* Fokin *et*

al., 2008). En revanche, il n'existe à ce jour aucune description de microsporidie parasite de dinoflagellés. Enfin, nous avons, lors des deux études, identifié des cooccurrences avec différents groupes d'organismes phytoplanctoniques (*e.g.* diatomées, Chlorophyta).

Les réseaux de cooccurrence permettent ainsi de mettre en évidence des associations potentielles entre les microorganismes, bien que ce type d'analyses ne garantisse pas la découverte d'interactions biotiques (Blanchet *et al.*, 2020). Il convient ainsi d'être prudent dans l'interprétation des résultats car la cooccurrence de deux espèces n'implique pas nécessairement qu'elles interagissent. La co-présence de deux espèces peut en effet résulter de préférences environnementales partagées (Chaffron *et al.*, 2010) ou être expliquée par un troisième facteur tel qu'un paramètre abiotique ou une espèce non présente dans l'ensemble des données (Röttjers et Faust, 2018). Afin d'adresser partiellement ce dernier problème, l'un des outils récemment développés pour l'inférence de réseaux de cooccurrence permet d'intégrer les données environnementales associées aux données de métabarcoding. En effet, FlashWeave est basée sur les mêmes outils statistiques que SPIEC EASI (utilisé dans le chapitre IV), mais permet également l'intégration de paramètres abiotiques (Tackmann *et al.*, 2019). L'utilisation de cette méthode peut ainsi permettre d'éviter d'inférer de fausses associations résultant en réalité de l'influence d'un paramètre abiotique. Finalement, comme le mentionnent Carr et collaborateurs (2019), les associations inférées par des outils bio-informatiques sont extrêmement utiles pour réduire le nombre d'hypothèses potentielles qui pourraient être testées, mais n'excluront jamais la nécessité d'une validation expérimentale. Les associations potentielles identifiées durant les études présentées dans ce manuscrit (chapitres IV et VI) *via* l'inférence de réseaux de cooccurrence nous ont ainsi permis d'émettre des hypothèses que nous avons tentées de confirmer par des approches permettant l'observation et l'identification des deux partenaires.

L'utilisation d'une sonde spécifique des microsporidies nous a permis d'observer des associations hôte-parasite *in situ* en milieu lacustre ainsi qu'en milieu marin. En effet, nous avons pu identifier principalement des associations répétées avec des rotifères appartenant au genre *Kellicottia* (chapitres IV, V et VI) dans les lacs d'Aydat et Chauvet, confirmant ainsi les associations avec des rotifères proposées par les réseaux de cooccurrence. Les rotifères, notamment ceux appartenant au genre *Kellicottia*, sont relativement abondants dans les écosystèmes lacustres, et dominent souvent les communautés zooplanctoniques (Lair et Oulad Ali, 1990 ; Rico-Martínez *et al.*, 2016). Ils jouent le rôle d'intermédiaires entre les producteurs primaires (algues, cyanobactéries) et les niveaux trophiques supérieurs (autres organismes zooplanctoniques, crustacés, poissons), et contribuent au recyclage des nutriments dans certains

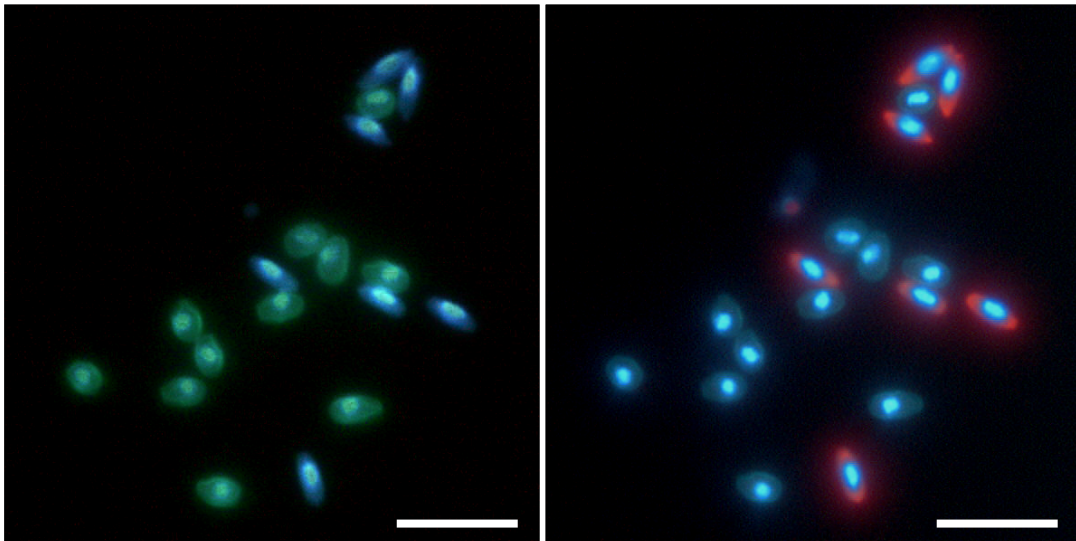


Figure 43 : Marquages de microsporidies par FISH et DY96 (marqueur de chitine).

Les microsporidies marquées par la sonde (en rouge, à droite), ne possèdent pas de chitine. Les spores, possédant une couche de chitine (en vert, à gauche) ne sont pas marquées par la sonde. Espèce : *Anncaliia algerae*. Echelles = 10 μ m.

environnements (Wallace *et al.*, 2006). Nous avons également identifié des associations avec des dinoflagellés (chapitre VI), en eau douce et en milieu marin (lacs : Léman, Bourget, Saint Gervais ; marin : La Rochelle), ce résultat venant également confirmer les associations identifiées *via* les réseaux de cooccurrence. Les dinoflagellés sont particulièrement abondants en milieu lacustre ainsi qu'en milieu marin, et présentent une large diversité de mode trophique (autotrophie, hétérotrophie ou mixotrophie). Ils sont parmi les principaux producteurs primaires, font également partie des consommateurs intermédiaires, certains sont parasites, ou encore d'importants producteurs de toxines (Carty et Parrow, 2015). Ces découvertes étendent considérablement le spectre d'hôte des microsporidies, en particulier concernant les dinoflagellés jusqu'ici non décrits comme hôtes de microsporidies. Dans les milieux marins et lacustres, les populations de dinoflagellés peuvent être régulées par différents parasites, tels que les chytrides, les Perkinsea, ou encore d'autres dinoflagellés (Guillou *et al.*, 2008 ; Jephcott *et al.*, 2016 ; Frenken *et al.*, 2017). Les microsporidies pourraient ainsi s'ajouter à la diversité des parasites de dinoflagellés déjà connus et participer de façon significative à leur dynamique dans les environnements aquatiques. Enfin, nous avons également identifié des associations avec des diatomées (*Asterionella* ; chapitre IV). Ces associations ont cependant été constatées avec un taux de prévalence faible (*i.e.* <0,1%) et sont extracellulaires. Ces associations potentielles doivent être confirmées et leur nature reste à étudier.

Malgré ces résultats intéressants, nous avons identifié peu d'associations *in situ* avec la méthode TSA-FISH, compte tenu du nombre d'échantillons observés (34 échantillons observés en duplicat au minimum). La technique FISH présente différents points critiques et axes d'amélioration possibles, tels que la fixation et perméabilisation des échantillons (Kubota, 2013 ; Piwosz *et al.*, 2021). De plus, les microsporidies sous leur forme de spore ne peuvent pas être détectées avec l'utilisation de sonde oligonucléotidique. En effet, les spores sont constituées d'une paroi très résistante, contenant de la chitine, qui empêche les sondes de pénétrer dans la cellule (**Figure 43**). Ceci rend alors impossible l'observation de microsporidies libres dans l'environnement (sous leur stade de dissémination, la spore), ou au sein de leur hôte, en présence uniquement du stade de spore.

Les différents résultats obtenus *via* les réseaux de cooccurrence et l'hybridation *in situ*, nous ont amenés à développer d'autres approches ayant pour but (i) la mise en évidence ou la confirmation de nouvelles associations hôte-microsporidie (ii) la caractérisation morphologique et moléculaire des deux partenaires et (iii) l'obtention de couples hôte-parasite en culture.

Nous avons ainsi mené des tests d'infection en microcosmes. Pour cela, différentes cultures d'hôtes potentiels ont été mises en contact avec un concentré d'eau du lac Aydat et de sédiments (tous deux contenant *a priori* des stades de dissémination de divers parasites, *i.e.* spores et zoospores) afin d'induire des infections et de suivre l'évolution des cultures hôtes et des associations potentielles. Ainsi, des cultures de ciliés (*Vorticella*, *Euplotes* et *Paramecium*), de zooplancton (*Daphnia*) ainsi que de diatomées (*Asterionella*), ont été utilisées. Pendant 20 jours, un suivi de croissance des cultures a été mené et des prélèvements journaliers ont été réalisés afin d'identifier de potentielles infections par des microsporidies notamment en hybridation *in situ*. De tels tests d'infection ont déjà été menés afin de provoquer des infections par des microsporidies chez *Daphnia magna*. En effet, Ebert (1995), Decaestecker *et al.* (2004) ainsi que Jansen *et al.* (2010) ont montré qu'il est possible de provoquer des infections à partir de sédiments. Récemment, Fernandez-Valero et collaborateurs (2022), ont également réussi à provoquer des infections par des chytrides chez des hôtes dinoflagellés, et à maintenir des couples hôte-parasite en culture à partir d'inocula.

Les tests d'infection en microcosmes menés ici se sont révélés infructueux bien que certaines populations mises en contact du sédiment et/ou du concentrat d'eau aient montré une croissance nettement ralentie en comparaison des populations témoins. Des infections par d'autres microorganismes présents dans le sédiment et le concentrat d'eau pourraient expliquer cet effet. Il a par exemple été montré à diverses reprises que des tentatives d'infection à partir de sédiments chez des daphnies résultent souvent en une infection par la bactérie *Pasteuria ramosa* (Decaestecker *et al.*, 2002, 2004 ; Jansen *et al.*, 2010).

L'échec de cette expérience nous a amené à utiliser une autre approche qui nous a permis de caractériser moléculairement une association hôte-parasite. En effet, après avoir isolé manuellement et un à un des rotifères du lac d'Aydat appartenant au genre *Kellicottia*, nous avons identifié une potentielle nouvelle espèce de microsporidie appartenant au genre *Crispospora* (chapitre V). Ces associations, que nous avons également confirmées en hybridation *in situ*, sont non négligeables puisque plus de 42% des rotifères étaient parasités. Le genre *Crispospora* n'est, à l'heure actuelle, défini que par une espèce (*Crispospora chironomi*) parasite de larve de diptère (Tokarev *et al.*, 2010). Comme soupçonné précédemment, il semblerait ainsi que le spectre d'hôte de *Crispospora* soit plus divers, ce qui pourrait expliquer son abondance relative dans les écosystèmes aquatiques. Bien que chronophage et délicate, cette approche de micromanipulation couplée à de l'amplification du génome complet, permet la mise en évidence d'associations hôte-parasite et leur caractérisation moléculaire, et pourrait être utilisée afin de cibler divers hôtes potentiels mis en évidence par

les réseaux de cooccurrence par exemple. Elle permettrait également théoriquement de séquencer le génome des deux protagonistes.

Les tentatives d'infection en microcosmes ainsi que la micromanipulation d'hôtes potentiellement infectés à partir de l'environnement sont des approches qui peuvent également permettre l'obtention de couples hôte-parasite en culture. Il nous semble donc important de les renouveler à l'avenir. En effet, un couple hôte-microsporidie en culture permettrait une description morphologique et génomique de potentielles nouvelles espèces de microsporidies, ainsi qu'une analyse de l'effet du parasite sur la survie et/ou la fécondité des populations hôtes et une caractérisation du cycle de développement des parasites.

III. Conclusion générale

Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés aux microsporidies dans les écosystèmes aquatiques. Plus précisément, nous avons évalué leur diversité dans différents environnements aquatiques ainsi que leur spectre d'hôtes dans des compartiments jusqu'ici sous-étudiés. Nous avons ainsi découvert, grâce à une approche adaptée pour leur étude en métabarcoding, une diversité bien plus importante qu'initialement décrite, associée à des variations spatio-temporelles notables. Nous avons également montré, *via* une combinaison d'approches complémentaires, que leur spectre d'hôte est plus divers que précédemment décrit parmi les organismes à la base du fonctionnement des réseaux trophiques. Dans l'ensemble, ces nouveaux résultats indiquent que les microsporidies pourraient avoir un impact considérable dans les écosystèmes aquatiques à l'instar d'autres parasites déjà décrits aussi bien dans les océans que dans les lacs. Ainsi, les microsporidies ont le potentiel d'impacter les transferts de matière et d'énergie dans les réseaux trophiques, en parasitant potentiellement des organismes situés à tous les niveaux de la chaîne trophiques : protistes, producteurs primaires, zooplancton, poissons, autres parasites, *etc.* Il est maintenant nécessaire d'obtenir des données quantitatives sur les microsporidies environnementales, ainsi que d'étudier plus en détail leurs associations avec leurs hôtes, afin de pouvoir évaluer la contribution relative des microsporidies dans la régulation de certaines communautés. A terme, intégrer les microsporidies dans les modélisations de fonctionnement des réseaux trophiques permettra sans aucun doute de révéler un impact important sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES
DES CHAPITRES I, II ET VII

A

- Aitchison, J. (1981) A new approach to null correlations of proportions. *Mathematical Geology* **13**: 175–189.
- Alacid, E., Reñé, A., Camp, J., and Garcés, E. (2017) In situ Occurrence, Prevalence and Dynamics of Parvilucifera Parasitoids during Recurrent Blooms of the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Front Microbiol* **8**: 1624.
- Amann, R., Fuchs, B.M., and Behrens, S. (2001) The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 231–236.
- Amann, R. and Fuchs, B.M. (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* **6**: 339–348.
- Amundsen, P.-A., Lafferty, K.D., Knudsen, R., Primicerio, R., Klemetsen, A., and Kuris, A.M. (2009) Food web topology and parasites in the pelagic zone of a subarctic lake. *Journal of Animal Ecology* **78**: 563–572.
- Anderson, R.M. and May, R.M. (1979) Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature* **280**: 361–367.
- Andreadis, T.G. (1985) Life cycle, epizootiology, and horizontal transmission of *Amblyospora* (Microspora: Amblyosporidae) in a univoltine mosquito, *Aedes stimulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* **46**: 31–46.
- Ardila-Garcia, A.M., Raghuram, N., Sihota, P., and Fast, N.M. (2013) Microsporidian diversity in soil, sand, and compost of the Pacific Northwest. *J Eukaryot Microbiol* **60**: 601–608.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., and Thingstad, F. (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar Ecol Prog Ser* **10**: 257–263.
- Azevedo, C. and Hine, P.M. (2016) Haplosporidia. In *Handbook of the Protists*. Archibald, J.M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H., Margulis, L., Melkonian, M., Chapman, D.J., and Corliss, J.O. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 1–29.

B

- Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V., and Undeen, A.H. (1994) Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J Invertebr Pathol* **64**: 100–106.
- Balbani, G. Sur les microsporidies ou les sporospermies des articules. *C R Acad Sci* **95**: 1168–1178.
- Bass, D., Stentiford, G.D., Littlewood, D.T.J., and Hartikainen, H. (2015) Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. *Trends in Parasitology* **31**: 499–513.
- Bass, D., Czech, L., Williams, B.A.P., Berney, C., Dunthorn, M., Mahé, F., et al. (2018) Clarifying the Relationships between Microsporidia and Cryptomycota. *J Eukaryot Microbiol* **65**: 773–782.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **57**: 289–300.
- Benoiston, A.-S. (2019) Méta-omique et méta-données environnementales : vers une nouvelle compréhension de la pompe à carbone biologique. Thèse : Paris, FR. Sorbonne Université.
- Beule, L. and Karlovsky, P. (2020) Improved normalization of species count data in ecology by scaling with ranked subsampling (SRS): application to microbial communities. *PeerJ* **8**: e9593.
- Beznoussenko, G.V., Dolgikh, V.V., Seliverstova, E.V., Semenov, P.B., Tokarev, Y.S., Trucco, A., et al. (2007) Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function. *Journal of Cell Science* **120**: 1288–1298.
- Bigliardi, E. and Sacchi, L. (2001) Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection* **3**: 373–379.
- Bjørnson, S. and Oi, D. (2014) Microsporidia Biological Control Agents and Pathogens of Beneficial Insects. In *Microsporidia*. Weiss, L.M. and Becnel, J.J. (eds). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc., pp. 635–670.

- Blanchet, F.G., Cazelles, K., and Gravel, D. (2020) Co-occurrence is not evidence of ecological interactions. *Ecol Lett* **23**: 1050–1063.
- Bojko, J., Reinke, A.W., Stentiford, G.D., Williams, B., Rogers, M.S.J., and Bass, D. (2022) Microsporidia: a new taxonomic, evolutionary, and ecological synthesis. *Trends in Parasitology* S1471492222001106.
- Bojko, J. and Stentiford, G.D. (2022) Microsporidian Pathogens of Aquatic Animals. In *Microsporidia*. Experientia Supplementum. Weiss, L.M. and Reinke, A.W. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 247–283.
- Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., et al. (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* **10**: 57–59.
- Buck, J.C. and Ripple, W.J. (2017) Infectious Agents Trigger Trophic Cascades. *Trends in Ecology & Evolution* **32**: 681–694.
- Bunke, M., Dick, J., Hatcher, M., and Dunn, A. (2019) Parasites influence cannibalistic and predatory interactions within and between native and invasive amphipods. *Dis Aquat Org* **136**: 79–86.
- Burki, F., Roger, A.J., Brown, M.W., and Simpson, A.G.B. (2020) The New Tree of Eukaryotes. *Trends Ecol Evol* **35**: 43–55.
- Burki, F., Sandin, M.M., and Jamy, M. (2021) Diversity and ecology of protists revealed by metabarcoding. *Current Biology* **31**: R1267–R1280.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**: 611–622.

C

- Cali, A. and Takvorian, P.M. (2014) Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. In *Microsporidia*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 71–133.
- Cali, A., Becnel, J.J., and Takvorian, P.M. (2017) Microsporidia. In *Handbook of the Protists*. Springer, Cham, pp. 1559–1618.
- del Campo, J., Bass, D., and Keeling, P.J. (2020) The eukaryome: Diversity and role of microeukaryotic organisms associated with animal hosts. *Funct Ecol* **34**: 2045–2054.
- Canter, H.M. and Lund, J.W.G. (1948) Studies on Plankton Parasites. *New Phytologist* **47**: 238–261.
- Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., and Gabaldón, T. (2012) Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *14*.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 4516–4522.
- Carr, A., Diener, C., Baliga, N.S., and Gibbons, S.M. (2019) Use and abuse of correlation analyses in microbial ecology. *ISME J* **13**: 2647–2655.
- Carty, S. and Parrow, M.W. (2015) Dinoflagellates. In *Freshwater Algae of North America*. Elsevier, pp. 773–807.
- Cavalier-Smith, T. (1983) A 6-Kingdom Classification And A Unified Phylogeny. In *Intracellular space as oligogenetic ecosystem*. *Proceedings*. De Gruyter, pp. 1027–1034.
- Chaffron, S., Rehrauer, H., Pernthaler, J., and Mering, C. von (2010) A global network of coexisting microbes from environmental and whole-genome sequence data. *Genome Res* **20**: 947–959.
- Chambouvet, A., Morin, P., Marie, D., and Guillou, L. (2008) Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. *Science* **322**: 1254–1257.
- Chauvet, M., Debroyas, D., Moné, A., Dubuffet, A., and Lepère, C. (2022) Temporal variations of Microsporidia diversity and discovery of new host-parasite interactions in a lake ecosystem. *Environmental Microbiology* **15**.
- Chauvet, M., Monjot, A., Moné, A., and Lepère, C. (2022) Single Cell Analysis Reveals a New Microsporidia-Host Association in a Freshwater Lake. *Microb Ecol*.
- Cleary, A.C. and Durbin, E.G. (2016) Unexpected prevalence of parasite 18S rDNA sequences in winter among Antarctic marine protists. *J Plankton Res* **38**: 401–417.

- Coats, D., Adam, E., Gallegos, C., and Hedrick, S. (1996) Parasitism of photosynthetic dinoflagellates in a shallow subestuary of Chesapeake Bay, USA. *Aquat Microb Ecol* **11**: 1–9.
- Codreanu-Bălcescu, D. and Codreanu, R. (1976) L'ultrastructure d'une Microsporidie hyperparasite d'une grégarine d'Ephémère. *J Protozool* **23**:8A:
- Combes, C. (1995) Interactions durables : Ecologie et évolution du parasitisme, Paris: Masson.
- Combes, C., Gavotte, L., Moulia, C., and Sicard, M. (2018) Parasitisme: Ecologie et évolution des interactions durables, Dunod.
- Corradi, N., Pombert, J.-F., Farinelli, L., Didier, E.S., and Keeling, P.J. (2010) The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nat Commun* **1**: 77.
- Corradi, N. and Selmán, M. (2013) Latest Progress in Microsporidian Genome Research. *J Eukaryot Microbiol* **60**: 309–312.
- Corsaro, D., Michel, R., Walochnik, J., Venditti, D., Müller, K.-D., Hauröder, B., and Wylezich, C. (2016) Molecular identification of *Nucleophaga terricolae* sp. nov. (Rozellomycota), and new insights on the origin of the Microsporidia. *Parasitol Res* **115**: 3003–3011.
- Corsaro, D., Wylezich, C., Venditti, D., Michel, R., Walochnik, J., and Wegensteiner, R. (2019) Filling gaps in the microsporidian tree: rDNA phylogeny of *Chytridiopsis typographi* (Microsporidia: Chytridiopsida). *Parasitol Res* **118**: 169–180.
- Corsaro, D. (2022) Insights into Microsporidia Evolution from Early Diverging Microsporidia. In *Microsporidia*. *Experientia Supplementum*. Weiss, L.M. and Reinke, A.W. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 71–90.
- Curgy, J., Vavra, J., and Vivares, C.P. (1980) Presence of ribosomal RNAs prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol Cell* **38**: 49–52.

D

- Dajoz, R. (2006) Précis d'écologie, Paris: Dunod.
- Dean, P., Sendra, K.M., Williams, T.A., Watson, A.K., Major, P., Nakjang, S., et al. (2018) Transporter gene acquisition and innovation in the evolution of Microsporidia intracellular parasites. *Nat Commun* **9**: 1709.
- Debroas, D., Hugoni, M., and Domaizon, I. (2015) Evidence for an active rare biosphere within freshwater protists community. *Mol Ecol* **24**: 1236–1247.
- Debroas, D., Domaizon, I., Humbert, J.-F., Jardillier, L., Lepère, C., Oudart, A., and Taïb, N. (2017) Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data. *FEMS Microbiology Ecology* **93**.
- Decaestecker, E. (2002) Evolutionary ecology of host-parasite interactions: *Daphnia* and its parasites as a model. PhD thesis: Leuven, BE. KU Leuven.
- Decaestecker, E., Lefever, C., De Meester, L., and Ebert, D. (2004) Haunted by the past: Evidence for dormant stage banks of microparasites and epibionts of *Daphnia*. *Limnol Oceanogr* **49**: 1355–1364.
- Didier, E., J. Becnel, J., Kent, M., Sanders, J., and Weiss, L. (2014) Microsporidia. In *Systematics and Evolution*. Berlin: Springer, pp. 115–140.
- Dobson, A., Lafferty, K.D., Kuris, A.M., Hechinger, R.F., and Jetz, W. (2008) Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? *PNAS* **105**: 11482–11489.
- Dubuffet, A., Chauvet, M., Moné, A., Debroas, D., and Lepère, C. (2021) A phylogenetic framework to investigate the microsporidian communities through metabarcoding and its application to lake ecosystems. *Environmental Microbiology* **23**: 4344–4359.
- Dunn, A.M. and Smith, J.E. (2001) Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes and Infection* **3**: 381–388.

E

- Ebert, D. (1995) The Ecological Interactions between a Microsporidian Parasite and its Host *Daphnia magna*. *The Journal of Animal Ecology* **64**.

- Ebert, D., Lipsitch, M., and Mangin, K.L. (2000) The Effect of Parasites on Host Population Density and Extinction: Experimental Epidemiology with *Daphnia* and Six Microparasites. *Am Nat* **156**: 459–477.
- Ebert, D. (2005) Some parasites of *Daphnia*. In *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. National Center for Biotechnology Information.

F

- Faust, K. and Raes, J. (2012) Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol* **10**: 538–550.
- Faust, K. (2021) Open challenges for microbial network construction and analysis. *ISME J* **15**: 3111–3118.
- Fayer, R. and Santin-Duran, M. (2014) Epidemiology of Microsporidia in Human Infections. In *Microsporidia: pathogens of opportunity*. Wiley-Blackwell, pp. 135–164.
- Fernández-Valero, A.D., Reñé, A., Timoneda, N., Sampedro, N., and Garcés, E. (2022) Dinoflagellate hosts determine the community structure of marine Chytridiomycota: Demonstration of their prominent interactions. *Environmental Microbiology* 1462-2920.16182.
- Fielding, N.J., MacNEIL, C., Robinson, N., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., Terry, R.S., et al. (2005) Ecological impacts of the microsporidian parasite *Pleistophora mulleri* on its freshwater amphipod host *Gammarus duebeni celticus*. *Parasitology* **131**: 331–336.
- Fokin, S.I., Di Giuseppe, G., Erra, F., and Dini, F. (2008) *Euplotespora binucleata* n. gen., n. sp. (Protozoa: Microsporidia), a parasite infecting the hypotrichous ciliate *Euplotes woodruffi*, with observations on microsporidian infections in ciliophora. *J Eukaryot Microbiol* **55**: 214–228.
- Frenken, T., Alacid, E., Berger, S.A., Bourne, E.C., Gerphagnon, M., Grossart, H.-P., et al. (2017) Integrating chytrid fungal parasites into plankton ecology: research gaps and needs: Research needs in plankton chytridiomycosis. *Environmental Microbiology* **19**: 3802–3822.
- Friedman, J. and Alm, E.J. (2012) Inferring Correlation Networks from Genomic Survey Data. *PLOS Computational Biology* **8**: e1002687.

G

- Galbreath, S.J.G.M., Smith, J.E., Terry, R.S., Becnel, J.J., and Dunn, A.M. (2004) Invasion success of *Fibrillanosema crangonycis*, n.sp., n.g.: a novel vertically transmitted microsporidian parasite from the invasive amphipod host *Crangonyx pseudogracilis*. *International Journal for Parasitology* **34**: 235–244.
- Garvetto, A., Nézan, E., Badis, Y., Bilien, G., Arce, P., Bresnan, E., et al. (2018) Novel Widespread Marine Oomycetes Parasitising Diatoms, Including the Toxic Genus *Pseudo-nitzschia*: Genetic, Morphological, and Ecological Characterisation. *Front Microbiol* **9**: 2918.
- Geisen, S., Vaultot, D., Mahé, F., Lara, E., Vargas, C. de, and Bass, D. (2019) A user guide to environmental protistology: primers, metabarcoding, sequencing, and analyses. *bioRxiv* 850610.
- Gleason, F.H., Kagami, M., Lefevre, E., and Sime-Ngando, T. (2008) The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biology Reviews* **22**: 17–25.
- Gleason, F.H., Küpper, F.C., Amon, J.P., Picard, K., Gachon, C.M.M., Marano, A.V., et al. (2011) Zoosporic true fungi in marine ecosystems: a review. *Mar Freshwater Res* **62**: 383.
- Gloor, G.B., Macklaim, J.M., Pawlowsky-Glahn, V., and Egozcue, J.J. (2017) Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Front Microbiol* **8**: 2224.
- González-Tortuero, E., Rusek, J., Maayan, I., Petrussek, A., Piálek, L., Laurent, S., and Wolinska, J. (2016) Genetic diversity of two *Daphnia*-infecting microsporidian parasites, based on sequence variation in the internal transcribed spacer region. *Parasit Vectors* **9**.
- Gorbunov, A.K. and Kosova, A.A. (2001) Parasites in rotifers from the Volga delta. *Hydrobiologia* **446**: 51–55.

- Görtz, H.-D. (1987) Infections of *Stentor roeseli* and *S. polymorphus* (Ciliophora, Heterotrichida) by microsporidia. *Parasitol Res* **74**: 34–35.
- Grami, B., Rasconi, S., Niquil, N., Jobard, M., Saint-Béat, B., and Sime-Ngando, T. (2011) Functional Effects of Parasites on Food Web Properties during the Spring Diatom Bloom in Lake Pavin: A Linear Inverse Modeling Analysis. *PLOS ONE* **6**: e23273.
- Guidi, L., Chaffron, S., Bittner, L., Eveillard, D., Larhlimi, A., Roux, S., et al. (2016) Plankton networks driving carbon export in the oligotrophic ocean. *Nature* **532**: 465–470.
- Guillou, L., Viprey, M., Chambouvet, A., Welsh, R.M., Kirkham, A.R., Massana, R., et al. (2008) Widespread occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata). *Environ Microbiol* **10**: 3349–3365.
- Gutiérrez, M.H., Jara, A.M., and Pantoja, S. (2016) Fungal parasites infect marine diatoms in the upwelling ecosystem of the Humboldt current system off central Chile: Fungal parasites on marine diatoms in upwelling ecosystems. *Environ Microbiol* **18**: 1646–1653.

H

- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E.M., and Troedsson, C. (2014) Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. *PLOS ONE* **9**: e87624.
- Haine, E.R., Motreuil, S., and Rigaud, T. (2007) Infection by a vertically-transmitted microsporidian parasite is associated with a female-biased sex ratio and survival advantage in the amphipod *Gammarus roeseli*. *Parasitology* **134**: 1363–1367.
- Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P.M., Cali, A., et al. (2017) The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLoS Pathog* **13**: e1006341.
- Han, B. and Weiss, L.M. (2017) Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiol Spectr* **5**: 5.2.03.
- Han, B., Pan, G., and Weiss, L.M. (2021) Microsporidiosis in Humans. *Clinical Microbiology Reviews* **34**: 41.
- Herren, J.K., Mbaisi, L., Mararo, E., Makhulu, E.E., Mobegi, V.A., Butungi, H., et al. (2020) A microsporidian impairs *Plasmodium falciparum* transmission in *Anopheles arabiensis* mosquitoes. *Nature Communications* **11**: 2187.
- Hinney, B., Sak, B., Joachim, A., and Kváč, M. (2016) More than a rabbit's tale – Encephalitozoon spp. in wild mammals and birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **5**: 76–87.
- Hirano, H. and Takemoto, K. (2019) Difficulty in inferring microbial community structure based on co-occurrence network approaches. *BMC Bioinformatics* **20**: 329.
- Hoshino, T., Yilmaz, L.S., Noguera, D.R., Daims, H., and Wagner, M. (2008) Quantification of Target Molecules Needed To Detect Microorganisms by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Catalyzed Reporter Deposition-FISH. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5068–5077.
- Hudson, P.J., Dobson, A.P., Cattadori, I.M., Newborn, D., Haydon, D.T., Shaw, D.J., et al. (2002) Trophic interactions and population growth rates: describing patterns and identifying mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **357**: 1259–1271.
- Hudson, P.J., Dobson, A.P., and Lafferty, K.D. (2006) Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends Ecol Evol (Amst)* **21**: 381–385.
- Hugerth, L.W., Muller, E.E.L., Hu, Y.O.O., Lebrun, L.A.M., Roume, H., Lundin, D., et al. (2014) Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS ONE* **9**: e95567.

I

- Ishihara, R. and Hayashi, Y. (1968) Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **11**: 377–385.

J

- Jackson, M.A., Bonder, M.J., Kuncheva, Z., Zierer, J., Fu, J., Kurilshikov, A., et al. (2018) Detection of stable community structures within gut microbiota co-occurrence networks from different human populations. *PeerJ* **6**: e4303.
- Jahnke, M., Smith, J.E., Dubuffet, A., and Dunn, A.M. (2013) Effects of feminizing microsporidia on the masculinizing function of the androgenic gland in *Gammarus duebeni*. *Journal of Invertebrate Pathology* **112**: 146–151.
- James, T.Y., Pelin, A., Bonen, L., Ahrendt, S., Sain, D., Corradi, N., and Stajich, J.E. (2013) Shared Signatures of Parasitism and Phylogenomics Unite Cryptomycota and Microsporidia. *Current Biology* **23**: 1548–1553.
- James, T.Y., Stajich, J.E., Hittinger, C.T., and Rokas, A. (2020) Toward a Fully Resolved Fungal Tree of Life. *Annu Rev Microbiol* **74**: 291–313.
- Jansen, M., Stoks, R., Decaestecker, E., Coors, A., Van De Meutter, F., and De Meester, L. (2010) Local exposure shapes spatial patterns in infectivity and community structure of *Daphnia* parasites: Spatial patterns in parasite communities. *Journal of Animal Ecology* **79**: 1023–1033.
- Jephcott, T.G., Alves-de-Souza, C., Gleason, F.H., van Ogtrop, F.F., Sime-Ngando, T., Karpov, S.A., and Guillou, L. (2016) Ecological impacts of parasitic chytrids, syndiniales and perkinsids on populations of marine photosynthetic dinoflagellates. *Fungal Ecology* **19**: 47–58.
- Jespersen, N., Monrroy, L., and Barandun, J. (2022) Impact of Genome Reduction in Microsporidia. In *Microsporidia*. Experientia Supplementum. Weiss, L.M. and Reinke, A.W. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 1–42.
- Jobard, M., Rasconi, S., and Sime-Ngando, T. (2010a) Diversity and functions of microscopic fungi: a missing component in pelagic food webs. *Aquat Sci* **72**: 255–268.
- Jobard, M., Rasconi, S., and Sime-Ngando, T. (2010b) Fluorescence in situ hybridization of uncultured zoosporic fungi: Testing with clone-FISH and application to freshwater samples using CARD-FISH. *Journal of Microbiological Methods* **83**: 236–243.
- Jobard, M., Rasconi, S., Solinhac, L., Cauchie, H.-M., and Sime-Ngando, T. (2012) Molecular and morphological diversity of fungi and the associated functions in three European nearby lakes: True Fungi (Eumycota) in pelagic freshwaters. *Environmental Microbiology* **14**: 2480–2494.
- Jobard, M., Wawrzyniak, I., Bronner, G., Marie, D., Vellet, A., Sime-Ngando, T., et al. (2020) Freshwater Perkinsea: diversity, ecology and genomic information. *Journal of Plankton Research* **42**: 3–17.
- Jones, M.D.M., Forn, I., Gadelha, C., Egan, M.J., Bass, D., Massana, R., and Richards, T.A. (2011) Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature* **474**: 200–203.

K

- Kagami, M., Miki, T., and Takimoto, G. (2014) Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Front Microbiol* **5**.
- Karpov, S.A., Mamkaeva, M.A., Aleoshin, V.V., Nasonova, E., Lilje, O., and Gleason, F.H. (2014) Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. *Front Microbiol* **5**: 112.
- Keeling, P.J. and Fast, N.M. (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* **56**: 93–116.
- Keeling, P. (2009) Five Questions about Microsporidia. *PLoS Pathog* **5**: e1000489.
- Kent, M. and Sanders, J. (2020) Important Parasites of Zebrafish in Research Facilities., pp. 479–494.
- Koella, J.C. and Agnew, P. (1997) Blood-Feeding Success of the Mosquito *Aedes aegypti* Depends on the Transmission Route of Its Parasite *Edhazardia aedis*. *Oikos* **78**: 311–316.
- Kohler, S.L. and Hoiland, W.K. (2001) Population regulation in an aquatic insect: the role of disease. *Ecology* **82**: 2294–2305.
- Krüger, F. (1956) Über die Microsporidien-Infektion von *Campanella umbellaria* (Ciliata Peritricha). *Zool Anz* **156**: 125–129.

- Kubota, K. (2013) CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement and Future Applications. *Microb Environ* **28**: 3–12.
- Kuris, A.M., Hechinger, R.F., Shaw, J.C., Whitney, K.L., Aguirre-Macedo, L., Boch, C.A., et al. (2008) Ecosystem energetic implications of parasite and free-living biomass in three estuaries. *Nature* **454**: 515–518.
- Kurtz, Z.D., Müller, C.L., Miraldi, E.R., Littman, D.R., Blaser, M.J., and Bonneau, R.A. (2015) Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks. *PLoS Comput Biol* **11**: e1004226.

L

- Lafferty, K.D., Dobson, A.P., and Kuris, A.M. (2006) Parasites dominate food web links. *PNAS* **103**: 11211–11216.
- Lafferty, K.D., Allesina, S., Arim, M., Briggs, C.J., Leo, G.D., Dobson, A.P., et al. (2008) Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology Letters* **11**: 533–546.
- Lafferty, K.D. (2010) Interacting Parasites. *Science* **330**: 187–188.
- Lair, N. and Oulad Ali, H. (1990) Grazing and assimilation rates of natural populations of planktonic rotifers *Keratella cochlearis*, *Keratella quadrata* and *Kellicottia longispina* in a eutrophic lake (Aydat, France). *Hydrobiologia* **194**: 119–131.
- Lara, E., Moreira, D., and López-García, P. (2010) The Environmental Clade LKM11 and Rozella Form the Deepest Branching Clade of Fungi. *Protist* **161**: 116–121.
- Larsen, B.B., Miller, E.C., Rhodes, M.K., and Wiens, J.J. (2017) Inordinate Fondness Multiplied and Redistributed: the Number of Species on Earth and the New Pie of Life. *The Quarterly Review of Biology* **92**: 229–265.
- Larsson, J.I. (2005) Molecular versus morphological approach to microsporidian classification. *FOLIA PARASIT* **52**: 143–144.
- Laundon, D. and Cunliffe, M. (2021) A Call for a Better Understanding of Aquatic Chytrid Biology. *Front Fungal Biol* **2**: 708813.
- Layeghifard, M., Hwang, D.M., and Guttman, D.S. (2017) Disentangling Interactions in the Microbiome: A Network Perspective. *Trends in Microbiology* **25**: 217–228.
- Lefèvre, E., Roussel, B., Amblard, C., and Sime-Ngando, T. (2008) The Molecular Diversity of Freshwater Picoeukaryotes Reveals High Occurrence of Putative Parasitoids in the Plankton. *PLOS ONE* **3**: e2324.
- Lefèvre, E., Jobard, M., Venisse, J.-S., Bec, A., Kagami, M., Amblard, C., and Sime-Ngando, T. (2010) Development of a Real-Time PCR assay for quantitative assessment of uncultured freshwater zoosporic fungi. *Journal of Microbiological Methods* **81**: 69–76.
- Li, W., Feng, Y., and Santin, M. (2019) Host Specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and Public Health Implications. *Trends in Parasitology* **35**: 436–451.
- Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., et al. (2015) Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science* **348**: 1262073–1262073.
- López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C., and Moreira, D. (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* **409**: 603–607.
- Lutz, A. and Splendore, A. (1908) Über Pebrine und verwandte Mikrosporidien. Zweite Mitteilung. *Centralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1, Orig* **46**: 311–315.

M

- MacNeil, C., Dick, J.T.A., Hatcher, M.J., Fielding, N.J., Hume, K.D., and Dunn, A.M. (2003a) Parasite transmission and cannibalism in an amphipod (Crustacea). *International Journal for Parasitology* **33**: 795–798.
- MacNeil, C., Fielding, N.J., Hume, K.D., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., Hatcher, M.J., and Dunn, A.M. (2003b) Parasite altered micro-distribution of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *International Journal for Parasitology* **33**: 57–64.

- Mandakovic, D., Rojas, C., Maldonado, J., Latorre, M., Travisany, D., Delage, E., et al. (2018) Structure and co-occurrence patterns in microbial communities under acute environmental stress reveal ecological factors fostering resilience. *Sci Rep* **8**: 5875.
- Mangot, J.-F., Domaizon, I., Taib, N., Marouni, N., Duffaud, E., Bronner, G., and Debroas, D. (2013) Short-term dynamics of diversity patterns: evidence of continual reassembly within lacustrine small eukaryotes. *Environ Microbiol* **15**: 1745–1758.
- Marande, W., López-García, P., and Moreira, D. (2009) Eukaryotic diversity and phylogeny using small- and large-subunit ribosomal RNA genes from environmental samples. *Environmental Microbiology* **11**: 3179–3188.
- Marcogliese, D.J. and Cone, D.K. (1997) Food webs: a plea for parasites. *Trends in Ecology & Evolution* **12**: 320–325.
- Martínez-López, V., Ruiz, C., Muñoz, I., Ormosa, C., Higes, M., Martín-Hernández, R., and De la Rúa, P. (2022) Detection of Microsporidia in Pollinator Communities of a Mediterranean Biodiversity Hotspot for Wild Bees. *Microb Ecol* **84**: 638–642.
- McMurdie, P.J. and Holmes, S. (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **8**: e61217.
- de Meeûs, T. and Renaud, F. (2002) Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends in Parasitology* **18**: 247–251.
- Meinshausen, N. and Bühlmann, P. (2006) High-dimensional graphs and variable selection with the Lasso. *The Annals of Statistics* **34**: 1436–1462.
- Mikhailov, K.V., Simdyanov, T.G., and Aleoshin, V.V. (2017) Genomic Survey of a Hyperparasitic Microsporidian *Amphiamblys* sp. (Metchnikovellidae). *Genome Biol Evol* **9**: 454–467.
- Miner, B.E., De Meester, L., Pfrender, M.E., Lampert, W., and Hairston, N.G. (2012) Linking genes to communities and ecosystems: *Daphnia* as an ecogenomic model. *Proc Biol Sci* **279**: 1873–1882.
- Monchy, S., Sancier, G., Jobard, M., Rasconi, S., Gerphagnon, M., Chabé, M., et al. (2011) Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing: Fungal diversity in freshwater lakes. *Environmental Microbiology* **13**: 1433–1453.
- Montagnes, D., Chambouvet, A., Guillou, L., and Fenton, A. (2008) Responsibility of microzooplankton and parasite pressure for the demise of toxic dinoflagellate blooms. *Aquat Microb Ecol* **53**: 211–225.
- Moon-van der Staay, S.Y., De Wachter, R., and Vaultot, D. (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* **409**: 607–610.
- Murareanu, B.M., Sukhdeo, R., Qu, R., Jiang, J., and Reinke, A.W. (2021) Generation of a Microsporidia Species Attribute Database and Analysis of the Extensive Ecological and Phenotypic Diversity of Microsporidia. *mBio* **12**: e01490-21.

N

- Nägeli, C.W. von (1857) Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot Zeitung*. *Bot Zeitung* **15**: 760–761.
- Niehus, S., Giammarinaro, P., Liégeois, S., Quintin, J., and Ferrandon, D. (2012) Fly culture collapse disorder: detection, prophylaxis and eradication of the microsporidian parasite *Tubulinosema ratisbonensis* infecting *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)* **6**: 193–204.
- Niquil, N., Kagami, M., Urabe, J., Christaki, U., Viscogliosi, E., and Sime-Ngando, T. (2011) Potential role of fungi in plankton food web functioning and stability: a simulation analysis based on Lake Biwa inverse model. *Hydrobiologia* **659**: 65–79.

P

- Park, E. and Poulin, R. (2021) Revisiting the phylogeny of microsporidia. *International Journal for Parasitology* **51**: 855–864.

- Pasteur, L. (1870) Études sur la maladie des vers à soie : moyen pratique assuré de la combattre et d'en prévenir le retour, Paris: Gauthier-Villars, successeur de Mallet-Bachelier.
- Paxton, R.J. (2010) Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research* **49**: 80–84.
- Piwosz, K., Mukherjee, I., Salcher, M.M., Grujić, V., and Šimek, K. (2021) CARD-FISH in the Sequencing Era: Opening a New Universe of Protistan Ecology. *Front Microbiol* **12**: 640066.
- Pomeroy, L., leB. Williams, P., Azam, F., and Hobbie, J. (2007) The Microbial Loop. *Oceanog* **20**: 28–33.
- Powell, M.J., Letcher, P.M., and James, T.Y. (2017) Ultrastructural characterization of the host–parasite interface between *Allomyces anomalus* (Blastocladiomycota) and *Rozella allomycis* (Cryptomycota). *Fungal Biology* **121**: 561–572.
- Price, P.W. (1980) Evolutionary biology of parasites. *Monogr Popul Biol* **15**: 1–237.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* **35**: 7188–7196.

Q

- Quiles, A., Bacela-Spychalska, K., Teixeira, M., Lambin, N., Grabowski, M., Rigaud, T., and Wattier, R.A. (2019) Microsporidian infections in the species complex *Gammarus roeselii* (Amphipoda) over its geographical range: evidence for both host–parasite co-diversification and recent host shifts. *Parasites Vectors* **12**: 327.

R

- R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing.
- Rasconi, S., Jobard, M., and Sime-Ngando, T. (2011) Parasitic fungi of phytoplankton: ecological roles and implications for microbial food webs. *Aquat Microb Ecol* **62**: 123–137.
- Reinke, A.W., Balla, K.M., Bennett, E.J., and Troemel, E.R. (2017) Identification of microsporidia host-exposed proteins reveals a repertoire of rapidly evolving proteins. *Nat Commun* **8**: 14023.
- Reñé, A., Timoneda, N., Sampedro, N., Alacid, E., Gallisai, R., Gordi, J., et al. (2021) Host preferences of coexisting *Perkinsea* parasitoids during coastal dinoflagellate blooms. *Mol Ecol* **30**: 2417–2433.
- Rico-Martínez, R., Arzate-Cárdenas, M.A., Robles, D., Pérez-Legaspi, I., Alvarado-Flores, J., and Santos Medrano, G.E. (2016) Rotifers as Models in Toxicity Screening of Chemicals and Environmental Samples., pp. 57–99.
- Riou, V., Périot, M., and Biegala, I.C. (2017) Specificity Re-evaluation of Oligonucleotide Probes for the Detection of Marine Picoplankton by Tyramide Signal Amplification-Fluorescent In Situ Hybridization. *Front Microbiol* **8**: 854.
- Rotari, Y.M., Paskerova, G.G., and Sokolova, Y.Y. (2015) Diversity of metchnikovellids (Metchnikovellidae, Rudimicrosporea), hyperparasites of bristle worms (Annelida, Polychaeta) from the White Sea. *Protistology* **9**: 50–59.
- Röttgers, L. and Faust, K. (2018) From hairballs to hypotheses—biological insights from microbial networks. *FEMS Microbiology Reviews* **42**: 761–780.
- Rühl, H. and Korn, H. (1979) Ein Mikrosporidier, *Geusia gamocysti* n. gen., n. sp. als Hyperparasit bei *Gamocystis ephemerae*. *Arch Protistenkd* 349–355.

S

- Salomon, P., Granéli, E., Neves, M., and Rodriguez, E. (2009) Infection by *Amoebophrya* spp. parasitoids of dinoflagellates in a tropical marine coastal area. *Aquat Microb Ecol* **55**: 143–153.

- Sato, T., Egusa, T., Fukushima, K., Oda, T., Ohte, N., Tokuchi, N., et al. (2012) Nematomorph parasites indirectly alter the food web and ecosystem function of streams through behavioural manipulation of their cricket hosts. *Ecol Lett* **15**: 786–793.
- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., and Amann, R. (1997) Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3268–3273.
- Schuster, C.J., Sanders, J.L., Couch, C., and Kent, M.L. (2022) Recent Advances with Fish Microsporidia. In *Microsporidia*. Experientia Supplementum. Weiss, L.M. and Reinke, A.W. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 285–317.
- Sekimoto, S., Beakes, G.W., Gachon, C.M.M., Müller, D.G., Küpper, F.C., and Honda, D. (2008) The Development, Ultrastructural Cytology, and Molecular Phylogeny of the Basal Oomycete *Eurychasma dicksonii*, Infecting the Filamentous Phaeophyte Algae *Ectocarpus siliculosus* and *Pylaiella littoralis*. *Protist* **159**: 299–318.
- Siano, R., Alves-de-Souza, C., Foulon, E., Bendif, E.M., Simon, N., Guillou, L., and Not, F. (2011) Distribution and host diversity of Amoebozoa parasites across oligotrophic waters of the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **8**: 267–278.
- Sime-Ngando, T. (2012) Phytoplankton Chytridiomycosis: Fungal Parasites of Phytoplankton and Their Imprints on the Food Web Dynamics. *Front Microbio* **3**.
- Simon, M., Jardillier, L., Deschamps, P., Moreira, D., Restoux, G., Bertolino, P., and López-García, P. (2015) Complex communities of small protists and unexpected occurrence of typical marine lineages in shallow freshwater systems: Protist diversity in shallow freshwater systems. *Environ Microbiol* **17**: 3610–3627.
- Singer, D., Seppely, C.V.W., Lentendu, G., Dunthorn, M., Bass, D., Belbahri, L., et al. (2021) Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems. *Environment International* **146**: 106262.
- Skovgaard, A. (2014) Dirty Tricks in the Plankton: Diversity and Role of Marine Parasitic Protists. *Acta Protozoologica* **2014**: 51–62.
- Sparrow, F.K. (Frederick K. (1960) Aquatic Phycomycetes, Ann Arbor, University of Michigan Press.
- Sprague, V., Becnel, J.J., and Hazard, E.I. (1992) Taxonomy of phylum microspora. *Crit Rev Microbiol* **18**: 285–395.
- Stentiford, G.D., Feist, S.W., Stone, D.M., Bateman, K.S., and Dunn, A.M. (2013) Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. *Trends Parasitol* **29**: 567–578.
- Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A.P., et al. (2016) Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends in Parasitology* **32**: 336–348.
- Stentiford, G.D., Ramilo, A., Abollo, E., Kerr, R., Bateman, K.S., Feist, S.W., et al. (2017) *Hyperspora aquatica* n.g.n., n.sp. (Microsporidia), hyperparasitic in *Marteilia cochillia* (Paramyxida), is closely related to crustacean-infecting microsporidian taxa. *Parasitology* **144**: 186–199.
- Stentiford, G.D., Ross, S., Minardi, D., Feist, S.W., Bateman, K.S., Gainey, P.A., et al. (2018) Evidence for trophic transfer of *Inodosporus octospora* and *Ovipleistophora arlo* n. sp. (Microsporidia) between crustacean and fish hosts. *Parasitology* **145**: 1105–1117.
- Strassert, J.F.H., Karnkowska, A., Hehenberger, E., del Campo, J., Kolisko, M., Okamoto, N., et al. (2018) Single cell genomics of uncultured marine alveolates shows paraphyly of basal dinoflagellates. *ISME J* **12**: 304–308.
- Sures, B., Nachev, M., Pahl, M., Grabner, D., and Selbach, C. (2017) Parasites as drivers of key processes in aquatic ecosystems: Facts and future directions. *Experimental Parasitology* **180**: 141–147.

T

- Tackmann, J., Matias Rodrigues, J.F., and von Mering, C. (2019) Rapid Inference of Direct Interactions in Large-Scale Ecological Networks from Heterogeneous Microbial Sequencing Data. *Cell Systems* **9**: 286–296.e8.

- Taib, N., Mangot, J.-F., Domaizon, I., Bronner, G., and Debroas, D. (2013) Phylogenetic Affiliation of SSU rRNA Genes Generated by Massively Parallel Sequencing: New Insights into the Freshwater Protist Diversity. *PLOS ONE* **8**: e58950.
- Terry, R.S., Smith, J.E., Sharpe, R.G., Rigaud, T., Littlewood, D.T.J., Ironside, J.E., et al. (2004) Widespread vertical transmission and associated host sex-ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora. *Proc Biol Sci* **271**: 1783–1789.
- Thomarat, F., Vivarès, C.P., and Gouy, M. (2004) Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J Mol Evol* **59**: 780–791.
- Thompson, J.N. (1988) Variation in Interspecific Interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **19**: 65–87.
- Tokarev, Y.S., Voronin, V.N., Seliverstova, E.V., Pavlova, O.A., and Issi, I.V. (2010) Life cycle, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Crispospora chironomi* g.n. sp.n. (Microsporidia: Terresporidia), a parasite of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *Parasitol Res* **107**: 1381–1389.
- Tokarev, Y.S., Huang, W.-F., Solter, L.F., Malysh, J.M., Becnel, J.J., and Vossbrinck, C.R. (2020) A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *Journal of Invertebrate Pathology* **169**: 107279.
- Trzebny, A., Slodkowicz-Kowalska, A., Becnel, J.J., Sanscrainte, N., and Dabert, M. (2020) A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). *Mol Ecol Resour* **20**: 1486–1504.

V

- de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahe, F., Logares, R., et al. (2015) Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* **348**: 1261605–1261605.
- Vávra, J. and Lukeš, J. (2013) Microsporidia and ‘The Art of Living Together.’ In *Advances in Parasitology*. Elsevier, pp. 253–319.
- Vávra, J. and Larsson, J.I.R. (2014) Structure of Microsporidia. In *Microsporidia*. Wiley-Blackwell, pp. 1–70.
- Vávra, J., Fiala, I., Krylová, P., Petrussek, A., and Hyliš, M. (2019) Establishment of a new microsporidian genus and species, *Pseudoberwaldia daphniae* (Microsporidia, Opisthosporidia), a common parasite of the *Daphnia longispina* complex in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* **162**: 43–54.
- Velo-Suárez, L., Brosnahan, M.L., Anderson, D.M., and McGillicuddy, D.J. (2013) A Quantitative Assessment of the Role of the Parasite *Amoebophrya* in the Termination of *Alexandrium fundyense* Blooms within a Small Coastal Embayment. *PLoS ONE* **8**: e81150.
- Vizoso, D.B. and Ebert, D. (2005) Phenotypic plasticity of host-parasite interactions in response to the route of infection. *J Evol Biol* **18**: 911–921.
- Vossbrinck, C.R. and Woese, C.R. (1986) Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* **320**: 287–288.
- Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B.A., and Woese, C.R. (1987) Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* **326**: 411–414.
- Vossbrinck, C.R. and Debrunner-Vossbrinck, B.A. (2005) Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol* **52**: 131–142; discussion 130.
- Vossbrinck, C.R., Debrunner-Vossbrinck, B.A., and Weiss, L.M. (2014) Phylogeny of the Microsporidia. In *Microsporidia*. Weiss, L.M. and Becnel, J.J. (eds). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc., pp. 203–220.

W

- Wallace, R.L., Nogrady, T., Snell, T.W., and Ricci, C. (2006) Rotifera: Biology, Ecology and Systematics, Kenobi Productions.
- Weiss, L.M., Zhu, X., Cali, A., Tanowitz, H.B., and Wittner, M. (1994) Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitol (Praha)* **41**: 81–90.
- Weiss, L.M. (2000) Molecular Phylogeny and Diagnostic Approaches to Microsporidia. In *Contributions to Microbiology*. Petry, F. (ed). Basel: KARGER, pp. 209–235.
- Weiss, L.M., Delbac, F., Russell Hayman, J., Pan, G., Dang, X., and Zhou, Z. (2014) The Microsporidian Polar Tube and Spore Wall. In *Microsporidia*. Weiss, L.M. and Becnel, J.J. (eds). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc., pp. 261–306.
- Weiss, S., Van Treuren, W., Lozupone, C., Faust, K., Friedman, J., Deng, Y., et al. (2016) Correlation detection strategies in microbial data sets vary widely in sensitivity and precision. *ISME J* **10**: 1669–1681.
- Wetzel, R.G. and Manny, B.A. (1972) Decomposition of dissolved organic carbon and nitrogen compounds from leaves in an experimental hard-water stream1. *Limnol Oceanogr* **17**: 927–931.
- Williams, B.A.P., Hirt, R.P., Lucocq, J.M., and Embley, T.M. (2002) A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* **418**: 865–869.
- Williams, B.A.P., Hamilton, K.M., Jones, M.D., and Bass, D. (2018) Group-specific environmental sequencing reveals high levels of ecological heterogeneity across the microsporidian radiation. *Environmental Microbiology Reports* **9**.
- Williams, T.A., Nakjang, S., Campbell, S.E., Freeman, M.A., Eydal, M., Moore, K., et al. (2016) A Recent Whole-Genome Duplication Divides Populations of a Globally Distributed Microsporidian. *Mol Biol Evol* **33**: 2002–2015.
- Willis, A.R. and Reinke, A.W. (2022) Factors That Determine Microsporidia Infection and Host Specificity. In *Microsporidia*. Experientia Supplementum. Weiss, L.M. and Reinke, A.W. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 91–114.
- Windsor, D.A. (1997) Stand up for parasites. *Trends Ecol Evol* **12**: 32.
- Windsor, D.A. (1998) Controversies in parasitology, Most of the species on Earth are parasites. *International Journal for Parasitology* **28**: 1939–1941.
- Wolska, M. and Mazurkiewicz-Zapalowicz, K. (2013) Parasites of zooplankton and periphyton assemblages in the littoral zone of lakes in Drawa National Park, Poland. *Acta Mycologica* **48**: 51–59.

Y

- Yakovleva, Y., Nassonova, E., Lebedeva, N., Lanzoni, O., Petroni, G., Potekhin, A., and Sabaneyeva, E. (2020) The first case of microsporidiosis in *Paramecium*. *Parasitology* **147**: 957–971.
- Yilmaz, L.S., Loy, A., Wright, E.S., Wagner, M., and Noguera, D.R. (2012) Modeling Formamide Denaturation of Probe-Target Hybrids for Improved Microarray Probe Design in Microbial Diagnostics. *PLoS ONE* **7**: e43862.

Z

- Zbinden, M., Haag, C.R., and Ebert, D. (2008) Experimental evolution of field populations of *Daphnia magna* in response to parasite treatment. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 1068–1078.

